

**YAĞ DOKUSU KÖKENLİ MEZENŞİMAL KÖK
HÜCRELERİNİN FARKLI PASAJLARDA
KARAKTERİZASYONU**

**CHARACTERIZATION OF ADIPOSE TISSUE-DERIVED
MESENCHYMAL STEM CELLS IN DIFFERENT PASSAGES**

MİNELA JUSOVIĆ

PROF. DR. MEHMET ALİ ONUR

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

MİNELA JUSOVİC'in hazırladığı "**Yağ Dokusu Kökenli Mezenşimal Kök Hücrelerinin Farklı Pasajlarda Karakterizasyonu**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**' nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet Ali Onur

Danışman

.....

Prof. Dr. Nuran Diril

Üye

.....

Prof. Dr. Güldeniz Selmanoğlu

Üye

.....

Prof. Dr. Mustafa Kocakulak

Üye

.....

Doç. Dr. Özer Aylin Gürpınar

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

10/07/2014

Minela Jusovic

ÖZET

YAĞ DOKUSU KÖKENLİ MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERİNİN FARKLI PASAJLARDA KARAKTERİZASYONU

Minela Jusovic

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Temmuz 2014, 105 sayfa

Yağ dokusu, hücresel tedavi ve rejeneratif tıp için dikkat çekici ve bol bulunan bir kök hücre kaynağıdır. Mezenşimal kök hücreler (MKH) hasar bölgesine göç, tutunma ve dokuya yerleşme yetenekleri sayesinde ve salgıladıkları moleküller aracılığıyla önemli derecede tedavi edici potansiyele sahiptir. MKH'ler cilt altı yağ dokusundan primer eksplant kültür yöntemi ile kolaylıkla izole edilebilir ve *in vitro* kültür ortamında kolaylıkla çoğaltılabilir. MKH'ler immunofenotiplerini belirleyen bir çok yüzey antijeni ifade eder. Bu çalışmada MKH'ler 10 farklı pasajda beş farklı yüzey antijeni (CD13, CD29, CD54, CD90 ve CD34) için immunofloresan boyama yöntemi ile karakterize edilmiştir. MKH'ler Wistar albino sıçanlardan primer kültür yöntemi ile izole edilmiş ve standart koşullarda kültürü yapılmıştır. 10 pasajda da MKH'ler kültür kaplarının yüzeyine tutunarak fibroblastik morfoloji göstermiştir. Hücreler tam konfluent hale geldikten sonra pasajlanmış, ve bütün pasajlarda yüzey antijenlerinin ifadesi % olarak hesaplanmıştır. Pasajlar arasında yüzey antijenlerin ifade bakımından farklılık olup olmadığı Kruskal-Wallis test yöntemi ile istatistiksel olarak gösterilmiştir. İstatistiksel önem kontrolü $p \leq 0,05$ düzeyinde yapılmıştır.

Sonuçlar hücreler uzun süre kültür edildikleri zaman yüzey antijenlerinin ifadesinde değişiklikler olduğunu göstermiştir.

CD13 ve CD54 artan pasajlarda ifade oranında bir değişiklik olmazken, CD29 ve CD90 ifadesi farklı pasajlarda değişmektedir ve en yüksek ifade oranı ilk pasajlarda görülürken ilerleyen pasajlarda ifade oranı düşmektedir. CD34, MKH'lerde ifade edilen bir diğer yüzey antijenidir. Ancak, bu yüzey antijenin ifadesi diğer yüzey antijenleri ile kıyaslandığında belirgin derecede düşük olmaktadır.

MKH'lerin yüzey antijenlerinin profiline bakıldığında, ilk pasajlarda yüzey ifadesi bakımından daha kararlı oldukları ve *in vivo* uygulamalar için P3, P4, P5 ve P6'nın en uygun pasajlar olduğu söylenebilir. Bu pasajlarda hücrelerin morfolojileri değişmemekte ve immunofenotipik özelliklerini devam ettirmektedirler.

Heterojen bir hücre populasyonu olduğu için, bir çok yüzey antijeninin ifadesi, ilk pasajlarda hücre kültüründe salgılanmış çeşitli faktörler ve sitokin molekülleri tarafından etkilenmekte ve *in vitro* yüzey antijenlerinin ifadesi, *in vivo* daki ifadeleri ile her zaman örtüşmemektedir.

Anahtar Kelimeler: yağ doku, mezenşimal kök hücreler, yüzey antijen, pasaj, ifade

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS IN DIFFERENT PASSAGES

Minela Jusovic

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

July 2014, 105 pages

Adipose tissue represents an attractive and abundant stem cell source for both cellular therapy and regenerative medicine. It is clear that mesenchymal stem cells (MSCs) have significant therapeutic potential because of their ability to secrete various molecules, which are important for their adhesion, migration and homing to the site of injury. MSC can be isolated from subcutaneous adipose tissue by primary explant culture method, can be easily expanded *in vitro*. MSCs express many of surface molecules that define their immunophenotype.

In this study, MSCs were characterized in 10 different passages for five surface antigens including CD13, CD29, CD54, CD90 and CD34 by using immunofluorescence staining method. MSCs were isolated by primary explant culture method from Wistar albino rats, and cultured under standard culture conditions. In the culture medium cells showed plastic adherent properties, and exhibited fibroblastic morphologies in all of 10 different passages. Cells were subcultured when nearly complete confluence was reached. Expression profile (%) of five different surface antigens were determined separately in all passages.

By using independent samples Kruskal-Wallis test expression profile of each surface antigen was compared between passages. P-value of $p \leq 0,05$ was considered statistically different. Results obtained showed that some surface antigens were changed when cells are cultured for longer time. The expression of CD13 and CD54 did not change with increasing passage number. However, expression of CD29 and CD90 was variable between passages, and was mostly expressed highly in first passages, with decline in later passages. CD34 was also detected on the surface of MSCs, but its expression was considerably lower than other normally positively expressed surface antigens.

Based on surface profile of the characterized MSCs it can be concluded that the expression profile is mostly stable in first passages, and for any further *in vivo* application these cells should be used at P3, P4, P5, P6 passages. In the mentioned passages cells maintained their morphologies and kept their immunophenotypic characteristics.

Because of the heterogenous cell population, it is important to note that differences in cell surface expression of many markers may be influenced by factors secreted by other cells in the initial passage, and the *in vitro* expression of some markers by MSCs does not always correlate with their expression patterns *in vivo*.

Keywords: adipose tissue, mesenchymal stem cells, surface antigen, passage, expression

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında öncelikle danışman hocam sayın **Prof. Dr. Mehmet Ali Onur**'a, çalıőmalarım boyunca bana engin tecrübeleriyle destek olduğu, ilgisini ve çok önemli zamanını ayırarak yardımlarını esirgemediği için teşekkürlerim sunarım.

Tez çalıőmalarımda benim yanımda olan ve her zaman tezimde beni destekleyen ve her konuda yardım eden sevgili hocam **Doç. Dr. Özer Aylin Gürpınar** 'a teşekkürü borç bilirim.

Tez çalıőmamın deneysel aşamalarındaki tüm yardım ve destekleri için **Arő. Gör. Esin Akbay** 'a ve **Arő. Gör. Handan Sevim**'e çok teşekkür ederim.

Bu heyecanlı ve zorlu dönemimde, bütün iyi ve kötü zamanımda, her şeyleriyle yanımda olan, arkadaşım **Ekin Ergin** 'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca, büyük bir sabır ile her zaman yanımda olan, beni her konuda destekleyen ve hiç bir zaman beni yalnız bırakmayan niőanlım **Tahsin Emre Aslan**'a teşekkür ederim.

Son olarak, tez çalıőmamı bitirmeme, yanımda olmasalar bile eksikliklerini hiç hissettirmeyen çok **sevgili aileme** ve canım kardeőim **Maida Jusovic**'e sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	viii
ŞEKİLLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kök Hücreler	3
2.1.1. Embriyonik Kök Hücreler	4
2.1.2. Yetişkin Kök Hücreler	5
2.2. Mezenşimal Kök Hücreler (MKH)	6
2.2.1 Mezenşimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	7
2.2.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin Kaynakları	8
2.3. Yağ Dokusu Kökenli Mezenşimal Kök Hücreler	10
2.3.1. Yağ Dokusu Kökenli Mezenşimal Kök Hücrelerin Yüzey Özellikleri ve Karakterizasyonu	12
2.3.1.1. CD 13 (Aminopeptidaz N)	13
2.3.1.2. CD 29 (İntegrin β 1)	14
2.3.1.3. CD 54 (intraselüler adezyon molekülü-1)	16
2.3.1.4. CD 90 (Thy-1)	17
2.3.1.5. CD 34	18
2. 4. Hücre Kültüründe Pasajlama	19
3. MATERYAL VE METOD	21

3.1. Mezenşimal Kök Hücre İzolasyonu.....	21
3.2. Mezenşimal Kök Hücre Kültürü ve Pasajlanması	22
3.3. Mezenşimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu.....	25
3.3.1. Mezenşimal Kök Hücrelerin Karakterizasyon için Hazırlanması.....	25
3.3.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin İmmunofloresan Yöntemi ile Karakterizasyonu	27
3.4. İstatistiksel Analiz	29
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	30
4.1. Mezenşimal Kök Hücrelerin İzolasyonu, Kültürü ve Pasajlanması.....	30
4.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu.....	38
4.2.1. Mezenşimal Kök Hücrelerin CD13 Yüzey Antijeni ile Karakterizasyonu... 40	
4.2.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin CD29 Yüzey Antijeni ile Karakterizasyonu... 51	
4.2.3. Mezenşimal Kök Hücrelerin CD54 Yüzey Antijeni ile Karakterizasyonu... 62	
4.2.4. Mezenşimal Kök Hücrelerin CD90 Yüzey Antijeni ile Karakterizasyonu... 73	
4.2.5. Mezenşimal Kök Hücrelerin CD34 Yüzey Antijeni ile Karakterizasyonu... 84	
KAYNAKLAR.....	106
ÖZGEÇMİŞ	112

ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.3.1. 1 Mezenşimal kök hücrelerin yüzey antijenleri.....	12
Çizelge 2.3.1.2 Mezenşimal kök hücrelerde yaygın olarak ifade edilen yüzey işaretleyiciler.....	13
Çizelge 4.2. 1 CD34 yüzey antijenin % ifadesinin diğer yüzey antijenleri ile karşılaştırılması	39
Çizelge 4.2.2. 1 CD29 yüzey antijeninin pasajlarının karşılaştırılması	61
Çizelge 4.2.4. 1 CD90 yüzey antijeninin pasajlarının karşılaştırılması	83
Çizelge 4.2.5. 1 CD34 yüzey antijeninin pasajlarının karşılaştırılması	94

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1.1. 1 Pluripotent özellikteki embriyonik kök hücreler	4
Şekil 2.1.2. 1 Multipotent kök hücreler.....	5
Şekil 2.2. 1 Mezenşimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri	6
Şekil 2.3. 1 Yağ dokusu kökenli mezenşimal kök hücrelerinin farklılaşma potansiyeli	10
Şekil 2.3. 2 P1'de yağ dokusu kökenli mezenşimal kök hücrelerin fibroblast morfolojisi A) X10 B) X20	11
Şekil 2.3.1.1. 1 İnsan Aminopeptidaz N (CD13) protein	14
Şekil 2.3.1.2. 1 A) İntegrinin temel yapısı B) İntegrinin moleküler yapısı α ve β altüniteler	15
Şekil 2.3.1.2. 2 İntegrin reseptörlerinin ekstrasellüler matriksler üzerinde bulunan fibronektin ve kolajen ligandlara bağlanması	16
Şekil 2.3.1.3. 1 A) ICAM-1 temel yapısı B) ICAM-1'in β 2 integrinleri tanınması	17
Şekil 2.3.1.4. 1 Thy-1 (CD90) membrana bağlanması; Glikozilfosfatidilinozitol anchor (GPI-açık yeşil)	18
Şekil 3.1. 1 Sıçanlardan yağ dokusu alınması A) Kasık bölgesinde insizyon yapılması B) Yağ dokusunun (\rightarrow) cilt altından çıkartılması.....	21
Şekil 3.2. 1 6-kuyucuklu kültür kabındaki yağ doku parçaları	22
Şekil 3.2. 2 6-kuyucuklu kültür kaplarında yağ dokularının inkübasyonu.....	23
Şekil 3.2. 3 Mezenşimal kök hücrelerin pasaj 1 (P1)'de 25cm ² 'lik kültür kabında kültüre edilmesi	24
Şekil 3.2. 4 Mezenşimal kök hücrelerin 75cm ² 'lik kültür kabında kültüre edilmesi.....	25
Şekil 3.3.1. 1 Hemositometrede canlı hücre sayımı	26
Şekil 3.3.2. 1 6-kuyucuklu kültür kabında hücre sayımı için alan belirlenmesi	28
Şekil 4.1. 1 Yağ dokusundan izolasyondan 24 saat sonra MKH'ler (\rightarrow) ve çevrelerindeki eritrositler (\dashrightarrow) (X10).....	30
Şekil 4.1. 2 Primer ekspant kültürün 5.gününde MKH'lerin morfolojisi A) X10 B) X2031	
Şekil 4.1. 3 MKH'lerinin pasaj 1' den (P1) öncesi konfluent görüntüsü (X10)	32
Şekil 4.1. 4 Pasaj 1'de (P1) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10).....	32

Şekil 4.1. 5 Pasaj 2'de (P2) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)	33
Şekil 4.1. 6 Pasaj 3'de (P3) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)	33
Şekil 4.1. 7 Pasaj 4'de (P4) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)	34
Şekil 4.1. 8 Pasaj 5'de (P5) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)	34
Şekil 4.1. 9 Pasaj 6'da (P6) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)	35
Şekil 4.1. 10 Pasaj 7'de (P7) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)	35
Şekil 4.1. 11 Pasaj 8'de (P8) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)	36
Şekil 4.1. 12 Pasaj 9'da (P9) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)	36
Şekil 4.1. 13 Pasaj 10'da (P10) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)	37
Şekil 4.1. 14 A) P6'da MKH'lerin değişik morfolojik görüntüsü B) P7'de MKH'lerin değişik morfolojik görüntüsü (X20)	37
Şekil 4.1. 15 A) P8'de MKH'lerin değişik morfolojik görüntüsü B) P9'da MKH'lerin değişik morfolojik görüntüsü (X20)	38
Şekil 4.1. 16 P10'da MKH'lerin değişik morfolojik görüntüsü (X20)	38
Şekil 4.2.1. 1 Pasaj 1 (P1) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)	40
Şekil 4.2.1. 2 Pasaj 2 (P2) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)	41
Şekil 4.2.1. 3 Pasaj 3 (P3) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)	42
Şekil 4.2.1. 4 Pasaj 4 (P4) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)	43
Şekil 4.2.1. 5 Pasaj 5 (P5) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)	44
Şekil 4.2.1. 6 Pasaj 6 (P6) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)	45
Şekil 4.2.1. 7 Pasaj 7 (P7) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)	46
Şekil 4.2.1. 8 Pasaj 8 (P8) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)	47

Şekil 4.2.1. 9 Pasaj 9 (P9) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	48
Şekil 4.2.1. 10 Pasaj 10 (P10) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)	49
Şekil 4.2.1. 11 10 farklı pasajda CD13 yüzey antijeninin ifadesi (%).....	50
Şekil 4.2.2. 1 Pasaj 1 (P1) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	51
Şekil 4.2.2. 2 Pasaj 2 (P2) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	52
Şekil 4.2.2. 3 Pasaj 3 (P3) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	53
Şekil 4.2.2. 4 Pasaj 4 (P4) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	54
Şekil 4.2.2. 5 Pasaj 5 (P5) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	55
Şekil 4.2.2. 6 Pasaj 6 (P6) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	56
Şekil 4.2.2. 7 Pasaj 7 (P7) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	57
Şekil 4.2.2. 8 Pasaj 8 (P8) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	58
Şekil 4.2.2. 9 Pasaj 9 (P9) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	59
Şekil 4.2.2. 10 Pasaj 10 (P10) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)	60
Şekil 4.2.2. 11 10 farklı pasajda CD29 yüzey antijeninin ifadesi (%).....	61
Şekil 4.2.3. 1 Pasaj 1 (P1) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	62
Şekil 4.2.3. 2 Pasaj 2 (P2) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	63

Şekil 4.2.3. 3 Pasaj 3 (P3) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	64
Şekil 4.2.3. 4 Pasaj 4 (P4) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	65
Şekil 4.2.3. 5 Pasaj 5 (P5) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	66
Şekil 4.2.3. 6 Pasaj 6 (P6) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	67
Şekil 4.2.3. 7 Pasaj 7 (P7) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	68
Şekil 4.2.3. 8 Pasaj 8 (P8) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	69
Şekil 4.2.3. 9 Pasaj 9 (P9) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	70
Şekil 4.2.3. 10 Pasaj 10 (P10) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)	71
Şekil 4.2.3. 11 10 farklı pasajda CD54 yüzey antijeninin ifadesi (%)	72
Şekil 4.2.4. 1 Pasaj 1 (P1) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	73
Şekil 4.2.4. 2 Pasaj 2 (P2) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	74
Şekil 4.2.4. 3 Pasaj 3 (P3) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	75
Şekil 4.2.4. 4 Pasaj 4 (P4) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	76
Şekil 4.2.4. 5 Pasaj 5 (P5) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	77
Şekil 4.2.4. 6 Pasaj 6 (P6) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	78
Şekil 4.2.4. 7 Pasaj 7 (P7) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	79

Şekil 4.2.4. 8 Pasaj 8 (P8) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	80
Şekil 4.2.4. 9 Pasaj 9 (P9) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	81
Şekil 4.2.4. 10 Pasaj 10 (P10) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)	82
Şekil 4.2.4. 11 10 farklı pasajda CD90 yüzey antijeninin ifadesi (%)	83
Şekil 4.2.5. 1 Pasaj 1 (P1) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	84
Şekil 4.2.5. 2 Pasaj 2 (P2) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	85
Şekil 4.2.5. 3 Pasaj 3 (P3) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	86
Şekil 4.2.5. 4 Pasaj 4 (P4) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	87
Şekil 4.2.5. 5 Pasaj 5 (P5) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	88
Şekil 4.2.5. 6 Pasaj 6 (P6) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	89
Şekil 4.2.5. 7 Pasaj 7 (P7) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	90
Şekil 4.2.5. 8 Pasaj 8 (P8) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	91
Şekil 4.2.5. 9 Pasaj 9 (P9) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20).....	92
Şekil 4.2.5. 10 Pasaj 10 (P10) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)	93
Şekil 4.2.5. 11 10 farklı pasajda CD34 yüzey antijeninin ifadesi (%)	94
Şekil 4.2.5. 12 Bütün yüzey antijenlerinin ifadesi.....	95

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat derece

Kısaltmalar

µm	Mikrometre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
kg	Kilogram
nm	Nanometre
cm ²	Santimetrekare
rpm	Revolutions per minute
MKH	Mezenşimal Kök Hücreler
EKH	Embriyonik Kök Hücreler
IPSC	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
CD	Cluster of Differentiation
ISCT	Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği
M-CSF	Makrofaj Koloni Stimule Eden Faktör
G-CSF	Granulosit Koloni Stimule Eden Faktör
FIt-3	Fms-benzeri Tirozin Kinaz-3
SCF	Kök Hücre Faktör
BGF-R	Kemik Büyüme Faktör Reseptörü
PDGFR	Platelet Kökenli Büyüme Faktör Reseptörü
TGFβR	Dönüştürücü Büyüme Faktörü β Reseptörü
ICAM-1	İntraselüler Adezyon Molekülü-1
TNF-α	Tümör Nekroz Faktor Alpha
IL	İnterleukin

IFN- γ	İnterferon gamma
ECM	Ekstraselüler Matriks
FAK	Fokal Adezyon Kinaz
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FBS	Fetal Bovine Serum
DMEM / F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham's F12
DMSO	Dimetilsülfoksit
PBS	Phosphate Buffered Saline
IgG	İmmunoglobulin G
TR	Texas Red

1. GİRİŞ

Mezenşimal kök hücreler (MKH), hematopoietik grup dışında kemik, kıkırdak, yağ, kas ve endotel gibi farklı hücre tiplerine dönüşebilme, vücudun kendi hasarlarını tamir edebilme yeteneğine sahip, oldukça özgün hücrelerdir. Kemik iliği, periferik kan, kordon kanı ve yağ dokusu başlıca MKH kaynaklarıdır. Yağ dokusu, elde edilme kolaylığı ve çok sayıda MKH içermesi bakımından son yıllarda fazlaca ilgi çekmektedir. Yağ dokusundan elde edilen MKH'ler, birçok hastalığın tedavisi ve özellikle hasarlı dokunun yenilenmesi konularında hem prelinik hem de klinik araştırmalarda doku hasarlarının iyileştirilmesine yönelik olarak kullanılmaktadır. MKH'ler göç edebilme özellikleri ve dokuda hasarlı hücre ile füzyon yeteneği, çoğunlukla non-immunojenik özellikte olmaları ve salgıladıkları çeşitli faktörler sayesinde transplante edildiklerinde uygulama bölgesinde hasarlı dokunun iyileşmesine katkıda bulunmaktadır.

Çeşitli kaynaklardan izole edilen MKH'in karakterize edilmesi için farklı tipte hücre yüzey işaretleyicileri kullanılmakla birlikte, bu hücrelerin karakterizasyonunda hala tam olarak bir fikir birliğine varılabilmemiş değildir. Ancak bu konu ile ilgili olarak uluslararası komiteler, araştırmacılar arasında fikir birliğine varılabilmesi için temel bazı kriterler oluşturmaktadır.

Bu noktada kabul gören üç temel kriter vardır: MKH,

1. Plastik kültür yüzeylerine tutunabilmeli;
2. CD105, CD73 ve CD90 (+), ancak CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 ve HLA-DR (-) olmalı ve
3. *In vitro* koşullarda osteoblast, kondroblast ve adipositlere farklılaşabilmelidir.

Yağ dokusu MKH'leri de benzer özelliklere sahip ancak kemik iliği MKH'leri ile kıyaslandığında genetik olarak daha kararlı ve uzun süren kültürde daha az değişiklik gösteren hücrelerdir. Yapılan çalışmalar yağ dokusu MKH'lerinin de CD13, CD29, CD53, CD73 ve CD90 yüzey antijenleri için pozitif, CD34, CD45 antijenleri için ise

negatif özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. MKH'lerin sahip oldukları bu yüzey antijenleri aynı zamanda MKH'lerin farklılaşma potansiyelini de ifade etmektedir.

Ancak yapılan çalışmalar, sözü edilen bu yüzey antijenlerinin devam eden kültürde ve pasajlarda değişikliğe uğradığını göstermektedir. Uzun süreli kültürlerde ve devam eden pasajlarda bu yüzey antijenlerinin ifadesinde nasıl değişiklik olduğuna dair tam bir fikir birliğine varılabilmemiş değildir. Bu nedenle, yapılan bu çalışmada primer eksplant kültür yöntemi ile izole edilmiş ve 10. pasaja kadar çoğaltılmış olan hücreler, farklı yüzey antijenleri için immunofloresan boyama yöntemi kullanarak boyanmış ve farklı pasajlarda ifade edilme özellikleri ve morfolojileri incelenmiştir.

Sonuçlar, farklı pasajlarda *in vitro* ortamda MKH'lerin yüzey özelliklerinde değişiklik olabileceğini ve bu hücrelerin farklı pasajlarda bazı morfolojik değişikliklere sahip olabileceğini göstermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler

Farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline ve kendisini yenileyebilme gücüne sahip olan hücrelere kök hücre denir [1]. Kök hücre biyolojisinde en önemli özellik, kök hücrenin kendi kendini yenileyebilmesi ve bulunduğu dokudaki bir veya daha fazla hücre tipine farklılaşabilmesidir [2]. İnsan vücudunda kök hücreler, doku hasarlarının iyileşmesinde bir tamir mekanizması olarak görev almaktadır.

Kök hücreler yüksek plastisite göstermektedir. Kök hücre plastisitesi bir hücrenin köken aldıkları dokuların dışındaki dokulara da farklılaşabilme özelliğini tanımlamaktadır. Örneğin kemik iliği kök hücreleri kas hücrelerine, endotele ve hepatosit hücrelerine farklılaşabilmektedir [3].

Temelde kök hücre tanımını oluşturan prensipler şunlardır:

- Kendi kendini yenileyebilme yeteneği,
- Tek bir hücreden birden fazla hücre tipine farklılaşabilme,
- Belli bir dokunun *in vivo* fonksiyonu geri kazandırabilme.

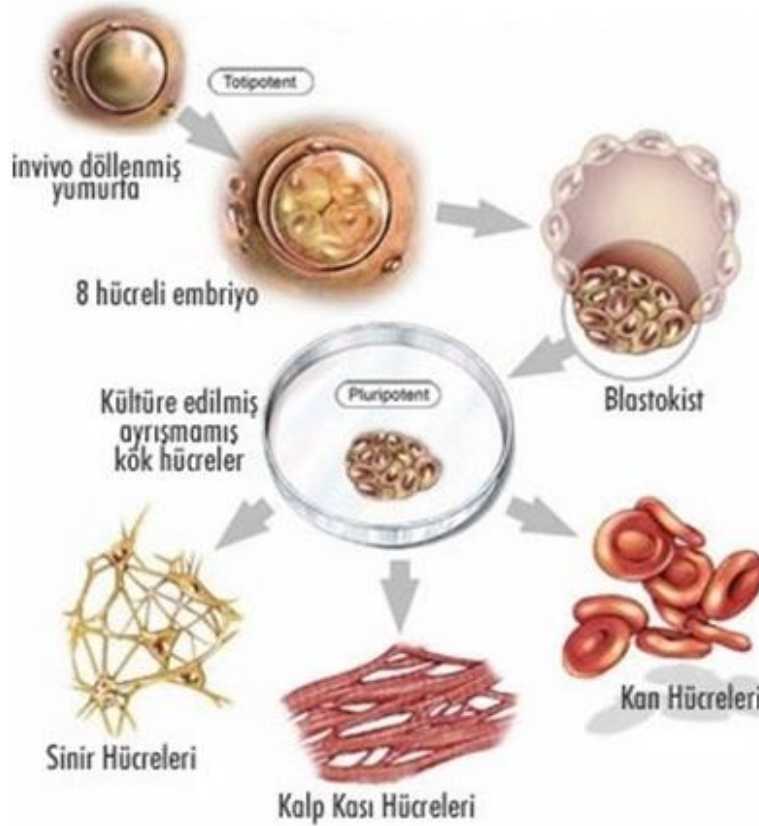
Kök hücreleri farklılaşma kapasitelerine göre gruplandırmak mümkündür. Zigottan oluşan hücreler bütün bir organizmayı oluşturabilecek özelliğe sahip hücrelerdir ve bunlara **totipotent** hücre denir. **Pluripotent** hücreler, embriyonun blastosist evresinde iç hücre kitlesinden meydana gelir ve embriyonik dönemde farklı doku hücrelerine (endoderm, mezoderm, ektoderm) dönüşebilme yeteneğine sahip hücrelerdir. **Multipotent** hücreler ise sadece sınırlı sayıda hücre tipine farklılaşabilen yetişkin kök hücreleridir [4].

Diğer bir deyişe göre kök hücreler, gelişim evresine göre embriyonik kök hücreler (EKH) ve yetişkin kök hücreler olmak üzere sınıflandırılabilir [1][4]. Bir de indüklenmiş pluripotent kök hücre (IPSC) tanımından bahsetmek mümkündür. IPSC, organizmada doğal olarak bulunmayan ancak *in vitro* şartlarda uyarı sonucu meydana getirilen ve pluripotent özellik kazandırılan hücrelerdir [1][5][6].

2.1.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler blastosist denilen embriyonun 4-5 günlük iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent hücrelerdir [4]. Pluripotent özelliğe sahip bir kök hücre kendini yenileme özelliğine sahiptir ve pek çok vücut hücresine dönüşebilir (Şekil 2.1.1.1). Embriyonik kök hücreler kültür ortamında kök hücre özelliğini kaybetmeden canlılığını korur ve kendini yenileyebilir. Bu hücreler dondurulabilir ve araştırmalarda tekrar tekrar kullanılabilir. Ancak bu özellikleri EKH'leri klinik uygulamalar için çok başarılı bir kaynak yapmaz. Çünkü sınırsız bölünme potansiyelleri nedeniyle uygulandıkları doku bölgesinde tümör oluşumuna neden olabilir.

EKH'ler dondurulup defalarca kullanabilme özelliğinden dolayı doğal bir hücre hattıdır. Bu nedenle, embriyogenez araştırmaları ve genetik hastalıkların mekanizmalarının araştırması için iyi bir kaynaktır.

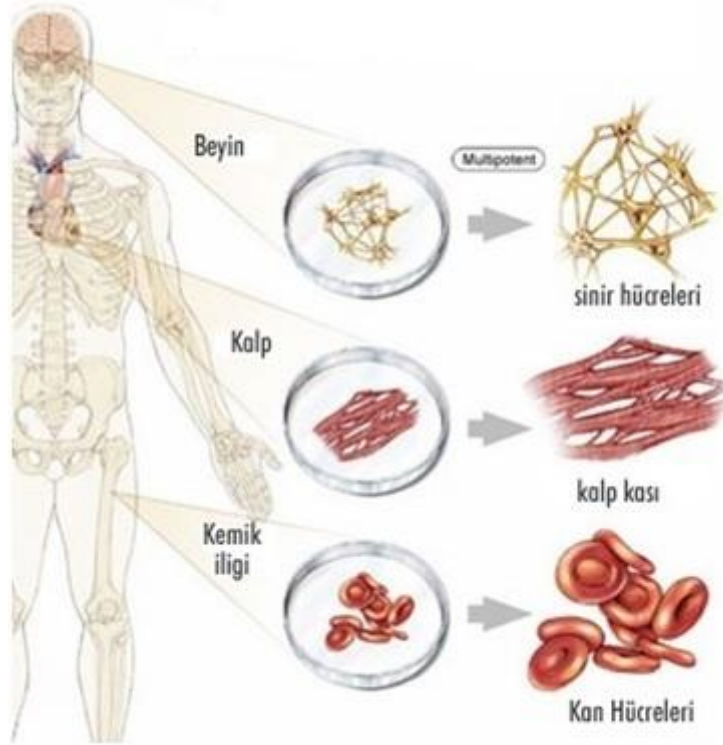


Şekil 2.1.1. 1 Pluripotent özellikteki embriyonik kök hücreler

2.1.2. Yetişkin Kök Hücreler

Yetişkin kök hücreler, somatik kök hücreler olarak da adlandırılır. Yetişkin kök hücreler, mezenşimal kök hücreler gibi yetişkin dokulardan kök alır. Bu hücreler genellikle buldukları dokuların yenilenmesinde ve homeostazında görev alır [1]. Yetişkin kök hücreler multipotenttir ve elde edildikleri doku kaynağını temsil ederler (Şekil 2.1.2.1). Antiinflamatuvar özellikte olan yetişkin kök hücreler, doku hasarının tamirinde rol oynamaktadır. Ancak *in vitro* şartlarda sınırlı bir farklılaşma potansiyeline sahiptir. Yetişkin kök hücreler otolog olarak kullanılabilirler. Yetişkin kök hücreler plasenta da dahil olmak üzere kemik iliği, periferik kan, diş pulpası, yağ doku, sindirim sistemi ve beyin gibi birçok farklı kaynaktan izole edilebilir [1].

Kemik iliği ve yağ dokusu iyi birer yetişkin kök hücre kaynağıdır. Bu hücreler salgıladıkları faktörler sayesinde hasarlı doku bölgesinde iyileşmeye katkı sağlamaktadır.



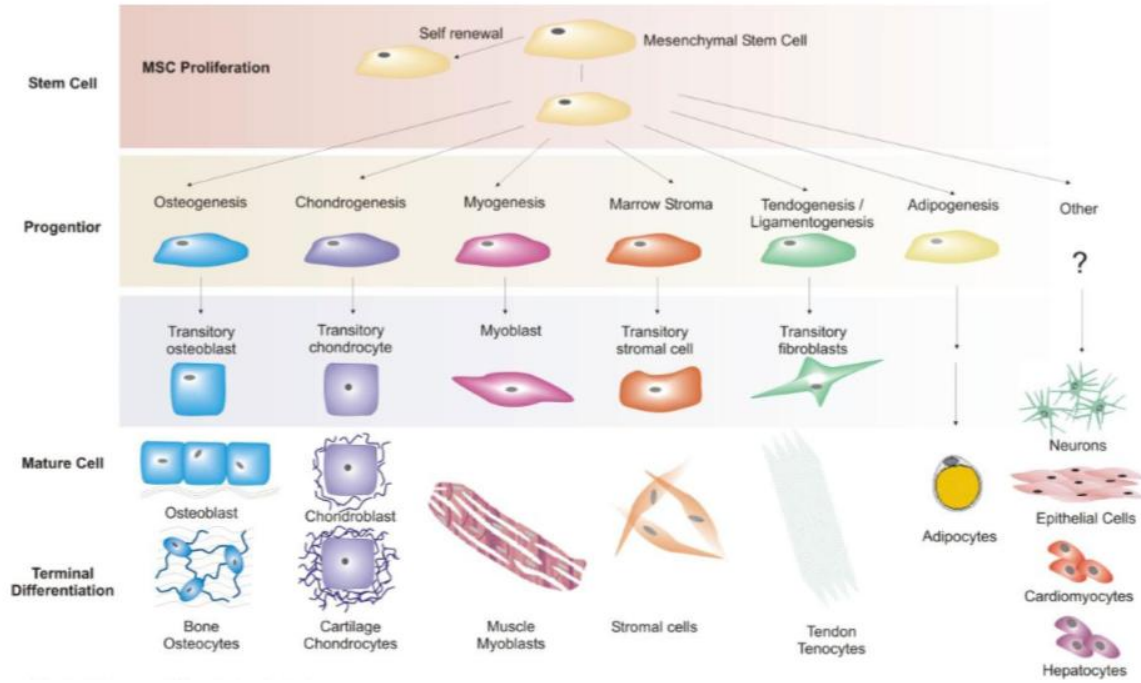
Şekil 2.1.2. 1 Multipotent kök hücreler

2.2. Mezenşimal Kök Hücreler (MKH)

Mezenşimal kök hücreleri yetişkin kök hücre tiplerinden biridir. MKH'ler kendini yenileyebilen ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen multipotent stromal hücreler olarak tanımlanır [7]. Bu hücrelerin kültürü esnasında, hem kök hücre hem de diğer hücre tiplerinden oluşan heterojen bir hücre popülasyonuna rastlanır [7].

MKH'ler hem hücresel tedavi hem de doku yenilenmesi konularındaki kullanımı dolayısıyla son zamanlarda çok önem kazanmıştır. Güvenilirliği ve kültür ortamında uzun süre kültüre edilebilmesi sebebi ile *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Bu hücrelerin izolasyonunun ve kültürünün kolay olması ayrıca yüksek *ex vivo* potansiyelinin olması bu hücreleri tedavi edici bir araç haline getirmektedir. MKH'ler neredeyse tüm yetişkin organlarda bulunur. Bu hücreler kolayca izole edilip, milyonlarca hücreye kadar çoğaltılabilir.

MKH'ler hematopietik grup dışında kemik, kıkırdak, yağ, ligament ve tendon gibi hücrelere farklılaşma yeteneğine sahiptir (Şekil 2.2.1).



Şekil 2.2. 1 Mezenşimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri [8]

MKH'ler hematopoietik olmayan stromal hücreler olup bağ doku kökenli olmaları nedeniyle başta bağ doku kökenli hücreler (kemik, kıkırdak, yağ, ligament ve tendon) olmak üzere bir çok farklı tipte hücreye (kalp, karaciğer, pankreas, sinir sistemi hücreleri) farklılaşabilme yeteneğine sahiptir [7][8].

MKH'ler göç edebilme özellikleri ve dokuda hasarlı hücre ile füzyon yeteneği ve çoğunlukla non-immunojenik özellikte olmaları ve salgıladıkları çeşitli faktörler sayesinde transplante edildiklerinde uygulama bölgesinde hasarlı dokunun iyileşmesine katkıda bulunurlar [9].

2.2.1 Mezenşimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Mezenşimal kök hücreler ilk kez 1968 yılında Fridenstein tarafından tanımlanmışlardır. Fridenstein, yapılan kemik iliği kültürlerinde hematopoietik olmayan, adezyon yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bunların kemik ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir [7]. Yıllar sonra yapılan çalışmalarda bu hücrelerin hematopoietik özellikte olmayan multipotent kök hücreler olduğu ve farklı hücrelere dönüşebilme yeteneklerinin olduğu gösterilmiştir.

Mezenşimal kök hücrelerini tanımlayabilmek için üç temel kriter vardır:

- Kültür kabının yüzeyine tutunabilme özelliğine sahip olmalı
- Yüzeylerinde spesifik yüzey antijenlerini ifade edebilmeli
- *In vitro* koşullarda osteoblast, kondroblast ve adipositlere farklılaşabilmeli.

İlk kez 1999 yılında, Pittenger ve arkadaşları MKH'lerin sahip oldukları yüzey antijenlerini tanımlayarak bu hücreleri karakterize etmişlerdir [10]. Bu hücreler, birçok farklılaşma kümesi molekülleri için pozitif ya da negatif olabilir. Farklılaşma kümeleri (Cluster of Differentiation, CD) sistemi, monoklonal antikolarla tanımlanan lökosit antijenlerinin isimlendirilmesinde kullanılan sistematik bir yaklaşımdır [11].

CD adlandırması hem insan lökosit antijenleri hem de fare ve sıçanlardaki homologları için kullanılır. CD molekülleri, reseptör olarak ya da ligand olarak hareket

edebilir. Bazı CD proteinleri ise hücre sinyal yollarında hücre adezyon molekülü olarak görev alır.

CD sistemi immünofenotiplenmede hücre belirteci olarak kullanılır. Bu şekilde hücreler yüzeylerinde bulunan, kendilerine özgü CD moleküllerine göre tanımlanır. Bahsedilen bu CD molekülleri aynı zamanda mezenşimal kök hücrelerin karakterizasyonunda da kullanılmaktadır [12][13][14].

Yüzey antijenleri MKH'in karışık hücre popülasyonundan ve hematopoietik gruptan ayrılması için önemlidir. MKH'ler çok çeşitli yüzey antijenlerini ifade etmekle birlikte Uluslararası Hücresel Tedavi Derneğinin (ISCT) fikir birliğine vardığı yüzey antijenleri CD73, CD90, CD105 pozitif ve CD14, CD34, CD45, CD19 ve HLA-DR negatiftir [10][12][14].

MKH'ler *in vitro* koşullarda birçok hücre tipine, başta adiposit, osteoblast, kondrosit, miyosit, hepatosit, sinir hücreleri, endotel ve epitel hücrelerine dönüşebilme yeteneğine sahiptir [7][12][15].

MKH'ler non-hematopoietik stromal hücreler olarak; kemik, kıkırdak, kas, bağ doku, tendon ve yağ doku yenilenmesinde katkıda bulunurlar. MKH'lerin karakterizasyonunun yapılabilmesi için yukarıda belirtilen üç temel kriter takip edilmelidir. Yanı sıra bu hücrelerin karakterize edilebilmesi için ekstraselüler matriks reseptörleri ve büyüme faktörleri gibi birçok hücre belirteçleri kullanılmaktadır [16].

MKH'lerin önemli bir özelliği hasarlı bölgeye mobilize olabilmeleridir. Bu hücreler hasarlı bölgeye göç edebilme ve o dokuya yerleşme kapasitesine sahiptirler [15]. Bu yerleşmede kimokin, sitokin ve yüzeydeki reseptörler önemli rol oynar.

2.2.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin Kaynakları

İlk çalışmalarda MKH'ler sadece kemik iliğinden izole edilmiştir [7]. Fakat günümüzde MKH'ler, yağ dokusu, deri, diş, periferik kan, umbikal kord kanı, ve sert dokularda; karaciğer, dalak, akciğer gibi neredeyse tüm erişkin dokulardan temin edilebilir [17][18][19][20]. Bu hücreler aynı zamanda plasenta ve amniotik sıvıdan da izole edilebilir [7][15].

Yapılan çalışmalara göre MKH'ler kıkırdak dokudan da elde edilebilmektedir ve MKH'lerin temel kriterlerinden olan yüksek proliferasyon oranı, multipotent yapı ve benzer MKH'lerin belirteci fenotipini göstermektedir [13].

Bahsedilen MKH'lerin kaynakları olan kemik iliği, kıkırdak ve yağ doku farklı hücre tiplerine farklılaşması, bu üç kaynak da osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyeline sahiptirler. Yüzey belirteçlerinin ifadesinde değişiklikler görülebilmektedir [13].

İnsan plasentasından elde edilen MKH'ler, kemik iliğinden elde edilen MKH'lere oranla daha yüksek çoğalma ve kültüre edilme kapasitesine sahiptir [21]. Amniotik sıvı MKH'lerinin de yüksek hücresel plastisitesi ve farklılaşma özelliği vardır [22].

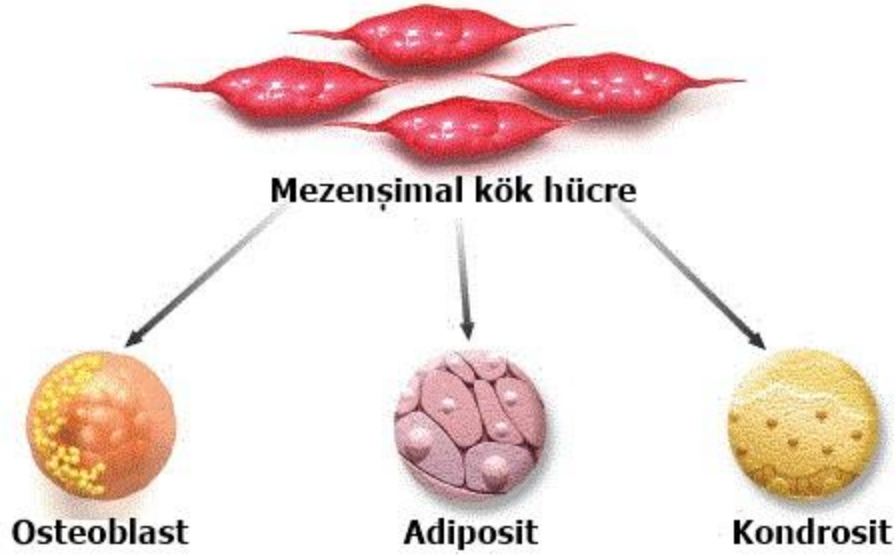
Farklı dokulardan izole edilmiş MKH'ler morfolojik olarak benzerlik gösterirler ve bu hücrelerin üzerinde bulunan ve ortak olarak kullanılan yüzey belirteçlerinin ifadesinde farklılık görülmemiştir [23].

MKH'ler, kemik iliğinde ve diğer dokularda sadece çok az miktarda bulunmaktadır. Kemik iliğinde tüm kemik iliği hücrelerinin 0.0001%-0.01'lık kısmını oluşturmaktadır [14]. Bu hücreler üzerine yapılan geniş çalışmalar esnasında diğer kaynakların da araştırılması gerektiği anlaşılmıştır. Yağ doku için her bir gram yağda 100.000 mezenşimal kök hücre bulundurmaktadır [15].

Kemik iliğine kıyasla yağ dokudan MKH'leri toplanırken, acı vermeden daha fazla miktarda elde edilmesi mümkündür. Bu nedenle yağ dokunun, MKH'ler için çok iyi bir kaynak olduğu farkedilmiştir. Yağ doku kolay ulaşılabilir, güvenilir, fazla miktarda yetişkin kök hücre izole edilebilen bir kaynaktır. Bu nedenle, doku yenilenmesi amacıyla yapılan uygulamalarda sıkça tercih edilmektedir. Farklı hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, yağ doku MKH'lerinin immün baskılayıcı olarak ve aynı zamanda farklı doku hasarların tedavisinde kullanılmaktadır [15].

2.3. Yağ Doku Kökenli Mezenşimal Kök Hücreler

Kemik iliği gibi yağ doku da mezodermden türemiş bir organdır. Yağ doku MKH'leri, elde edilmesi kolay ve bir seferde bol miktarda doku izole edilebileceği için alternatif bir kaynak olarak kabul edilmektedir. Bu hücreler de adipojenik, osteojenik, kondrojenik, nörojenik ve miyojenik farklılaşma yeteneğine sahiptir (Şekil 2.3.1) [24].



Şekil 2.3. 1 Yağ doku kökenli mezenşimal kök hücrelerinin farklılaşma potansiyeli

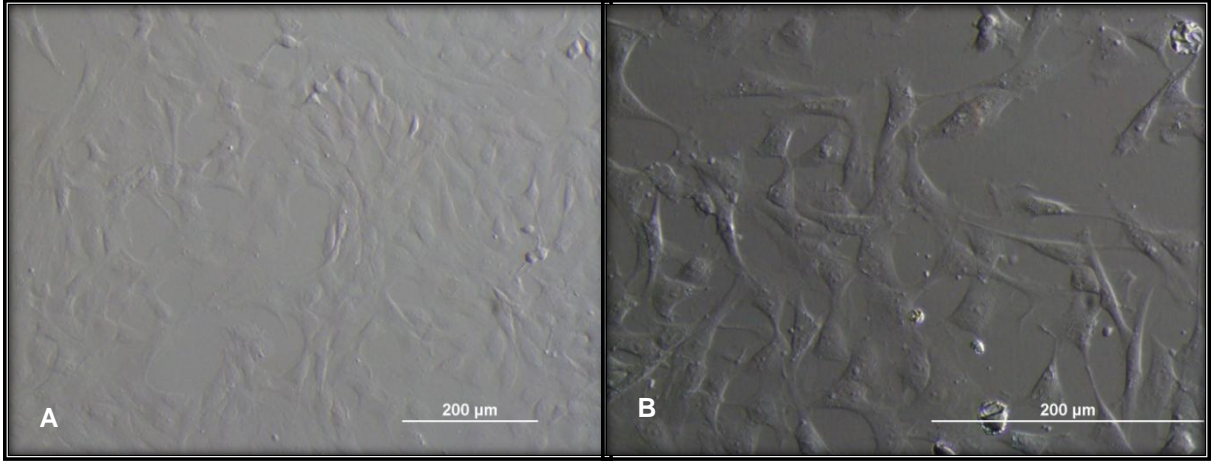
Yağ doku kök hücrelerinin immun cevap oluşturma olasılığı daha düşük ve uzun dönemde kültür koşullarında genetik olarak daha stabildir [24][25]. Güvenirliliği ve etkinliği yağ doku MKH'nin klinik olarak uygulanabilirliğini de mümkün olmaktadır.

Uluslararası Yağ Uygulamaları Teknolojileri Topluluğu (International Fat Applied Technology Society) "yağ doku kök hücreleri" kavramını, yağ dokudan elde edilen, plastik kültür kabının yüzeyine tutunan, seri olarak pasajlanan ve multipotent özellik gösteren hücre popülasyonu şeklinde tanımlar [14][26].

Sağlıklı ve yetişkin bir bireyin toplam vücut ağırlığının %10-15'i yağ doku olup; bu dokunun yaklaşık yarısı cilt altında, geri kalanı da omentum, mezenter ve iç organlar arasında yer alır. Cilt altı yağ doku aynı zamanda iyi bir MKH'lerin kaynağıdır.

Birçok çalışmaların sonuçlarına göre, kök hücre popülasyonu perivasküler lokasyonda, perisit ve endotel hücreler ile beraber bulunmaktadır [7][26].

MKH'ler pasajlama sırasında fibroblastik morfoloji göstermeye devam ederken (Şekil 2.3.2) yüzey özellikleri kısmen değişerek, farklılaşma gösterebilmektedirler.



Şekil 2.3. 2 P1'de yağ dokusu kökenli mezenşimal kök hücrelerin fibroblast morfolojisi A) X10 B) X20

Yağ dokusu kökenli mezenşimal kök hücreler tüm yüzey belirteç ifadelerini göstermez. Bu hücrelerin fenotipik karakterlerine bakıldığında, CD29, CD90, CD73, CD44, CD105, CD13, CD54, CD146 ve HLA-ABC için pozitif, hematopoetik ve endotel hücrelerin belirteçleri olan CD45, CD34, CD133 ve HLA-DR için ise negatif ifade göstermektedir [12][27][28]. Adipoz doku kökenli mezenşimal kök hücreler aynı zamanda kemik iliği kök hücrelerin ile karşılaştırıldığında, CD36 için pozitif ve CD106 için negatif ifade gösterir [29].

Bu hücreler deri altında (subcutaneous) ya da karın bölgesinde bulunan yağdan (abdominal) izole edilebilir. Ong ve ark. 2014 yılında yaptığı çalışmada, CD10'un ifadesi, deri altından alınan yağ dokusunda sıkça görüldüğünü, aynı zamanda CD200 yüzey antijeninin ifadesi abdominal yağdan izole edilen yağ kök hücrelerinin üzerinde daha çok görüldüğünü tespit etmiştir [30]. Farklı çalışmalar göstermektedir ki; karakterize edilmiş ve immunofenotip özelliklerine göre karşılaştırılmış, kültüre edilmiş

adipoz kök hücrelerinin ilk ve ileri pasajlardaki yüzey özelliklerinde değişiklikler olmaktadır [7] [27].

2.3.1. Yağ Dokusu Kökenli Mezenşimal Kök Hücrelerin Yüzey Özellikleri ve Karakterizasyonu

Yağ dokusu MKH'leri, kemik iliği MKH'lerine benzer birçok yüzey antijenini ifade ederler ve ISCT' nin belirlediği gibi ortak yüzey antijenleri vardır (Çizelge 2.3.1.1). Ancak bazı özellikleri bakımından çok ufak farklılıklar gösterirler. Örneğin kemik iliği kök hücreleri CD49d'yi çok az ifade ederken, yağ dokusu kök hücreleri tarafından çok daha fazla miktarda ifade edilir. CD106 ise yağ dokusu kökenli MKH'ler tarafından çok az ifade edilirken, kemik iliği kök hücreleri çok daha fazla ifade eder. Bununla birlikte kabul görmüş sonuç bu hücrelerin CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 ve MHC Class I için pozitif, CD34, CD45, CD31 için ise negatif özellik gösterdiğiidir.

Çizelge 2.3.1. 1 Mezenşimal kök hücrelerin yüzey antijenleri			
Pozitif yüzey antijenleri		Negatif yüzey antijenleri	
CD13	CD63	CD11	CD34
CD29	CD71	CD11b	CD45
CD44	CD73	CD14	CD106
CD49a	CD90	CD31	CD117
CD54	CD105	CD33	CD133

Mezenşimal kök hücrelerin karakterizasyonunda hücre yüzey işaretleyicilerinin yanısıra sitokin ve çeşitli büyüme faktörleri reseptörleri ile ekstrasellüler matriks reseptörleri de kullanılabilir (Çizelge 2.3.1.2) [16][31][32].

Mezenşimal kök hücreler, makrofaj koloni stimule eden faktör (M-CSF), granulosit koloni stimule eden faktör (G-CSF), fms-benzeri tirozin kinaz-3 (Flt-3) ligand, kök hücre faktörü (SCF) gibi sitokinler, kimokinler ve büyüme faktörlerini üretir. Ayrıca, IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R sitokin reseptörlerini ifade eder. Kemik büyüme faktör reseptörü (BGF-R), platelet kökenli büyüme faktör reseptörü (PDGFR) ve

dönüştürücü büyüme faktörü beta reseptörü (TGF β R) gibi büyüme faktörü reseptörlerinin MKH'lerin farklılaşmalarında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [31].

Sitokinler tarafından uyarılmış olan mezenşimal kök hücreler, CXCL9, CXCL10 ve CXCL11 gibi lökosit kimokinlerini yüksek düzeyde ifade eder. Doku yenilenmesi ya da doku hasarının tamir edilmesi sırasında hasarlı bölgeye mezenşimal hücrelerin göç etmesi sırasında CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5 ve CCR10 gibi bazı kimokin reseptörlerinin rol oynadığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [16].

Çizelge 2.3.1. 2 Mezenşimal kök hücrelerde yaygın olarak ifade edilen yüzey işaretleyiciler

Yüzey antijenleri	CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, Stro-1, Sco-1
Kimokin reseptörleri	CCR1, CCR2, CCR4, CCR6, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CXCR5
Sitokin reseptörleri	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R
Ekstrasellülmatriks reseptörleri	ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM, endoglin, hyaluronon, integrinler: α_1 , α_2 , α_3 , α_A , α_V , β_1 , β_2 , β_3 , β_4
Büyüme faktörü reseptörleri	BGF-R, PDGF-R
Diğer reseptörler	Thy-1, IFN- α R, TGF- β R, TNF-R

Bu tez çalışmasında yağ dokusundan izole edilen mezenşimal kök hücrelerin karakterizasyonu için CD13, CD29, CD54, CD90 ve CD34 yüzey antijenleri kullanılmıştır.

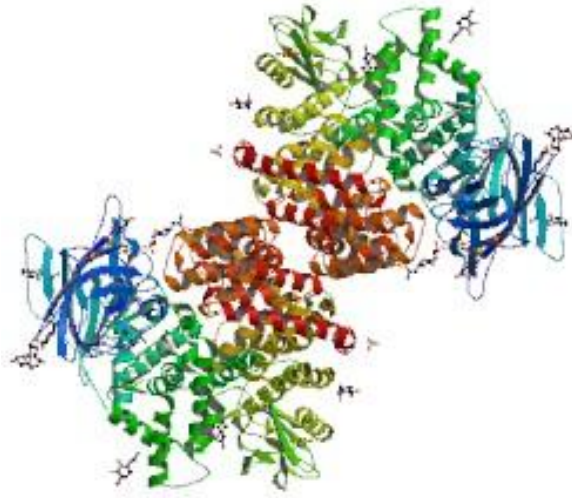
2.3.1.1. CD 13 (Aminopeptidaz N)

Aminopeptidaz N, 967 amino asit içeren bir integral II tip çinkoya bağlanan bir metalloproteazdır (Şekil 2.3.1.1.1) [33]. CD13 ifadesi, embriyonik ve çeşitli kaynaklardan izole edilen yetişkin kök hücrelerin yüzeylerinde görülmektedir.

CD13 bir ubikutin enzimidir ve insanda endotel, epitel, fibroblast, lökosit gibi hücre tiplerinde ve bir çok dokuda görülmektedir. Farklı hücre tiplerinde regülatör peptitlerin metabolizmalarına katılabilmektedir [33][34].

Hem enzime bağlı hem de bağı olmayan bu multifonksiyonel protein, bağışıklık sistemi fonksiyonları ve hücre proliferasyonu, sekresyonu, adezyonu, migrasyonu, anjiyogenez, inflamasyon hareketleri, antijen sunumu ve endositoz gibi temel biyolojik olaylara etki eder [33][34].

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda CD13'ün, MKH'lerin adezyonunda, migrasyonunda ve vasküler ağın formasyonunda büyük bir rol oynadığı görülmüştür [34].

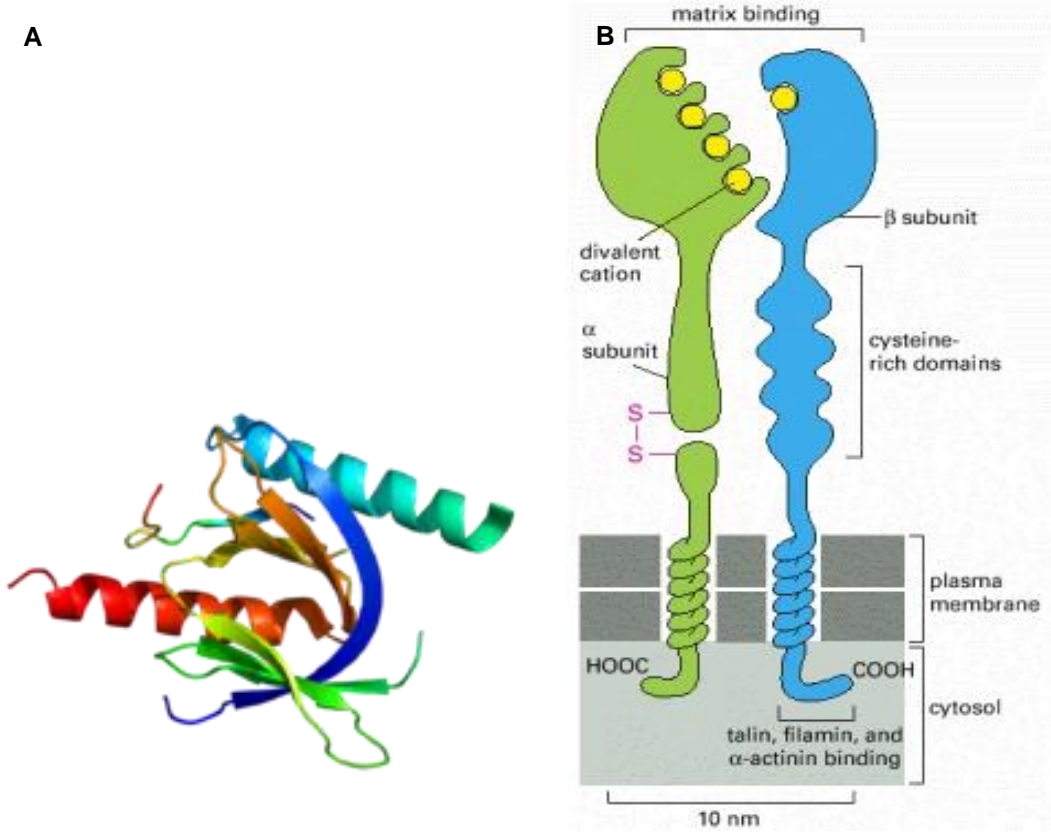


Şekil 2.3.1.1. 1 İnsan Aminopeptidaz N (CD13) proteini [35]

2.3.1.2. CD 29 (İntegrin β 1)

İnsan MKH'leri yüzeylerinde α 1, α 2, α 3, α 4, α 5 ve β 1, β 3, β 4 gibi farklı integrin moleküller bulunmaktadır [9]. Bu moleküllerden biri olan CD29 aynı zamanda integrin β 1 olarak da adlandırılır ve *in vivo* ortamda MKH'lerin migrasyonunda işlev görür [36]. İntegrinler hücre adezyonuna yardım eden bir hücre yüzey protein ailesidir. İntegrinler temel yapı olarak membranda bulunurlar ve glikoprotein yapısındadır (Şekil

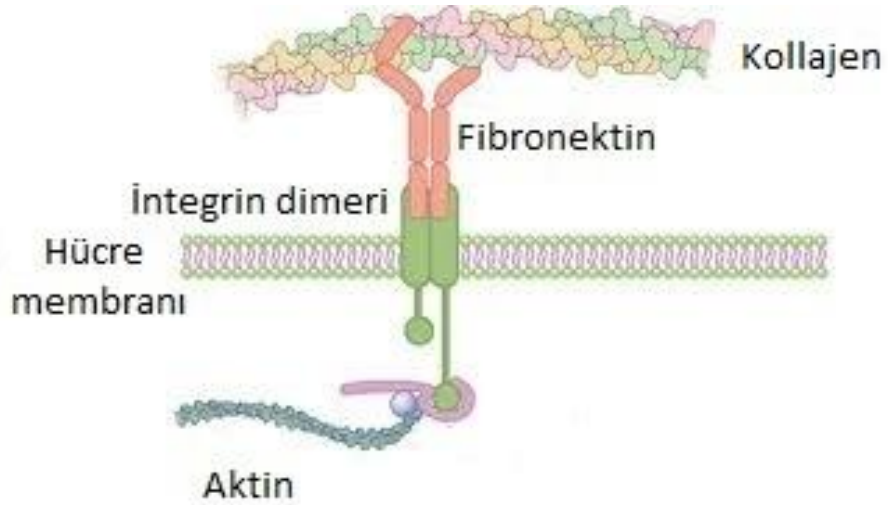
2.3.1.2.1A). İntegrinlerin moleküler yapıları α ve β olmak üzere iki altüniteden oluşmaktadır [37] (Şekil 2.3.1.2.1B).



Şekil 2.3.1.2. 1 A) İntegrinin temel yapısı B) İntegrinin moleküler yapısı α ve β altüniteler [37] [38].

16 α ve 8 β altünitelerinin heterodimerizasyonu sonucunda 20 farklı integrin reseptör oluşturur [39]. Bu integrin reseptörlerin çoğu ekstrasellüler matriksler üzerinde bulunan fibronektin, kollajen ve vitronektin gibi ligandlara bağlanır (Şekil 2.3.1.2.2). Bazı integrinler çözünebilen fibrinojen gibi ligandlara bağlanabilir ya da komşu hücrelerin intrasellüler adezyon molekülleri gibi reseptörlerine bağlanır.

Hücre adezyonunda ve hücre iskeletinin organizasyonun yanı sıra, integrinler sinyal reseptörleri olarak da fonksiyon üstlenir. CD29 hücre büyümesinde, farklılaşmasında, migrasyonunda ve apoptozunda önemli rol oynar [7][36][40].



Şekil 2.3.1.2. 2 İntegrin reseptörlerinin ekstrasellüler matriksler üzerinde bulunan fibronektin ve kolajen ligandlara bağlanması [41]

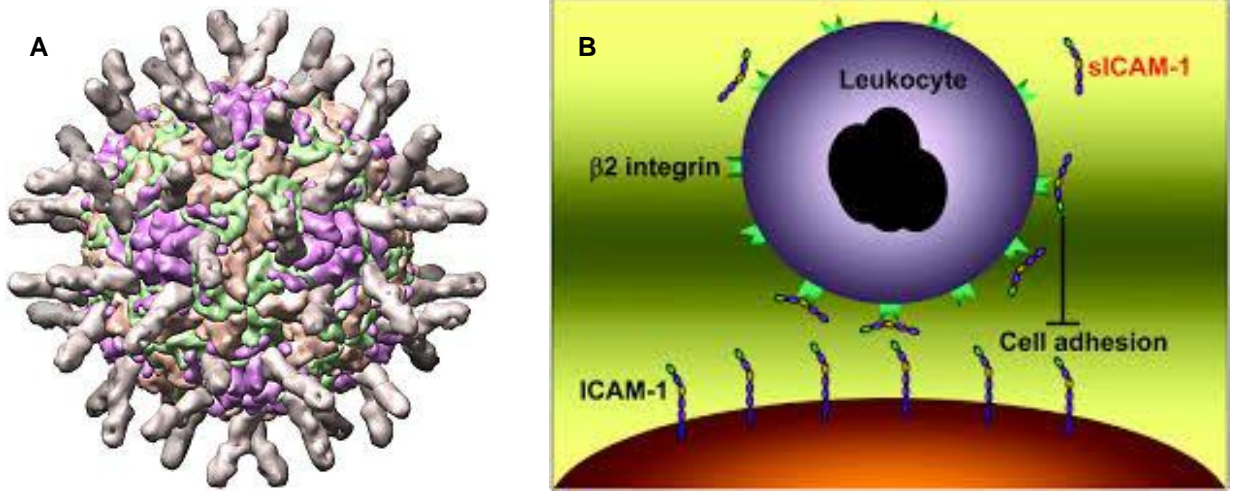
Kendini yenileyebilen, multipotent ve migrasyona sahip MKH'ler temel regülatör olarak homeostazda ve birçok yenilenme işlemlerinde görev alır. Migrasyon yeteneği, bu hücrelerin hasarlı bölgeye hareket etme ve hasarlı bölgeye yerleşme aktivitesidir. Bazı araştırmalar, MKH'lerin migrasyonunun CD73 / CD29 yüzey antijenlerinin kontrolünde gerçekleştiğini göstermektedir. MKH'lerin CD73 ve CD29 yüzey antijenlerinin ifadelerinin fonksiyonel seviyede azalması durumunda MKH'lerin migrasyonu azalır [42].

2.3.1.3. CD 54 (intraselüler adezyon molekülü-1)

Hücre adezyonunda, göçünde ve transmigrasyonunda görev aldığı bilinen birçok molekül vardır [9]. Bu moleküller MKH'lerin de yüzeylerinde bulunur. CD54 aynı zamanda intraselüler adezyon molekülü (ICAM-1) olarak adlandırılan ve immunoglobulin ailesinden gelen bir integral membran proteindir (Şekil 2.3.1.3.1A). Bu protein $\beta 2 \alpha 1$ ve $\beta 2 \alpha M$ gibi integrinleri tanır (Şekil 2.3.1.2.1B). İntraselüler adezyon molekülü genel olarak endotel ve lökosit ilişkili bir transmembran proteindir ve bu protein hücrelerin arasında hücre etkileşimini stabilize etmede ve transmigrasyonunda önemli bir görev almaktadır [43][44].

Lenfosit, fibroblast, keratinosit, epitel, T ve B hücreleri ve bir çok başka hücre tipleri CD54 antijeni ifade eder. T hücrelerin, T ve B hücrelerle etkileşimlerde önemli rol oynadığı gösterilmiştir [45]. Enfeksiyon bölgesine lökositleri ve aynı dokulara MKH'lerin migrasyonunun karşılaştırılması açısından iyi bir örnektir [39]. MKH'ler T lenfosit aktivasyonu ve alloreaktif reaksiyonları önlerler. Bunun yanında aktive B lenfositleri de inhibe eder, regülatör T hücreleri uyarırlar. MKH'lerin hayvan ve insanlarda lenfosit proliferasyonunu engelleyerek immunosüpresif etki gösterdiği bildirilmiştir [46].

Yapılan çalışmalara göre MKH'de bulunan ICAM-1 molekülü, bu hücrelerin endoteliuma tutunmada fonksiyonel öneme sahiptir [9]. Bunun yanı sıra ICAM-1 molekülü, MKH aracılı immunosüpresyonda kritik bir rol üstlenir [43][44].



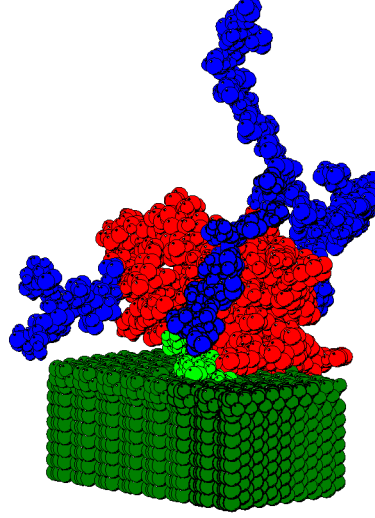
Şekil 2.3.1.3. 1 A) ICAM-1 temel yapısı B) ICAM-1'in β2 integrinleri tanınması [47]

2.3.1.4. CD 90 (Thy-1)

Glikozilfosfatidilinozitol bağlı bir protein olan CD90 aynı zamanda Thy-1 olarak da bilinir (Şekil 2.3.1.4.1). CD90, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşiminde görev alır [48]. CD90 ifadesi türler arasında değişiklik gösterir, ama şimdiye kadar endotel hücrelerde, hematopoietik kök hücrelerde, lenfositlerde, fibroblast hücrelerinde, sinir

hücrelerinde tanımlanmıştır ve aynı zamanda MKH'lerin yüzeyinde pozitif olarak tanımlanır [12][48].

CD90 ilk defa T hücrelerin yüzeyinde tespit edildi. CD90 T hücrelerin aktivasyonunu teşvik eder, hücre adezyonunda, migrasyonunda, inflamasyonunda, ölümünde ve tümör gelişiminde görev alır [48].



Şekil 2.3.1.4. 1 Thy-1 (CD90) membrana bağlanması; Glikozilfosfatidilinozitol anchor (GPI-açık yeşil) [49] [50]

2.3.1.5. CD 34

CD34 transmembran bir glikoproteindir ve lenfematopoetik kök ve progenitör hücrelerinin, endotel, embriyonik fibroblast hücrelerinin, fetal ve yetişkin sinir dokularından oluşan hücrelerin yüzeylerinde ifade edilir [48]. CD34'ün fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, yapılan çalışmalara göre bu molekülün hücresel mikroçevreye göre hem tutunma hem de anti-tutunma özellikleri görülmektedir [51]. CD34'ün, hücre proliferasyonu desteklediği, farklılaşmayı bloke ettiğini bildirilmiştir. Aynı zamanda, hematopoietik hücrelerin hareketleri ve migrasyonu da arttırmaktadır [52]. CD34, MKH'ler için negatif bir belirteç olarak önerilmiştir [12][27][28].

2. 4. Hücre Kültüründe Pasajlama

Kültürde hücrelerin proliferasyonu sonucu sayıların artması, buna bağlı olarak besin kullanılması atık maddelerin miktarının artması ve istenmeyen ürünlerin oluşması nedeniyle hücreler aynı ortamda sonsuza kadar kültüre edilemez. Bu nedenle hücre popülasyonunu yeni bir kültür ortamına transfer etmek gerekir. Bu işlem, hücre pasajlanması olarak adlandırılır. Hücre pasajlaması genel olarak yaşam süresini uzatmak ya da kültür ortamındaki hücre sayısını artırmak için kullanılır.

Hücre pasajlanması, asıl hücre kültürüne göre daha düşük yoğunlukta hücreler elde etmek için kullanılır. Yeni kültür ortamında taze besiyeri hücrelerin ölüm riski olmadan çoğalmasını sağlar [53]. Hücre süspansiyonu kültür flasklarına bölünerek daha düşük yoğunlukta hücreler elde edilir ve bu kültür sekonder kültür olarak tanımlanır. Daha sonra sekonder kültürdeki hücreler tekrar çoğaltılarak üçüncül hücre kültürü elde edilmesi mümkündür [53]. Bu şekilde hücrelerin de özelliklerine göre pasajlama devam edebilir.

Hücre kültür ortamına ekilen hücreler çoğalarak kültür kabı zeminini tamamen kapladığında hem besleyici sıvılar hücreler için yetersiz hale gelir, hem de kültür kabında yer olmadığı için hücrelerin çoğalmaları durur ve hücreler ölmeye başlar. Bu durumda pasajlama işlemi ile hücrelere zarar vermeden yüzeyden kaldırılması ve yeni ortama transfer edilmesi gerekmektedir. Hücreler tutundukları yüzeyden mekanik veya enzimatik yollarla ayrılır.

Mekanik yöntemin çabuk olmasının yanı sıra hücrelerin spatül ile kaldırılmasında zarar görmesi tehlikesi olduğu için, enzimatik yöntemler tercih edilir. Bu yöntemde pasajlama işlemi çeşitli proteolitik enzimler kullanarak yapılır. En yaygın kullanılan proteolitik enzimler tripsin, kolajenaz ve pronazdır. Hücreler plastik yüzeye tutunabilmek için çeşitli proteinleri ve adezyon molekülerini ifade eder. Tripsin ve diğer proteolitik enzimler bu hücrelere bağlanır ve proteinlerin bağlarını kopartarak, hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrılmasını sağlar. Tripsin çoğu zamanda EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) ile kombine kullanılır. Tripsin yardımıyla hücrelerin birbiriyle ve kültür kabının yüzeyi ile olan etkileşimi koparılır ve tek hücre olarak

süspanse şekilde toplanır. Hücre süspansyonu santrifüj edilerek toplanır ve hücre peleti yeni besi ortamı ile tekrar süspanse edilerek hücreler yeni ortama aktarılır.

Pasajlama sırasında, bu hücreler farklılaşmaya uğrayabilirler. Bu yüzden her hücre tipi ve farklı kaynaklardan izole edilen hücreler için ve farklı *in vivo* uygulamalarda kullanılacak olan hücrelerin hangi pasaja kadar kültüre edileceği belirtilmelidir.

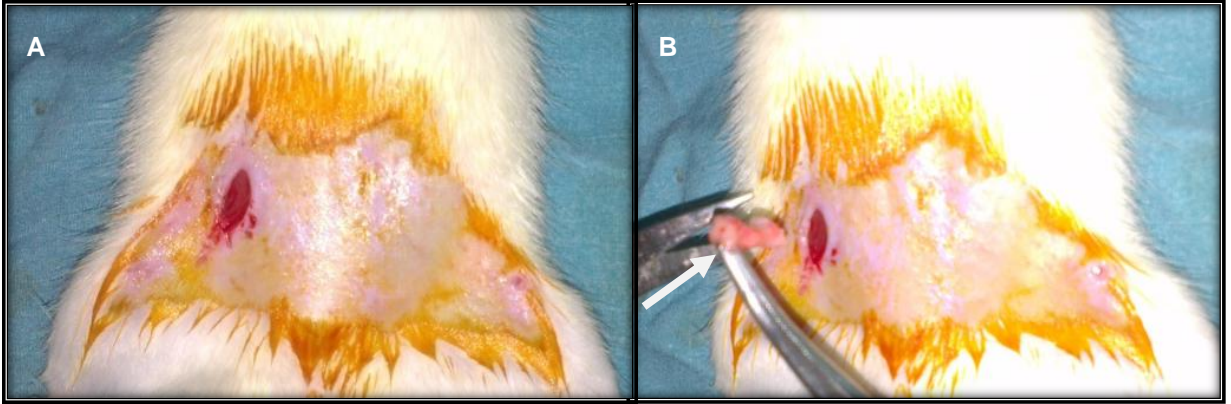
3. MATERYAL VE METOD

3.1. Mezenşimal Kök Hücre İzolasyonu

Bu çalışmada MKH izolasyonu için ortalama ağırlıkları 300-350 gram olan, 6-8 haftalık erkek Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Yağ dokusu mezenşimal kök hücreleri sıçanların deri altı yağ dokusundan izole edilmiştir. Hücre izolasyonu için kullanılan sıçanlar ile ilgili gerekli etik kurul izni Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınmıştır (H.Ü. Etik Kurulları, Protokol No: 2011/01-1).

İzolasyona hazırlanmak üzere sıçanlar anestezide alınmıştır. Anestezi için Xylazine (10 mg/kg) (Richter Pharma AG, Austria) ve Ketamin (50 mg/kg) (Richter Pharma AG) kullanılmıştır. Anestezi, sıçanlara intramüsküler olarak verilmiştir. Anestezi uygulanmış olan sıçanların dokusunun alınacağı kasık bölgesi tıraşlanmış ve antiseptik solüsyon ile temizlenmiştir. Yağ dokusuna ulaşmak için ilk olarak sıçanın kasık bölgesinde yaklaşık iki cm uzunluğunda bir insizyon yapılmış ve bu bölgeden içeri girilerek yağ doku alınmıştır (Şekil 3.1.1).

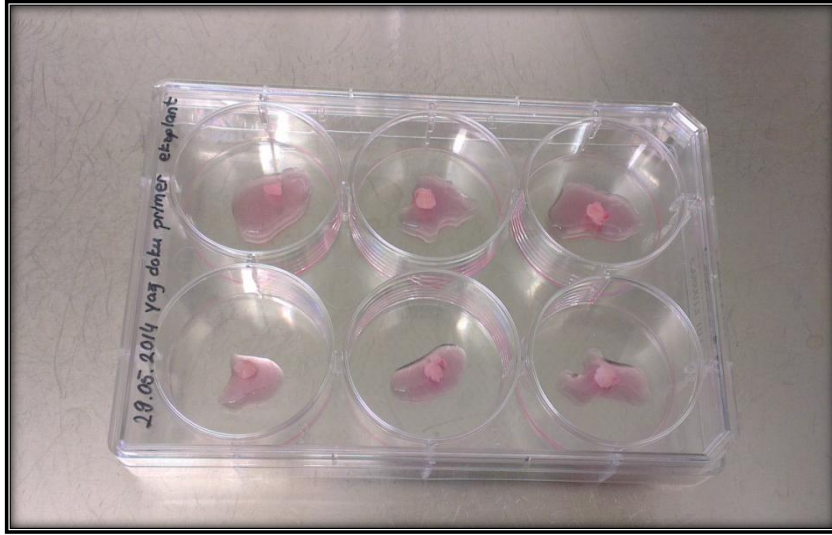
Cilt operasyondan sonra üç numara a travmatik cerrahi ipek ile kesikli dikiş tekniği ile dikilmiş ve sıçanın anestezisi sonrası takibi yapılmıştır.



Şekil 3.1. 1 Sıçanlardan yağ dokusu alınması A) Kasık bölgesinde insizyon yapılması B) Yağ dokusunun (→) cilt altından çıkartılması

3.2. Mezenşimal Kök Hücre Kültürü ve Pasajlanması

Sıçanlardan elde edilen yağ dokusu, önceden hazırlanmış %10 fetal bovine serum (FBS) (Sigma,USA), %0.4 penisilin-streptomisin (v/v) (Sigma, USA) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham's F12 (DMEM / F12) (Sigma, USA) taşıma besiyerine alınmıştır. Bundan sonra tüm işlemler, steril hava kabini içinde gerçekleştirilmiştir. Taşıma besiyeri içinde yağ dokusu küçük parçalara bölünmüş ve bu doku parçaları kontaminasyon riskinden kaçınmak amacıyla üç kez ayrı taşıma besiyeri içeren cam petri kaplarında yıkanmıştır. Daha sonra yağ doku parçaları 6-kuyucuklu kültür kaplarına alınmıştır (Şekil 3.2.1).



Şekil 3.2. 1 6-kuyucuklu kültür kabındaki yağ doku parçaları

Doku parçalarının üzerlerine birer damla %20 FBS, %0.1 penisilin-streptomisin (v/v) içeren besiyeri damlatılmış ve dokular 37 °C'de %5 CO₂ - %95 hava içeren standart kültür ortamında 20 dakika inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon süresi dokuların kültür kabı yüzeyine tutunması ve dokulardan ayrılacak hücreler için uygun bir ortam oluşmasını sağlamak içindir. 20 dakika sonra dokuları yüzeyden kaldırmayacak ve dokuların yüzeyini kaplayacak kadar %20 FBS, %0.1 penisilin-streptomisin (v/v) içeren besiyeri damlatılmış ve dokular gece boyu beklemek üzere inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.2.2).



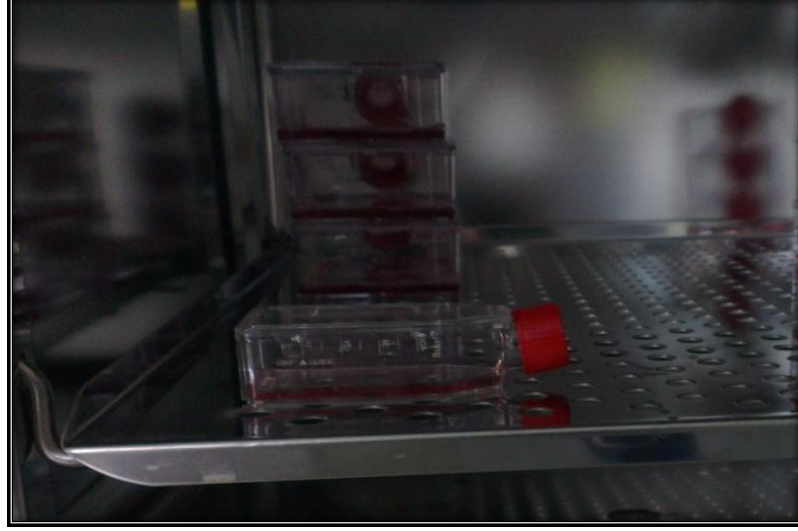
Şekil 3.2.2 6-kuyucuklu kültür kaplarında yağ dokularının inkübasyonu

İzolasyonun ertesi gününden itibaren kültürün takibi mikroskopik (IX70 Olympus, Japan) olarak yapılmıştır. Çeşitli sitokin moleküler, mezenşimal kök hücrelerin farklılaşmasına sebep olabilir. Bu nedenle mezenşimal kök hücrelerin farklılaşmaya yol açmaması için besiyeri değişimi izolasyonun ilk beşinci günü yapılmıştır.

İzolasyonun beşinci gününde kuyucuklarda bulunan yağ doku parçaları uzaklaştırılmış ve kuyucuklara %20 FBS, %0.2 penisilin-streptomisin (v/v) içeren besiyeri eklenerek bir gün süre ile inkübasyona devam edilmiştir.

Bu aşamadan sonra standart tripsinizasyon metodu uygulanarak hücrelerin pasajlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde ilk olarak 6-kuyucuklu kültür kaplarındaki besiyeri alınmış ve daha sonra her kuyucuk 0.5 ml Trypsin/EDTA solüsyon ile (Sigma, USA) yıkanmıştır. Yıkama işlemi yapıldıktan sonra kuyucukların her birine 0.5 ml Trypsin/EDTA eklenmiş ve kültür kabı 37 °C'de %5 CO₂ - %95 hava içeren standart kültür koşullarında inkübe edilmiştir. Kültür kapları 2-5 dakika inkübatörde bekletilmiş ve böylece hücrelerin birbirleri ve yüzey ile olan bağlantılarının kopartılması sağlanmıştır. Hücreler yüzeyden kalkıp süspansiyon hâle gelinceye kadar tripsin içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra kuyucukların her birine 2 ml %20 FBS içeren DMEM/F12 besiyeri eklenmiş ve böylece hücreler yüzeyden toplanıp santrifüj tüpüne alınarak 800 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve alt kısımda kalan hücre peleti %20 FBS içeren DMEM/F12 ile homojenize edilmiş ve 25 cm²'lik kültür kaplarına alınmıştır (Şekil 3.2.3). Bu işlem ile pasaj 1 (P1) aşamasındaki hücreler elde edilmiştir.

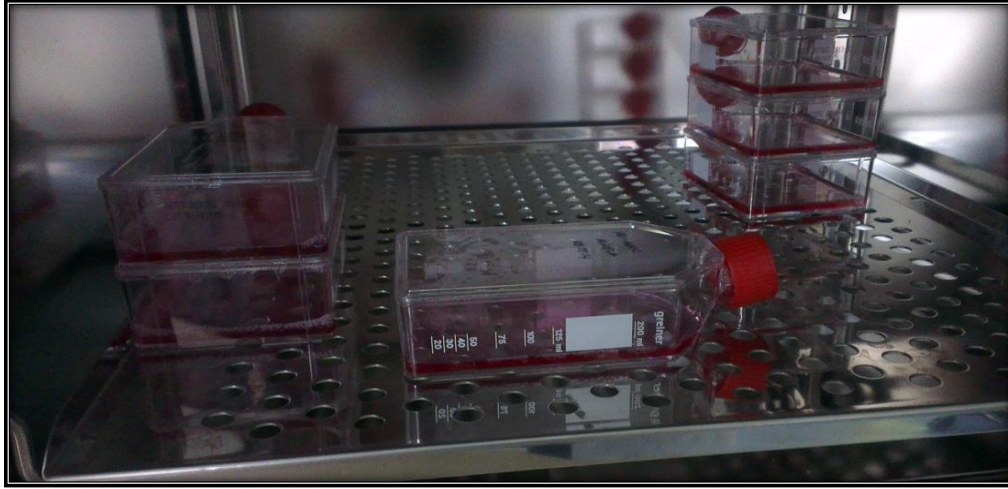


Şekil 3.2. 3 Mezenşimal kök hücrelerin pasaj 1 (P1)'de 25cm²'lik kültür kabında kültüre edilmesi

Tripsinizasyon yöntemi kullanarak hücreler toplam olarak pasaj 10'a (P10) kadar kültüre edilmiştir. Her pasajdaki hücrelerin çoğaltılması için 7-10 güne kadar beklenmiş ve hücreler tam konfluensiye ulaştıktan sonra pasajlama işlemi yapılmıştır.

Pasaj 2 aşamasından itibaren inkübasyon 75 cm² 'lik kültür kaplarında ve P10'a kadar, her pasajda, % 20 FBS içeren besiyeri ortamında kültürü devam edilmiştir. (Şekil 3.2.4).

Her pasajdaki hücreler bir sonraki işlemler için kademeli dondurma yöntemi ile dondurulmuştur. Bu işlem için, aynı tripsinizasyon yöntemi uygulanmış olup, hücreler % 20 FBS içeren DMEM-F12 ile 5 dakika 800 rpm'de santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra süpernatant atılmış ve tüpün altında kalan hücre peletinin homojenizasyonu bu kez %50 FBS, %40 DMEM/F12 ve %10 dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma, USA) içeren dondurma besiyeri ile yapılmıştır. Bu hücreler ilk olarak 72 saat süre ile -80°C'de bekletilmiş sonrasında -196 °C'de sıvı azota alınmıştır. Böylece toplam 10 farklı pasaj hücre hazırlanıp karakterizasyon işlemi için saklanmıştır.



Şekil 3.2.4 Mezenşimal kök hücrelerin 75cm²'lik kültür kabında kültüre edilmesi

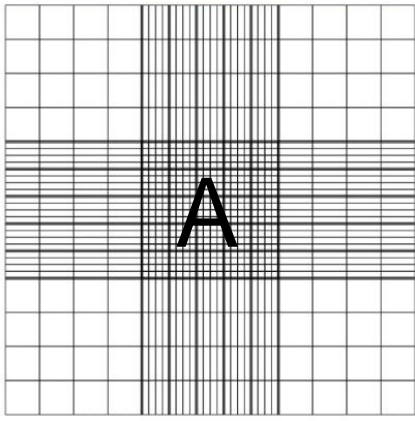
3.3. Mezenşimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Yağ dokusundan izole edilen mezenşimal kök hücrelerin toplam olarak 10 pasajı hazırlanmıştır. Her pasajdaki hücreler dondurulmuş ve karakterizasyon için saklanmıştır. Hücrelerin karakterizasyonu iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada, her pasajdaki hücreler karakterizasyon için 6-kuyucuklu kültür kaplarında hazırlanmıştır. İkinci aşamada ise, farklı pasajlardaki hücreler immünofloresan boyama yöntemi kullanarak karakterize edilmiştir.

3.3.1. Mezenşimal Kök Hücrelerin Karakterizasyon için Hazırlanması

Kriyotüp içerisinde kademeli dondurularak sıvı azot tankına (-196 °C) yerleştirilmiş olan hücreler (P1-P10) tanktan çıkarılarak, sıcaklığı önceden 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda hızlıca çözündürülmüştür. İçinde çözündürülmüş hücre süspansyonu bulunan kriyotüp, kriyoprotektan madde içeren dondurma ortamının uzaklaştırılması amacıyla 800 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin sonunda, kriyotüp içerisindeki süpernatant (DMSO içeren hücre dondurma ortamı) atılarak uzaklaştırılmıştır.

Daha sonra kalan hücre peleti % 20 FBS içeren besiyeri ortamı ile homojenize edilmiştir. Trypan Blue ile hücreler boyanarak, canlı hücreler ışık mikroskopunda neubauer lamında hemositometrik olarak sayılmış (Şekil 3.3.1.1) ve ml'deki hücre sayısı bulunmuştur. Sayım işlemi için 1:1 (100 µl hücre süspansiyonu +100 µl Trypan Blue) hücre süspansiyonu Trypan Blue ile karıştırılmış ve bu şekilde hücre yoğunluğu ve toplam hücre sayısı belirlenmiştir.



Hücre sayısı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır;

$$\text{Hücre/ml} = [\text{Canlı hücre sayısı (A) / en küçük kare sayısı (400)}] \times \text{SF} \times 10^4$$

$$\text{Toplam Hücre sayısı} = \text{Hücre/ml} \times \text{Hücre süspansiyonunun hacmi (ml)}$$

Şekil 3.3.1. 1 Hemositometrede canlı hücre sayımı

Toplam hücre sayısı belirlendikten sonra (istenilen hücre sayısı x istenilen hacim) /toplam hücre sayısı; formülü kullanarak her 6-kuyucuğa eşit miktarda hücrelerin ekimi yapılmıştır.

Her pasajda, karakterizasyon yapabilmesi için başlangıç hücre sayısı her bir 6-kuyucuklu kültür kabı için 100 000 hücre/12ml; her kuyucukta yaklaşık 16.666 hücre/2 ml olarak hazırlanmıştır. Her pasajda beş farklı yüzey antijeni ile karakterizasyon yapmak üzere, boyama işlemlerinden 24 saat öncesinde, hücrelerin 6-kuyucuk kültür kaplarına ekimi yapılmış ve gece boyunca bu hücreler inkübe edilmiştir. Burada belirlenen hücre sayısı sayım için en uygun miktar olduğu için tercih edilmiştir.

3.3.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin İmmunofloresan Yöntemi ile Karakterizasyonu

6-kuyucuklu kültür kabında gece boyunca inkübe edilmiş hücreler boyama işlemlerine başlamak için uygun hale gelmiş, her kuyucukta yeterli sayıda hücre olup plastik yüzeye tutunmuşlardır. İlk başta boyama işlemleri için tüm solüsyonlar PBS içinde (Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich; P4417) 1:50 oranında hazırlanmış ve tüm işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

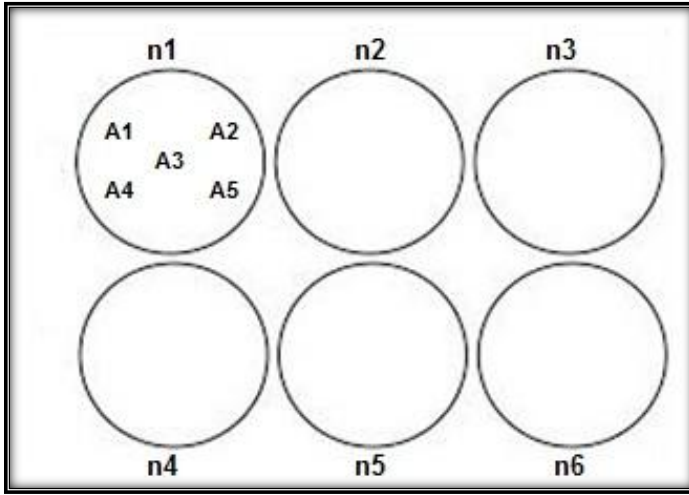
Mezenşimal kök hücrelerin karakterizasyonu için CD13 (Santa Cruz Biotechnology, USA; sc-15360), CD29 (Santa Cruz Biotechnology, USA; sc-6622), CD90 (Santa Cruz Biotechnology, USA; sc-9163), CD54 (Santa Cruz Biotechnology, USA; sc-8439) ve CD34 (Santa Cruz Biotechnology, USA; sc-9095) olmak üzere beş farklı yüzey antijeni kullanılmıştır.

Floresan boyama yönteminde sırasıyla şu aşamalar gerçekleştirilmiştir:

- Standart floresan boyama yöntemine başlamak için öncelikle 6-kuyucuklu kültür kaplarından kültür ortamı uzaklaştırılmıştır ve her kuyucuktaki hücreler fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır.
- Fiksasyon için hücrelerin üzerini kapayacak kadar (0.5ml) metanol eklenmiş ve 5 dakika -10 °C'de beklenmiştir.
- Daha sonra metanol uzaklaştırılmış ve 6-kuyucuklu kültür kaplarındaki hücrelerin üzerine her bir kuyucuğa 300µl olacak şekilde engelleyici (blocking) serum (Normal Goat Serum, Santa Cruz Biotechnology, USA; sc-2043) eklenmiş ve 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- Bu sürenin sonunda serum uzaklaştırılarak, hücreler PBS ile yıkanmıştır.
- Daha sonra hücrelerin üzerini kaplayacak şekilde, her kuyucuğa önceden PBS içinde hazırlanmış olan primer antikor solüsyonlar (1:50 oranında) (CD13, CD29, CD90, CD54 ve CD34, Santa Cruz Biotechnology, USA) eklenerek 60 dakika süreyle oda sıcaklığında karanlık ortamda kabın içerisinde inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun sonunda ortamdaki primer antikor solüsyonları uzaklaştırılarak 3 kez ve her seferde 5 dakika süreyle bekleyerek PBS ile yıkanmıştır.

- Daha sonra hücrelerin üzerine, her kuyucuğa 300 µl önceden PBS içinde 1:50 oranında hazırlanmış sekonder antikorlar (CD13, CD29, CD90, CD54 ve CD34 yüzey antijeni için: donkey anti-goat IgG-TR (Texas red, Santa Cruz Biotechnology, USA; sc-2783)) ile 45 dakika süreyle inkübe edilmiştir.
- Bu işlemin sonunda sekonder antikorların ortamdan uzaklaştırılması için hücreler 3 kez PBS ile yıkanmıştır.

Tüm işlemler CD13, CD29, CD54, CD90 ve CD34 için altı kuyucuklu kültür kaplarında pasaj 1'den , pasaj 10'a kadar ve her pasaj için ayrı ayrı uygulanmıştır. Hücreler TR için floresan aydınlatma (Olympus, Japan) ile inverted mikroskopta (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japan) 545-580 nm'de (Excitation Filter) görüntülenmiştir. Görüntüler Olympus DP Manager ve DP Controller (Olympus IX-JVAD, Japan) programları kullanılarak her pasajdaki hücrelerin çekimleri yapılmak üzere bilgisayara aktarılmıştır. 6-kuyucuklu kültür kabına bakıldığında her bir kuyucuk için beş farklı alan seçilmiştir. Bu beş farklı alanın hem normal görüntü hem de floresan görüntü için hücre sayımı yapılmıştır (Şekil 3.3.2.1). Bu şekilde her bir yüzey antijeninin ifadesinin pozitif yüzde (%) oranı hesaplanmıştır.



n1 için:

Toplam normal görüntüde (boyama yapılmaksızın) hücre sayısı = A1+A2+A3+A4+A5

Toplam floresan boyanmış hücre sayısı= A1+A2+A3+A4+A5

% ifade oranı: (toplam floresan boyanmış hücre x 100) / toplam normal görüntüde hücre sayısı

Şekil 3.3.2. 1 6-kuyucuklu kültür kabında hücre sayımı için alan belirlenmesi

3.4. İstatistiksel Analiz

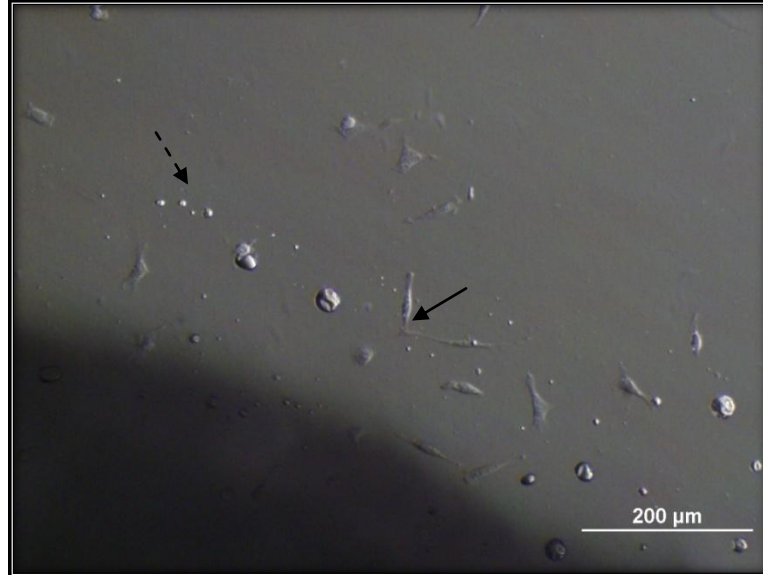
Bu çalışmada deneysel verilerin istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) istatistik programı kullanılmıştır. Her bir yüzey antijeninin, 10 farklı pasajı arasındaki farklılıkları incelemek için parametrik olmayan (non-parametric) Independent Samples Kruskal-Wallis test kullanılmıştır. İstatistiksel önem kontrolü $p \leq 0,05$ düzeyinde yapılmıştır. Son olarak, beş farklı yüzey antijenin genel ifadesi arasındaki farklılara bakılmak üzere tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) uygulanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Mezenşimal Kök Hücrelerin İzolasyonu, Kültürü ve Pasajlanması

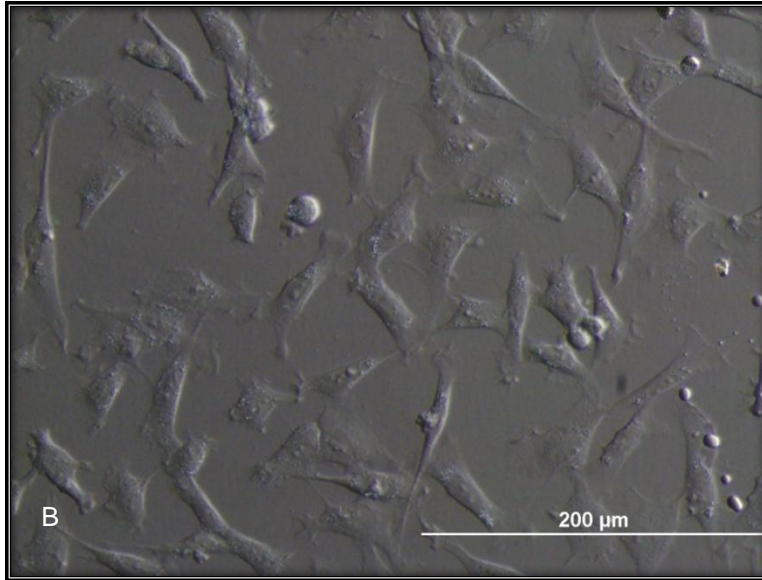
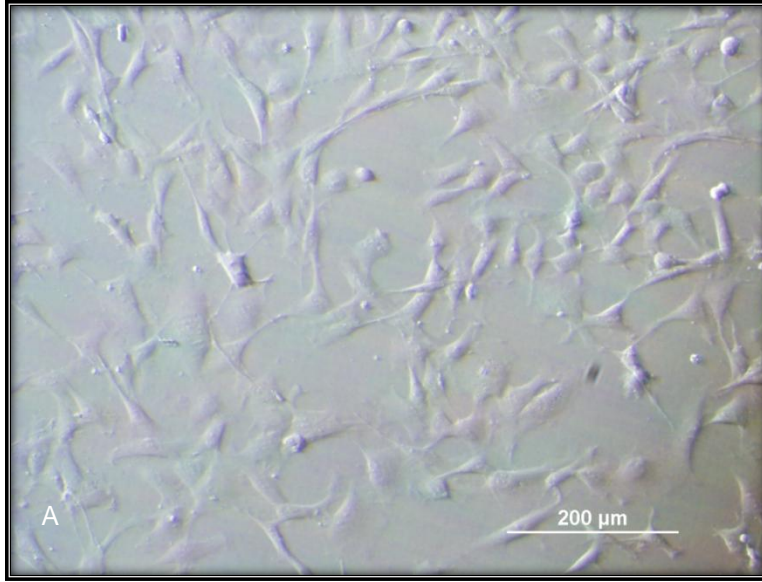
Yağ dokusundan primer eksplant kültür yöntemi ile izolasyonu yapılan mezenşimal kök hücreler pasaj 0 (P0) ve pasaj 1 (P1) olarak kültüre edilmiştir. Daha sonra bu pasajlardaki kök hücreler dondurulmuş ve sıvı azottan (-196°C) çıkarıldıktan sonra P1'den P10'a kadar pasajlanmış ve karakterizasyonu için tekrar dondurulmuştur.

Bu tez çalışmasında hücre izolasyonu sırasında herhangi bir enzimatik yöntemi kullanılmamış, primer dokudan doğrudan mezenşimal kök hücrelerin ayrılarak kültür kabının yüzeyine tutunmaları sağlanmıştır. İnkubasyondan 24 saat sonra MKH'lerin dokudan ayrılarak kültür kabının yüzeyine tutunmaya başladıkları ve fibroblastik morfolojiye sahip oldukları gösterilmiştir (Şekil 4.1.1). Bu hücrelerin arasında eritrositler de belirgin olarak görülmektedir. Ancak besiyerinin değiştirilmesi ile eritrositler ortamdaki uzaklaştırılmış ve birinci pasajdan sonra kültürde hemen hemen hiç eritrosit kalmamıştır. İnkübasyonun başlangıcından 5 gün sonra fibroblastik morfoloji gösteren hücrelerin sayısı artmış (Şekil 4.1.2A, Şekil 4.1.2B) ve pasaj 1'den önce hücreler konfluent görüntüye ulaşmışlardır (Şekil 4.1.3).

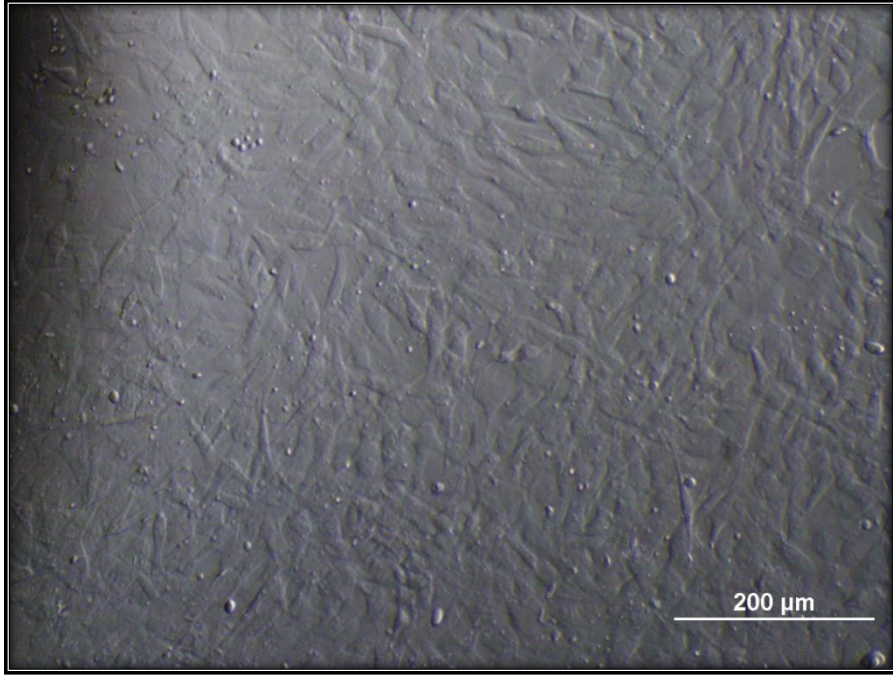


Şekil 4.1. 1 Yağ dokusundan izolasyondan 24 saat sonra MKH'ler (→) ve çevrelerindeki eritrositler (---▶) (X10)

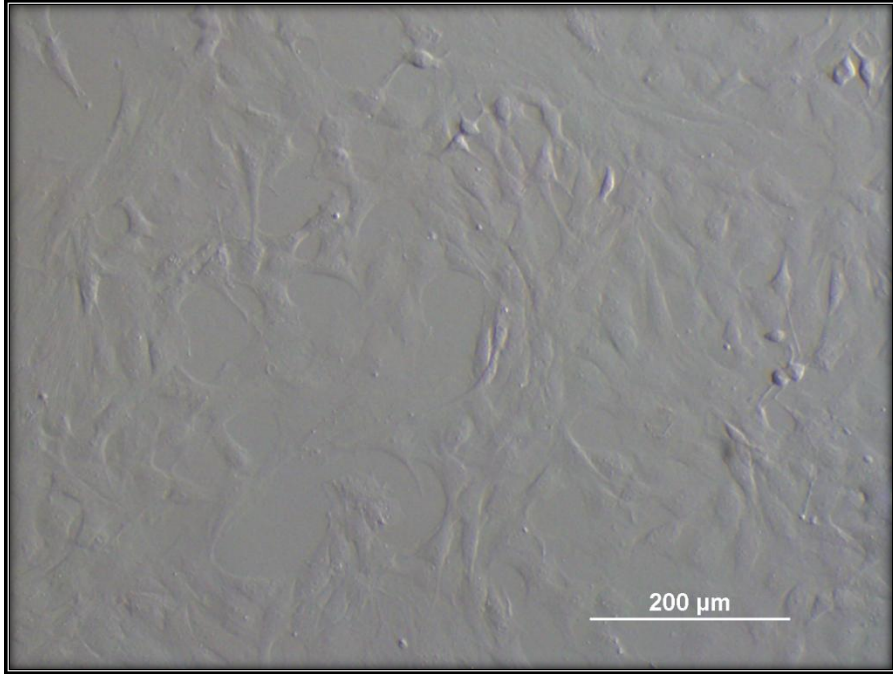
Pasaj 1'deki hücreler hızla proliferere olmuş ve kültür kabının yüzeyini tamamiyle kaplayarak konfluensiye ulaşmışlardır (Şekil 4.1.4). Primer kültür ile kıyaslandığında (P0), P1'den sonra hücre sayısı hızla artmaya başlamış ve hücreler P10'a kadar pasajlanmıştır. Her pasajdaki hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfolojiden belirgin bir sapma olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.1.5 - 4.1.13).



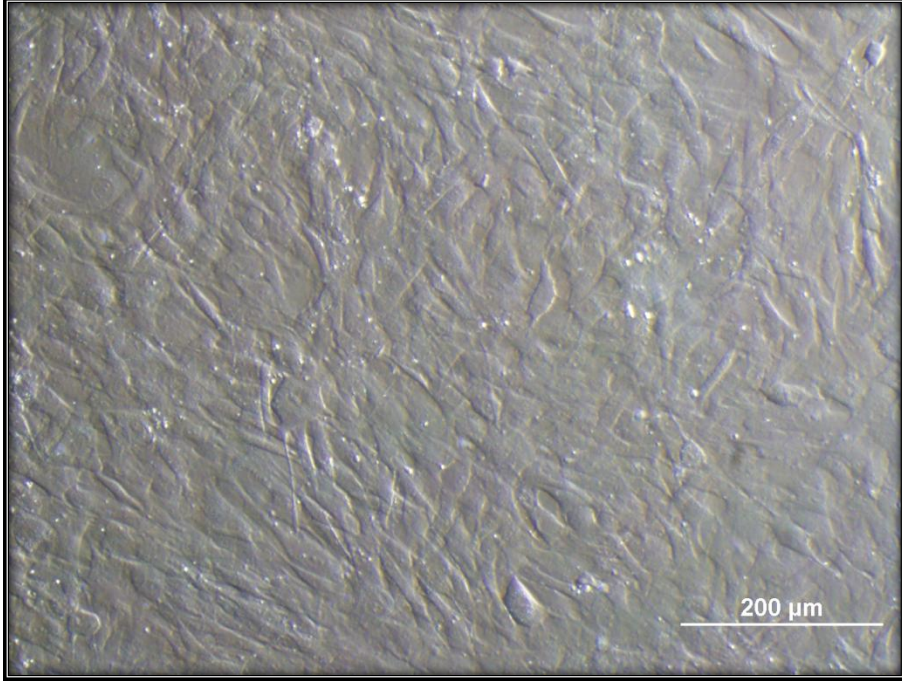
Şekil 4.1. 2 Primer ekspant kültürün 5. gününde MKH'lerin morfolojisi A) X10 B) X20



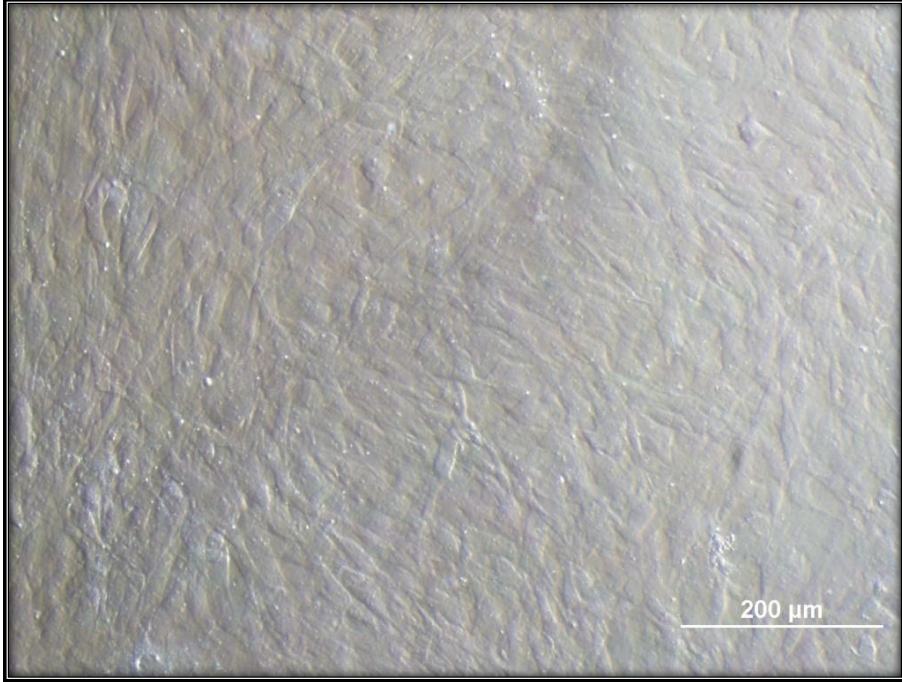
Şekil 4.1. 3 MKH'lerinin pasaj 1' den (P1) öncesi konfluent görüntüsü (X10)



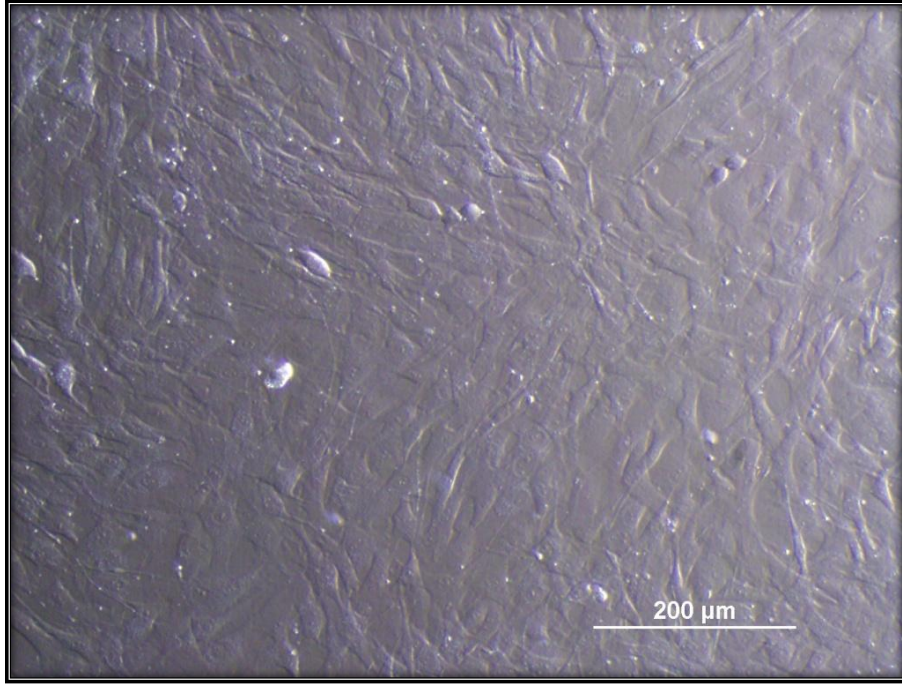
Şekil 4.1. 4 Pasaj 1'de (P1) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)



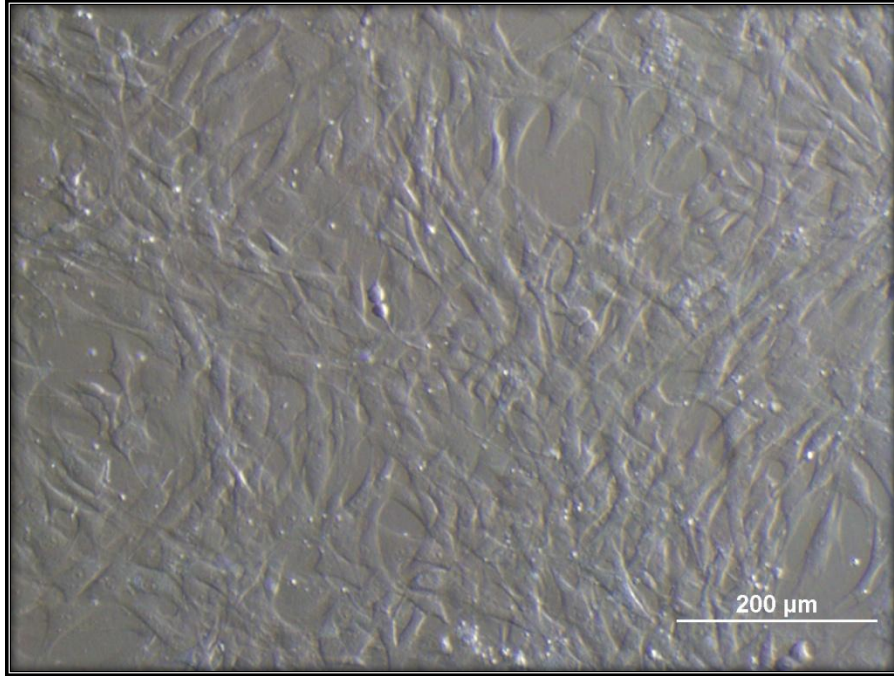
Şekil 4.1. 5 Pasaj 2'de (P2) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)



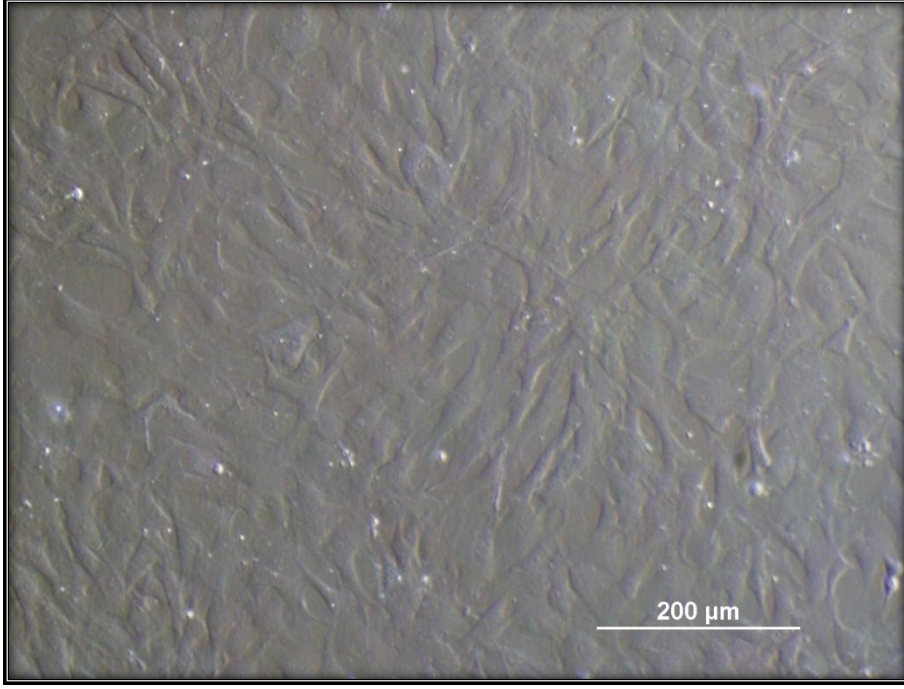
Şekil 4.1. 6 Pasaj 3'de (P3) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)



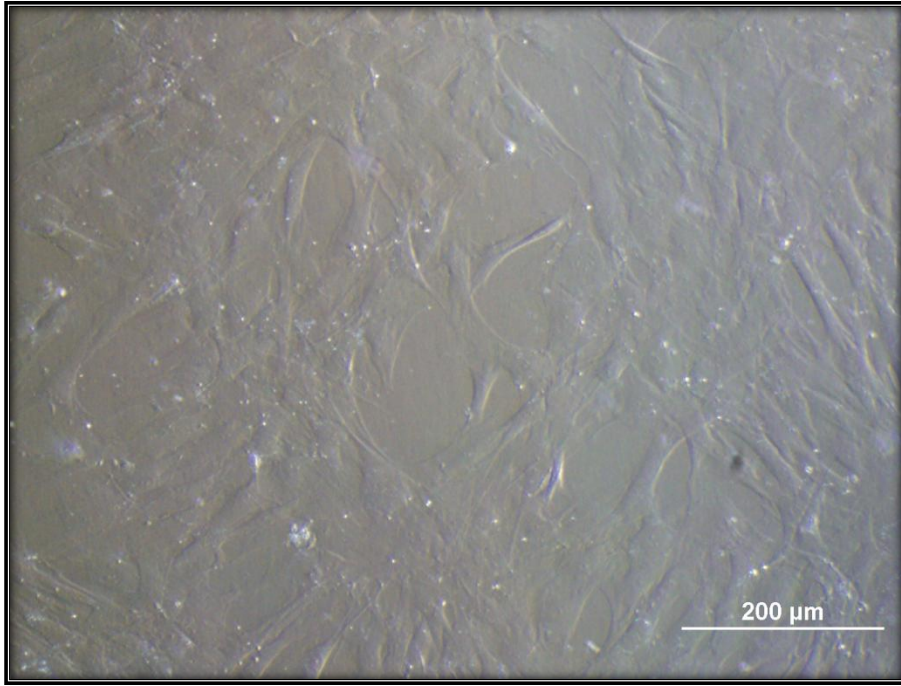
Şekil 4.1. 7 Pasaj 4'de (P4) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)



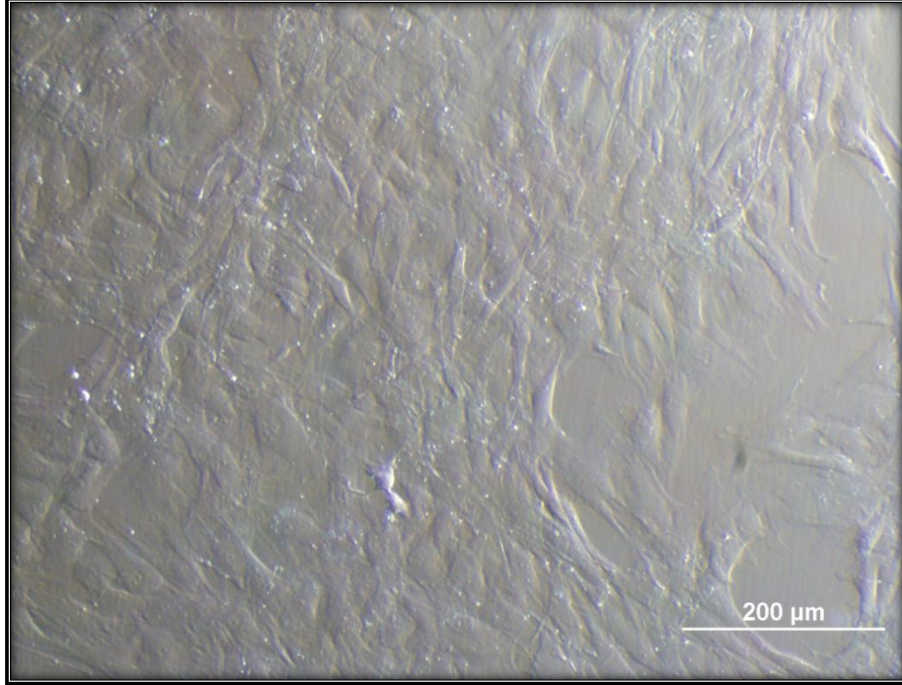
Şekil 4.1. 8 Pasaj 5'de (P5) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)



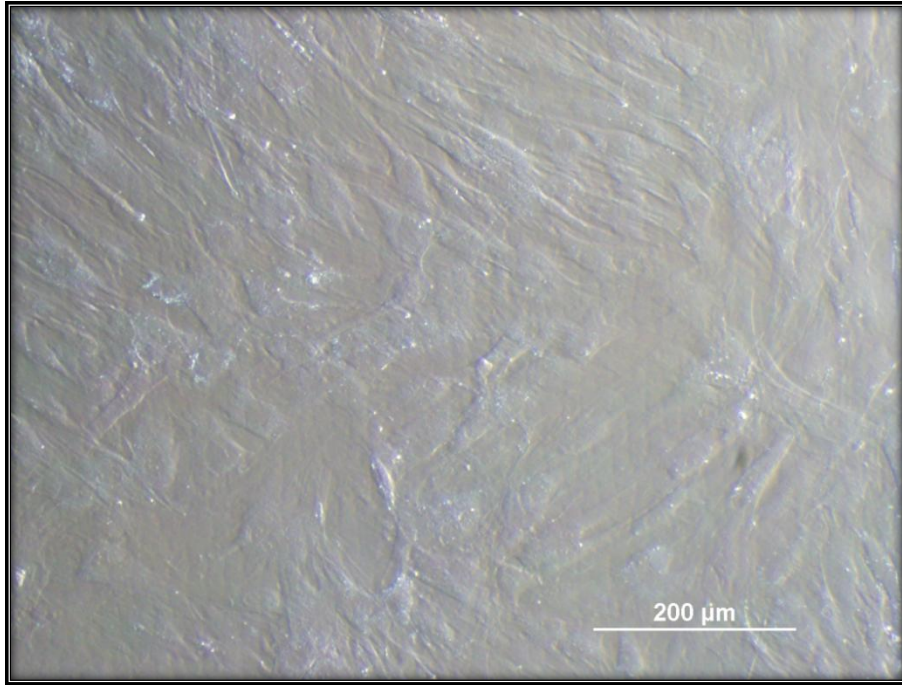
Şekil 4.1. 9 Pasaj 6'da (P6) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)



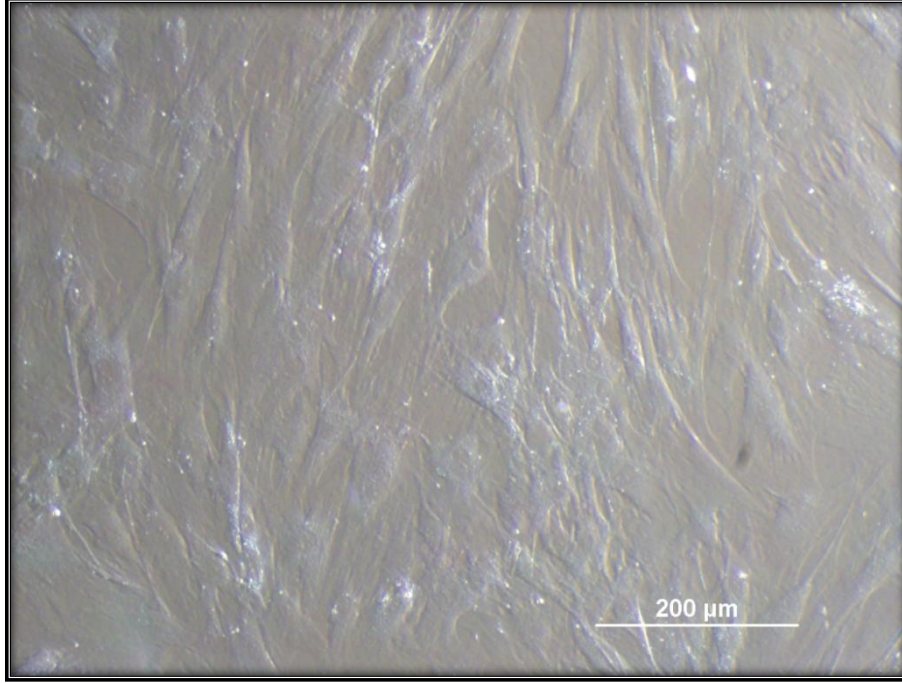
Şekil 4.1. 10 Pasaj 7'de (P7) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)



Şekil 4.1. 11 Pasaj 8'de (P8) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)

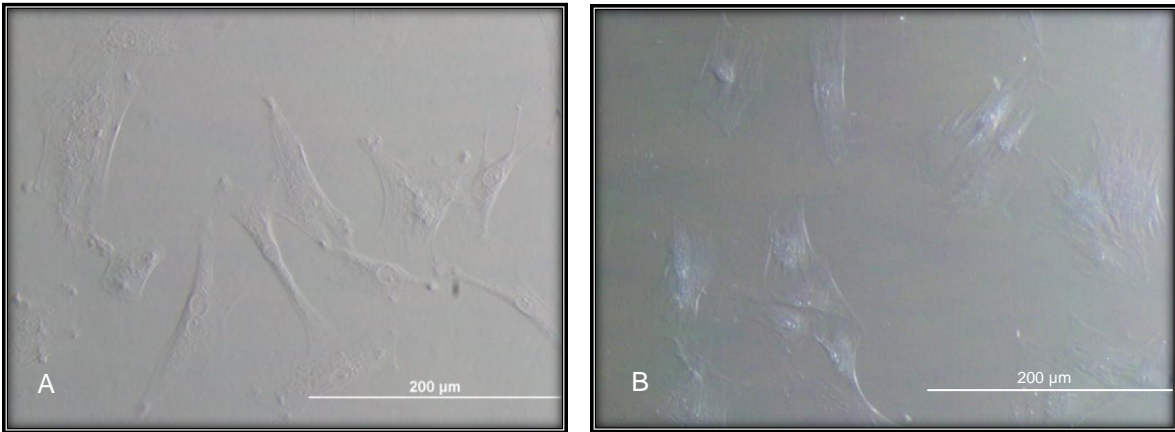


Şekil 4.1. 12 Pasaj 9'da (P9) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)

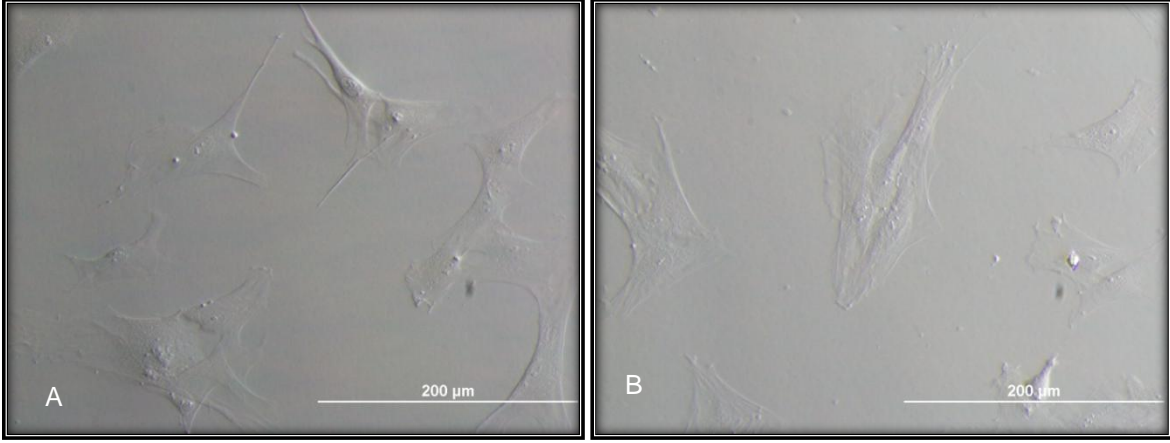


Şekil 4.1. 13 Pasaj 10'da (P10) MKH'lerin konfluent görüntüsü ve morfolojisi (X10)

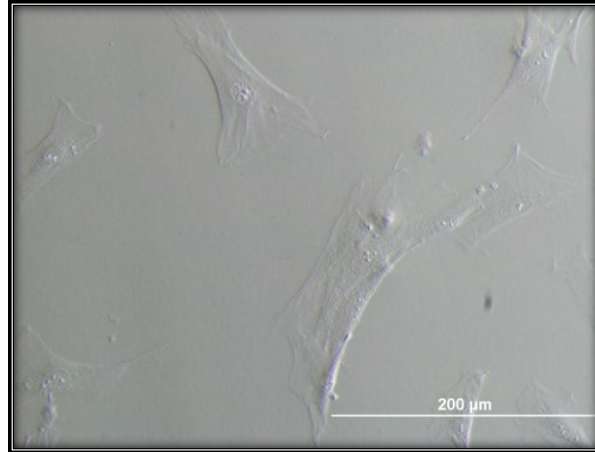
İlerleyen pasajlarda hücrelerin morfolojilerinde bazı sapmalar olduğunu görülmüştür. Bu değişiklikler belirgin ve sayıca fazla olarak P6 'dan sonra görülmüştür. P6, P7, P8, P9 ve P10'da hücrelerin fibroblastik morfolojilerinin değişerek daha yaygın bir görüntüye sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu hücrelerde hücre gövdesi daha yaygınlaşmış, uzantılar kısalarak kalınlaşmıştır (Şekil 4.1.14 - 4.1.16).



Şekil 4.1. 14 A) P6'da MKH'lerin değişik morfolojik görüntüsü B) P7'de MKH'lerin değişik morfolojik görüntüsü (X20)



Şekil 4.1. 15 A) P8'de MKH'lerin değişik morfolojik görüntüsü B) P9'da MKH'lerin değişik morfolojik görüntüsü (X20)



Şekil 4.1. 16 P10'da MKH'lerin değişik morfolojik görüntüsü (X20)

4.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Yağ dokusu kökenli MKH de, bazı spesifik yüzey antijenleri ifade eder. Bu da MKH'lerin karışık bir hücre popülasyonu içinden hızlı bir şekilde ayrılmasına olanak tanır. Bu çalışmada yağ dokusu MKH'leri immunofloresan boyama yöntemiyle karakterize edilmiş ve bunun için CD13, CD29, CD54, CD90 ve CD34 yüzey antijenleri kullanılmıştır.

Hücreler boyama sonunda TR (Texas Red) için 545-580 nm dalga boyunda floresan aydınlatma (Olympus, Japan) ile inverted mikroskopta (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japan) görüntülenmiştir.

Elde edilen görüntüler ile hücrelerin her pasajda her bir yüzey antijeni için normal ve floresan hücre sayısı belirlenmiştir. Floresan görüntüler, normal çekim görüntüleri ile karşılaştırılmış ve her pasajda pozitif ifade oranı % olarak hesaplanmıştır. Hücreler P1'den P10'a kadar beş yüzey antijeni için belirli oranlarda boyanmıştır.

CD 34'ün mezenseşimal kök hücreler için negatif bir antijen olması gerekirken, farklı pasajlarda belirli oranda ifade edildiği görülmüştür. Ancak bu oran diğer antijenler ile karşılaştırıldığında düşük olduğu için MKH'lerde yeterli düzeyde ifade edilmediği söylenebilir. Tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) kullanarak CD 34 yüzey antijeninin % ifade oranı diğer yüzey antijenler ile karşılaştırıldığında, CD34'ün % ifade oranı, CD13, CD29 ve CD90 yüzey antijenlerinin ifade oranlarından istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (Çizelge 4.2.1).

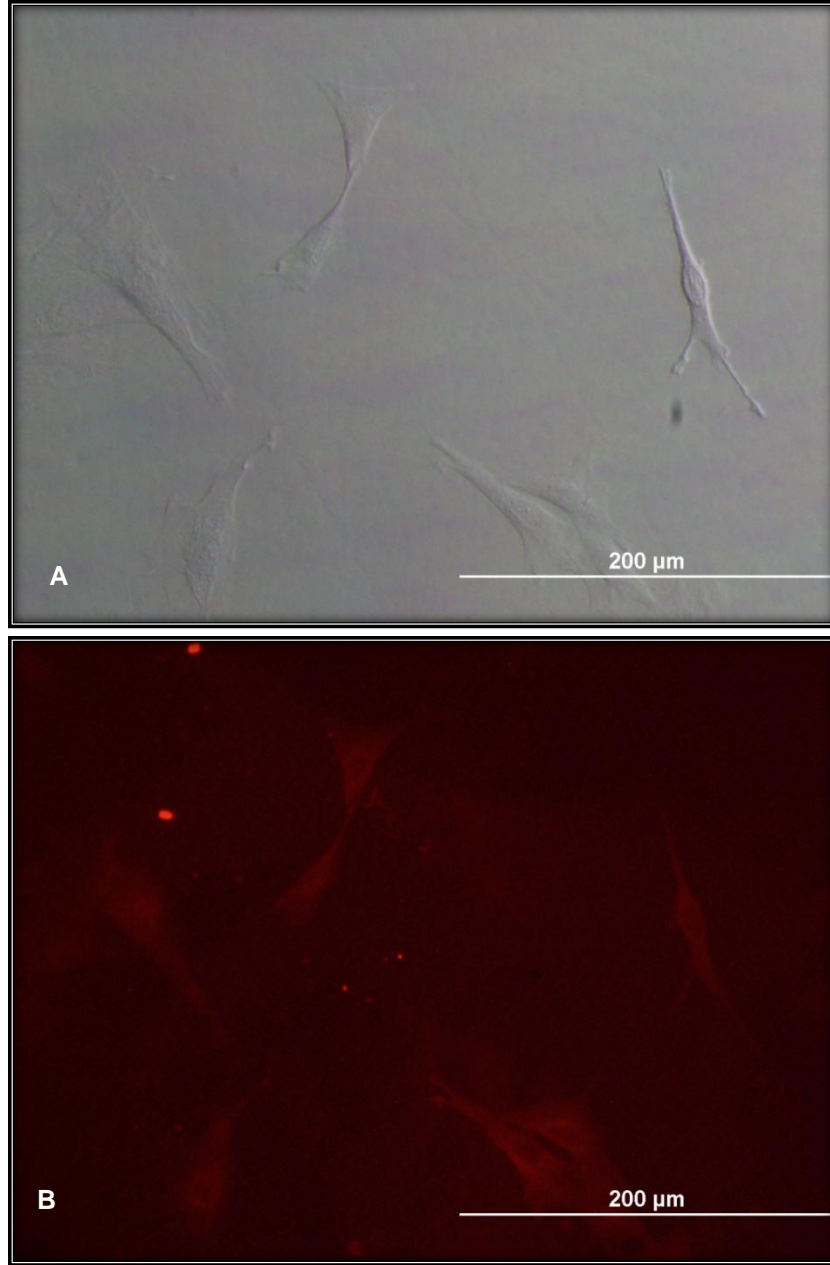
Çizelge 4.2. 1 CD34 yüzey antijeninin % ifadesinin diğer yüzey antijenleri ile karşılaştırılması	
Yüzey antijeni	P değeri
CD13	0.000
CD29	0.004
CD90	0.004

Her yüzey antijeninin ifade oranı hesaplanırken daha önce de ifade edildiği gibi P6'dan sonra hücrelerin morfolojilerinde bazı değişiklikler görülmüştür (Şekil 4.2.1.6,7,10; Şekil 4.2.2.6,7,9,10; Şekil 4.2.3.7,8,9,10; Şekil 4.2.4.6,7,8,9,10; Şekil 4.2.5.7,9,10). Bu değişik morfolojideki hücreler sayım alanlarında yer alabilir ya da almayabilir. Ancak her pasajda hücreler fibroblastik morfolojiye sahip olmaktadır.

İmmunofloresan boyama sonuçları, beş yüzey antijeninin de her pasajda ifade edildiğini ancak pasajlar arasında ifade oranında bazı farklılıklar olduğunu göstermiştir.

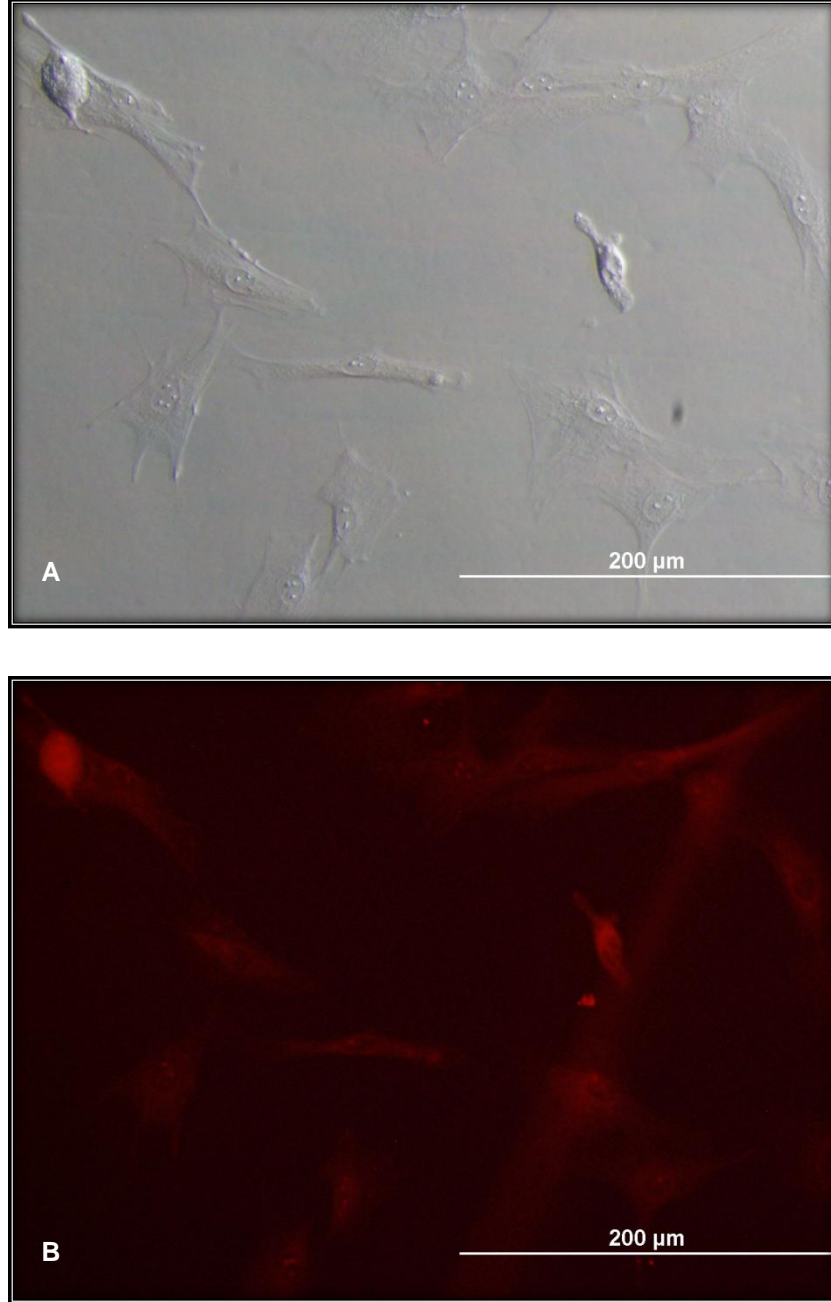
4.2.1. Mezenşimal Kök Hücrelerin CD13 Yüzey Antijeni ile Karakterizasyonu

Pasaj 1'de (P1) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.1.1A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.1.1B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P1 MKH'lerde CD13 yüzey antijeninin pozitif ifadesi % 73.575 olarak hesaplanmıştır.



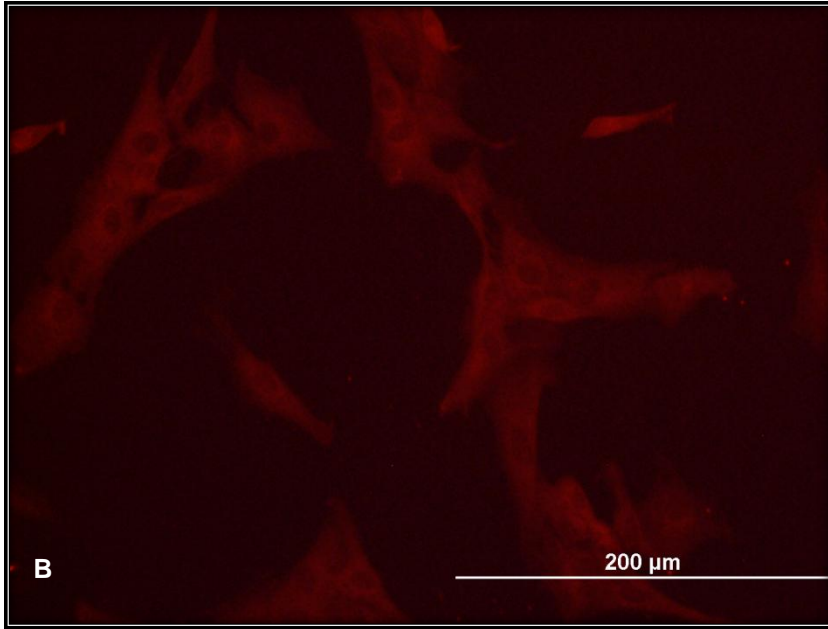
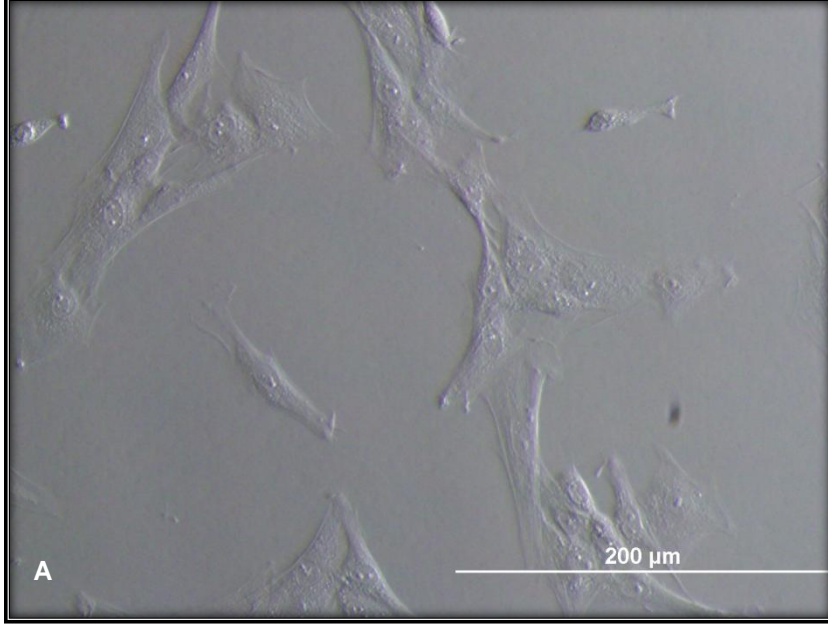
Şekil 4.2.1. 1 Pasaj 1 (P1) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 2'de (P2) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.1.2A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.1.2B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P2 MKH'lerde CD13 yüzey antijenin pozitif ifadesi % 83.055 olarak hesaplanmıştır.



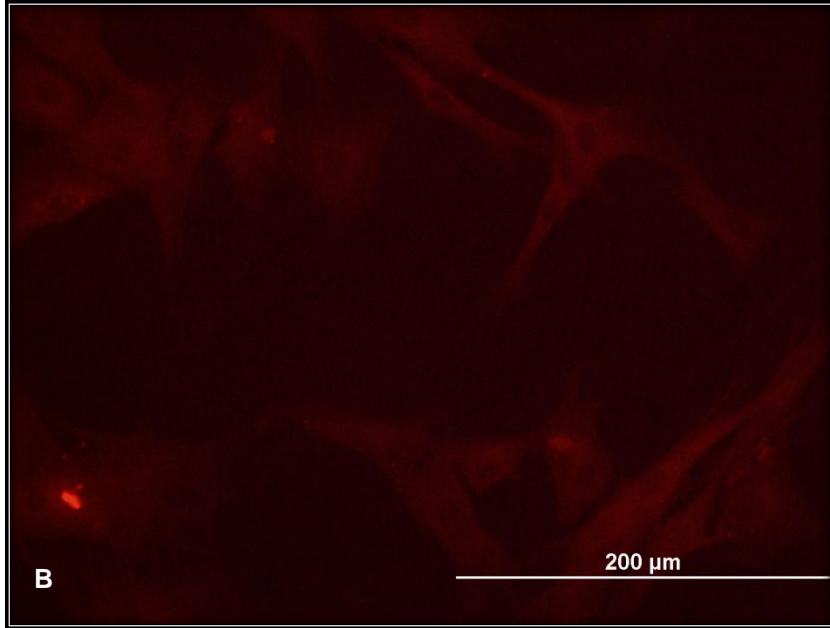
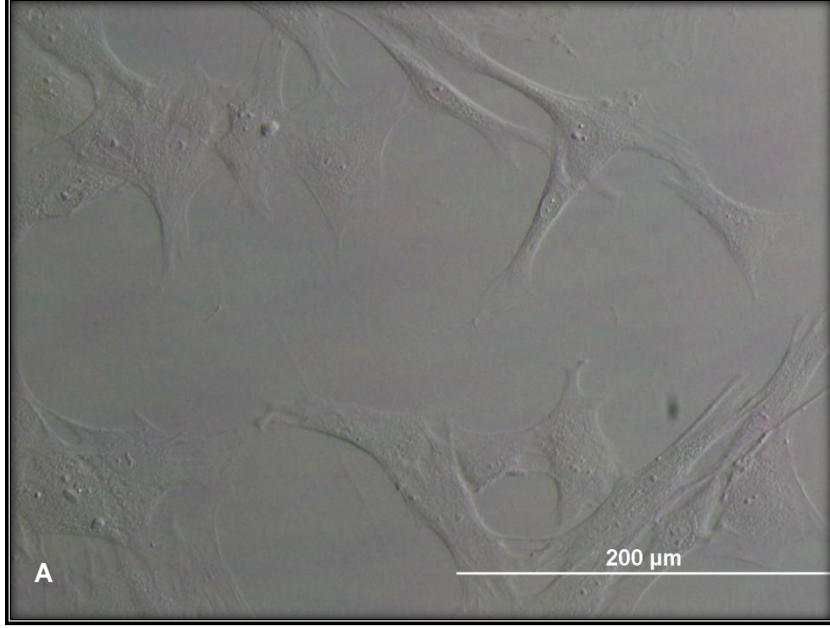
Şekil 4.2.1. 2 Pasaj 2 (P2) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 3'de (P3) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.1.3A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.1.3B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P3 MKH'lerde CD13 yüzey antijenin pozitif ifadesi % 81.025 olarak hesaplanmıştır.



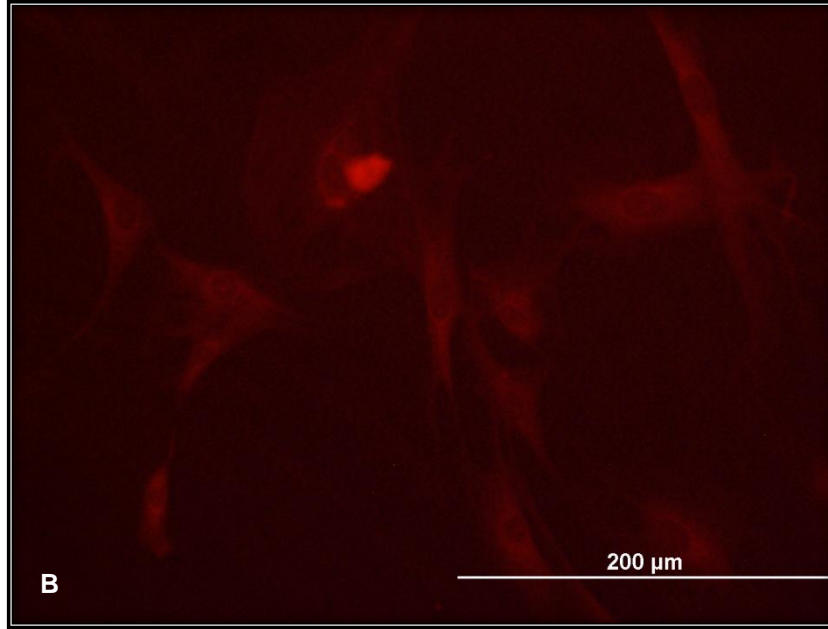
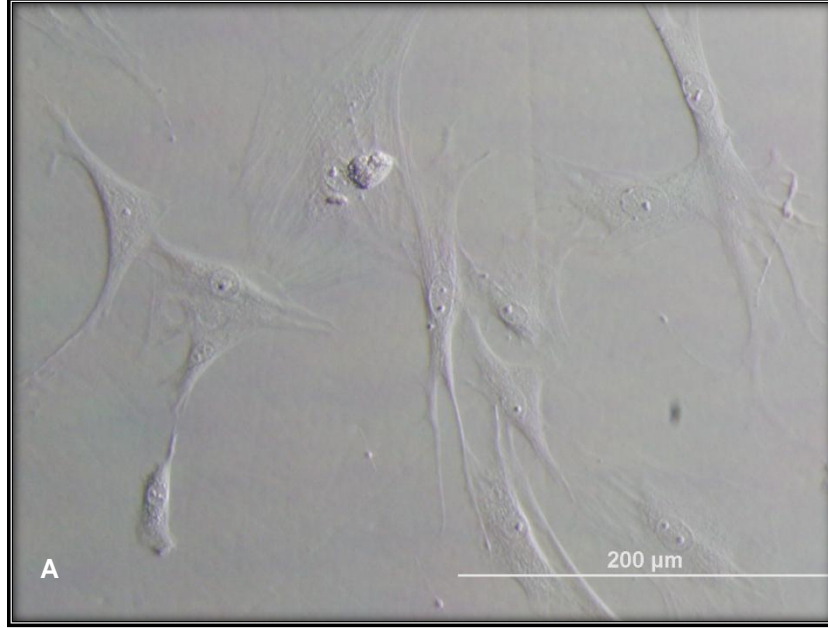
Şekil 4.2.1. 3 Pasaj 3 (P3) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 4'de (P4) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.1.4A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.1.4B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P4 MKH'lerde CD13 yüzey antijenin pozitif ifadesi % 79.728 olarak hesaplanmıştır.



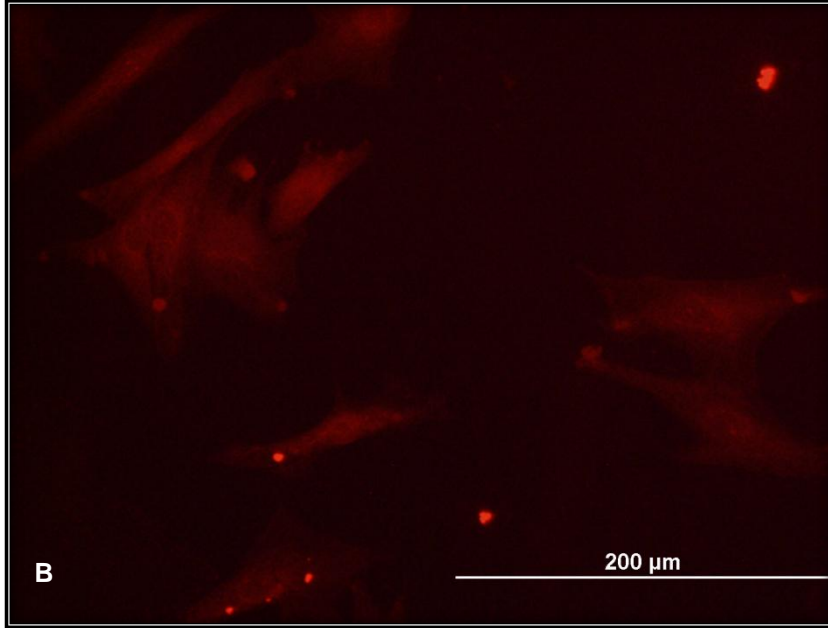
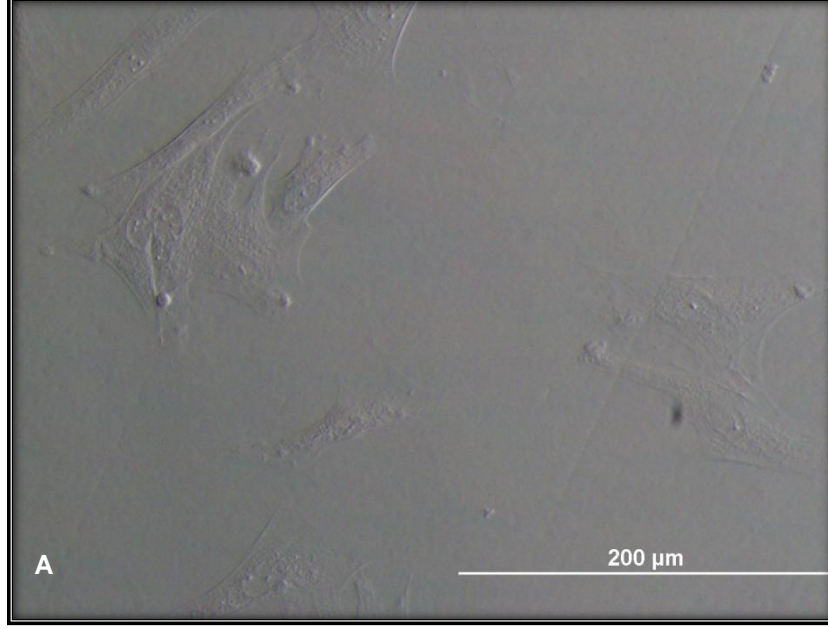
Şekil 4.2.1. 4 Pasaj 4 (P4) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 5'de (P5) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.1.5A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.1.5B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P5 MKH'lerde CD13 yüzey antijenin pozitif ifadesi % 91.740 olarak hesaplanmıştır.



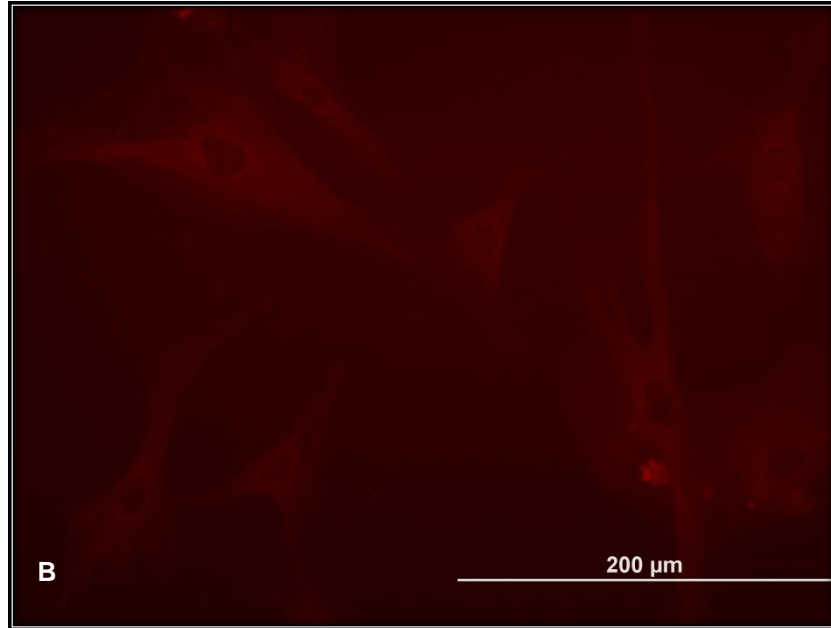
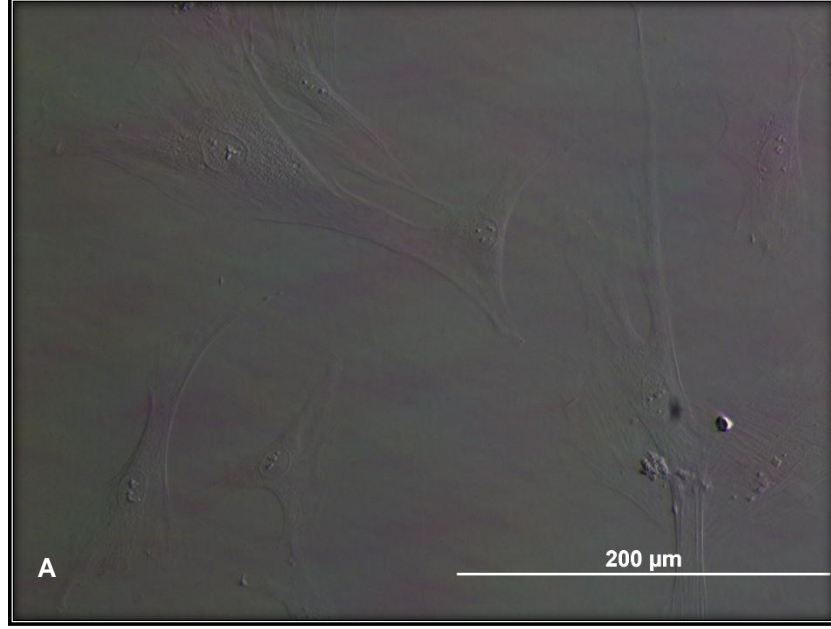
Şekil 4.2.1. 1 Pasaj 5 (P5) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 6'da (P6) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.1.6A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.1.6B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P6 MKH'lerde CD13 yüzey antijenin pozitif ifadesi % 90.113 olarak hesaplanmıştır.



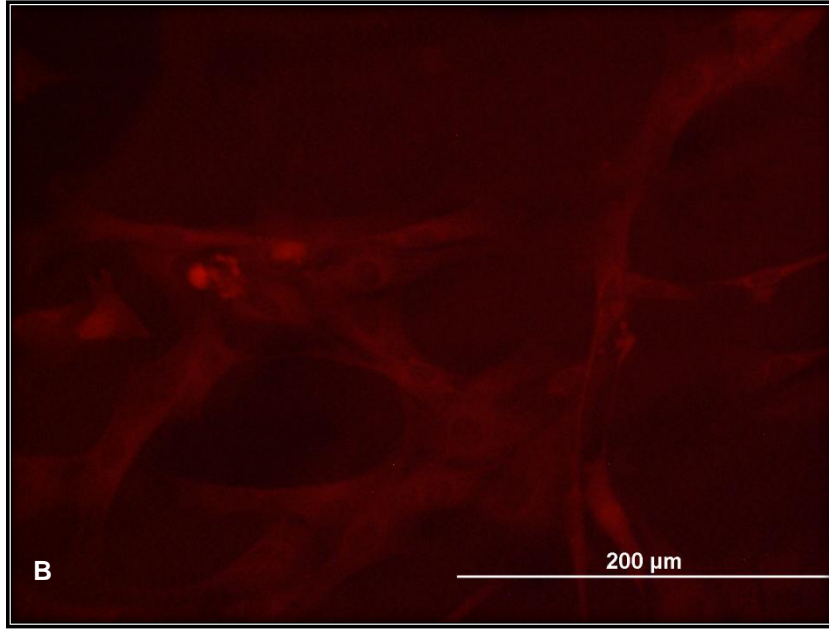
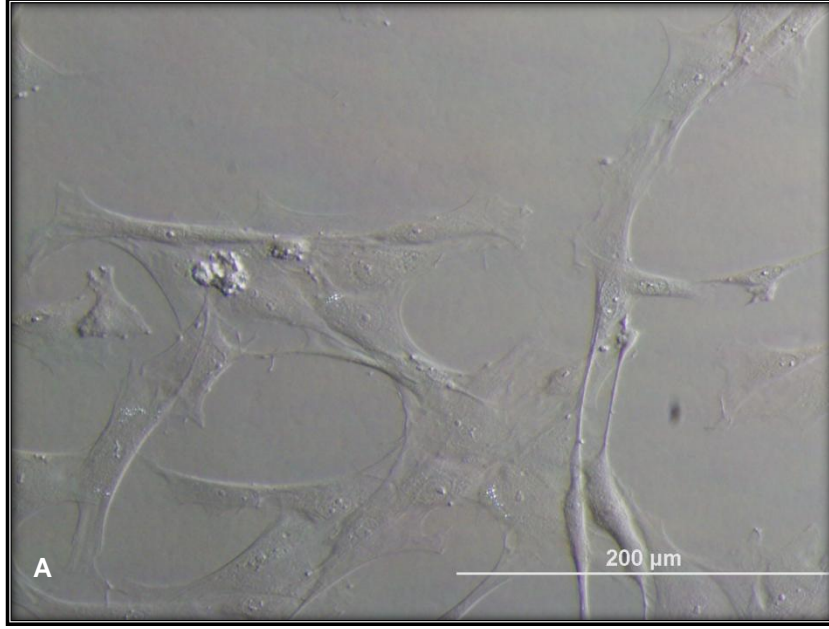
Şekil 4.2.1. 2 Pasaj 6 (P6) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 7'de (P7) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.1.7A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.1.7B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P7 MKH'lerde CD13 yüzey antijenin pozitif ifadesi % 81.931 olarak hesaplanmıştır.



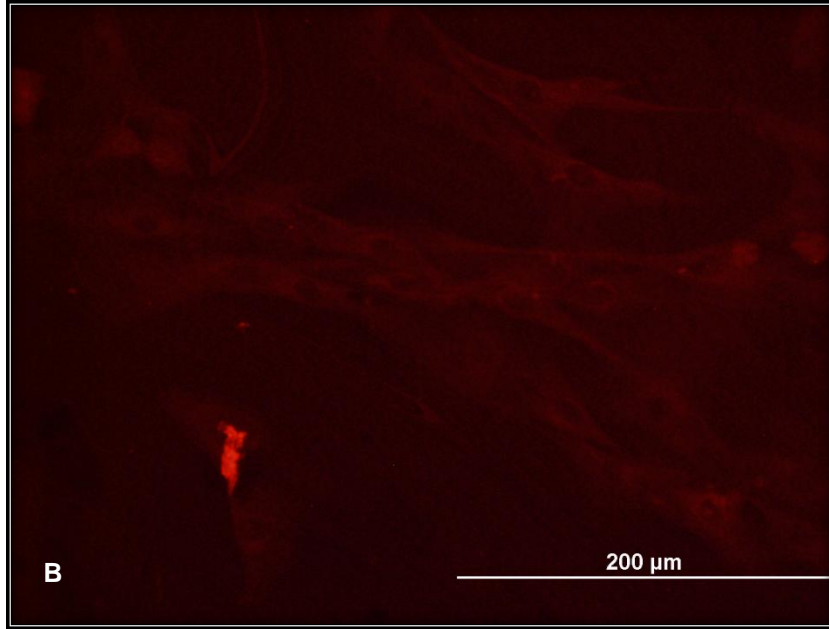
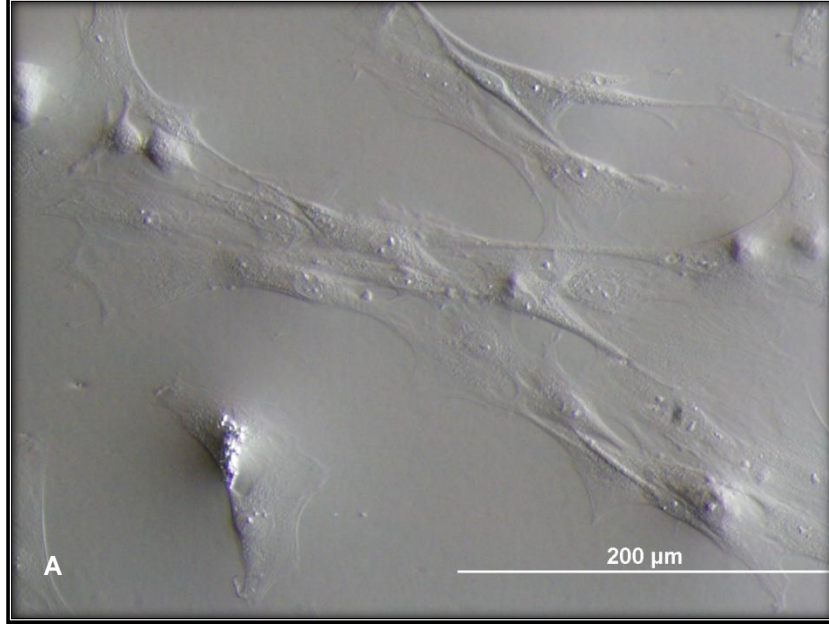
Şekil 4.2.1. 3 Pasaj 7 (P7) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 8'de (P8) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.1.8A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.1.8B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P8 MKH'lerde CD13 yüzey antijenin pozitif ifadesi % 78.546 olarak hesaplanmıştır.



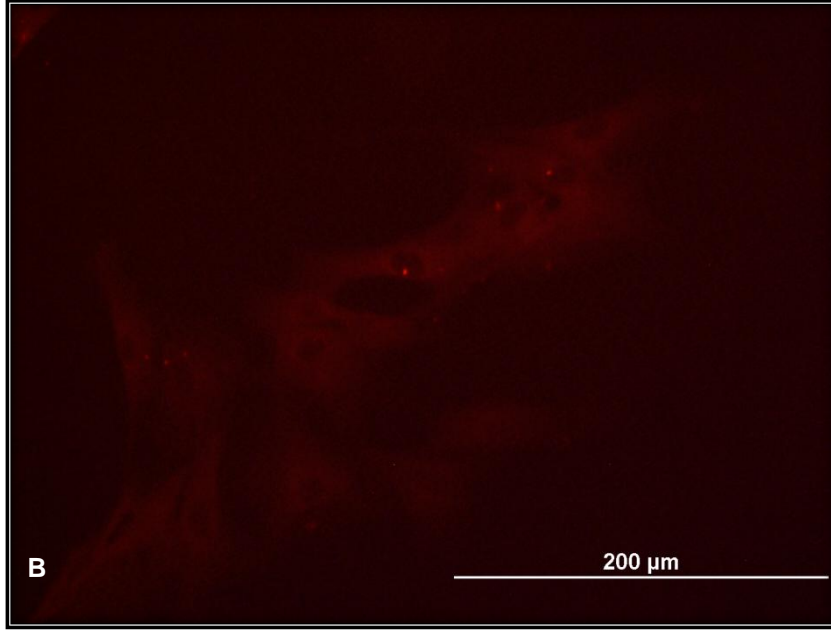
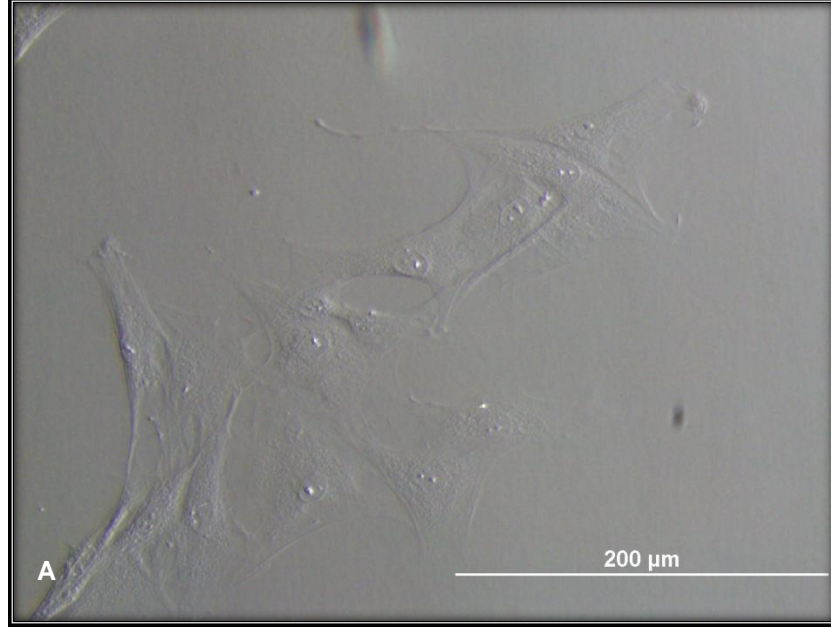
Şekil 4.2.1. 4 Pasaj 8 (P8) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 9'da (P9) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.1.9A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.1.9B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P9 MKH'lerde CD13 yüzey antijenin pozitif ifadesi % 87.825 olarak hesaplanmıştır.



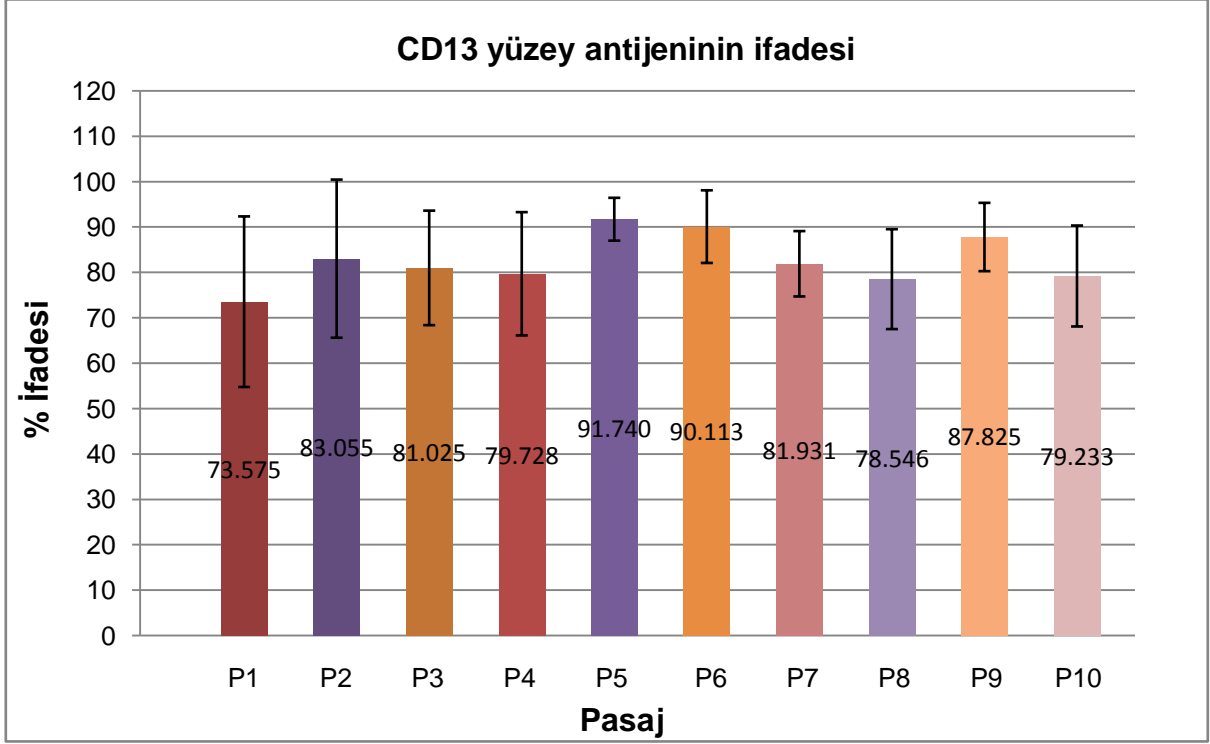
Şekil 4.2.1. 5 Pasaj 9 (P9) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 10'da (P10) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.1.10A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.1.10B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P10 MKH'lerde CD13 yüzey antijenin pozitif ifadesi % 79.233 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.2.1. 6 Pasaj 10 (P10) MKH'lerinde CD13 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

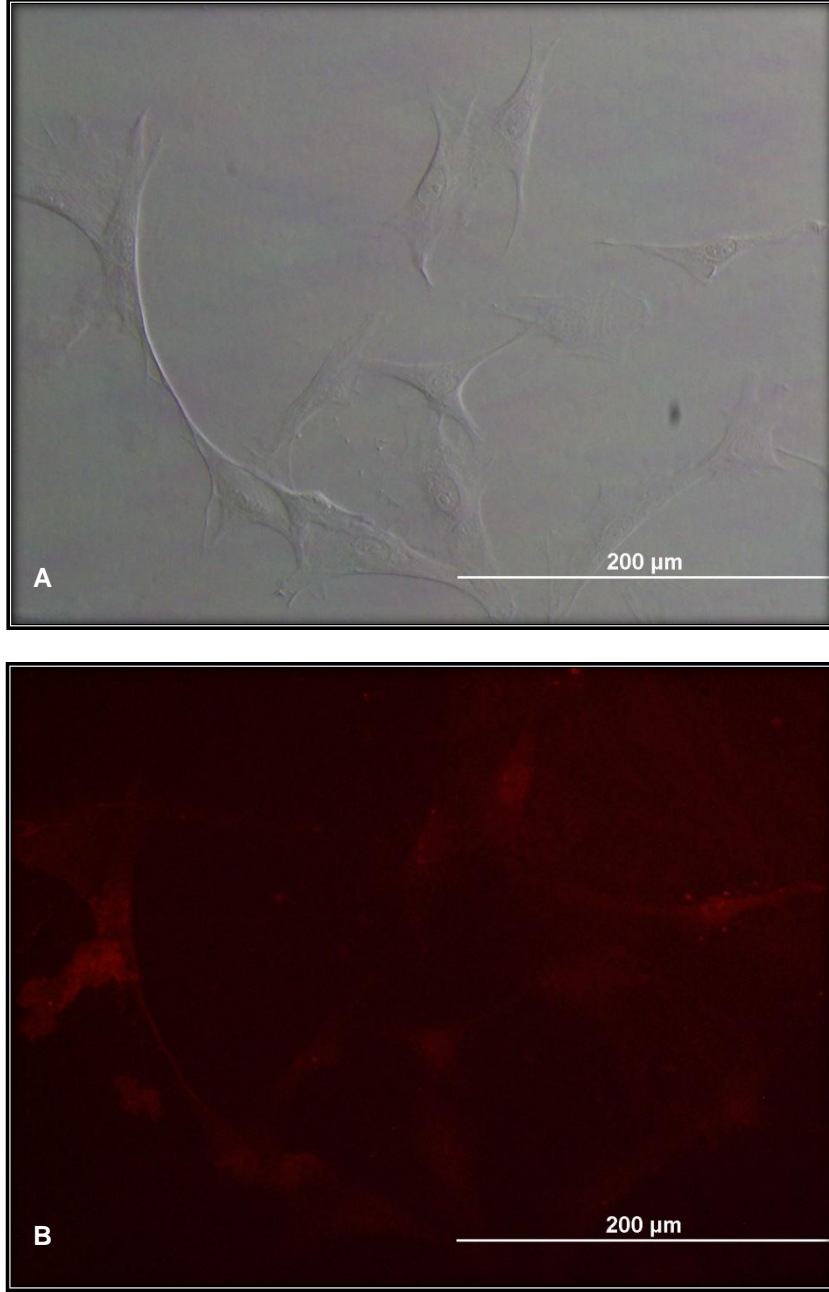
CD13 yüzey antijeninin 10 farklı pasajda % ifadesine bakıldığında (Şekil 4.2.1.11) Independent Samples Kruskal-Wallis Test kullanarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p=0.237$).



Şekil 4.2.1. 11 10 farklı pasajda CD13 yüzey antijeninin ifadesi (%)

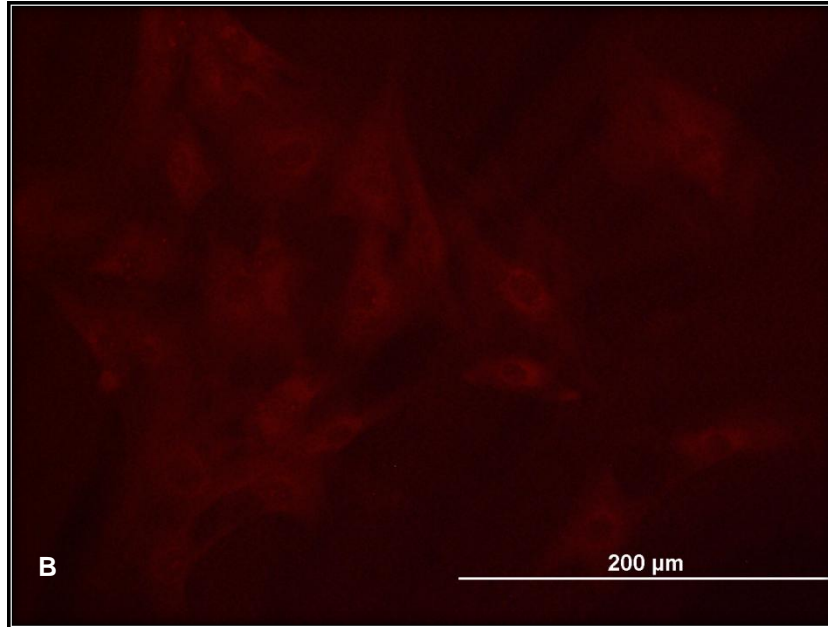
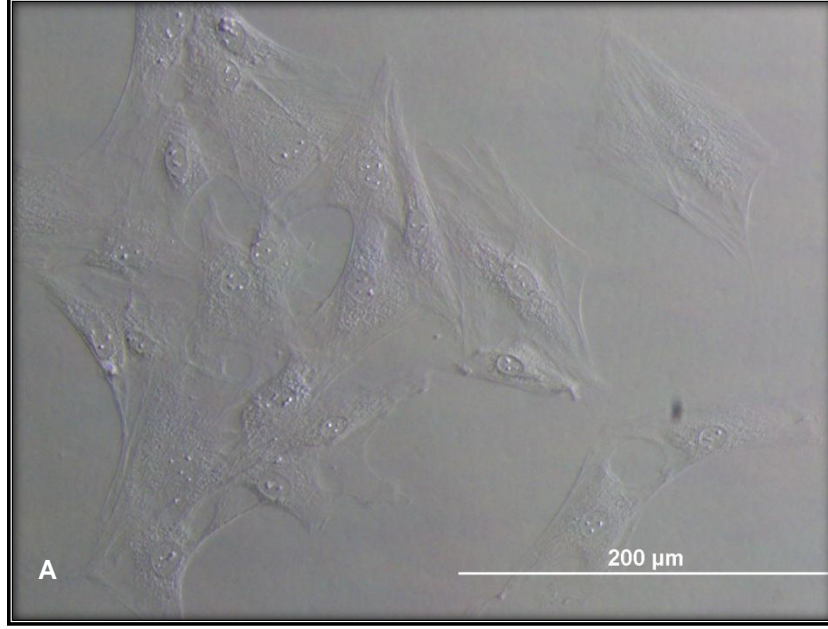
4.2.2. Mezenseşimal Kök Hücrelerin CD29 Yüzey Antijeni ile Karakterizasyonu

Pasaj 1'de (P1) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (şekil 4.2.2.1A) toplam ve floresan boyanmış (şekil 4.2.2.1B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P1 MKH'lerde CD29 yüzey antijenin pozitif ifadesi % 84.880 olarak hesaplanmıştır.



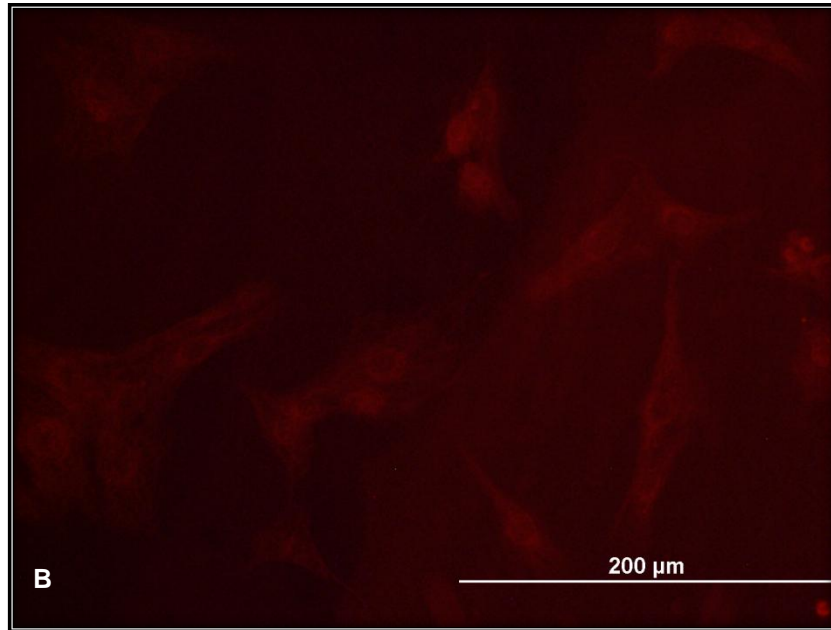
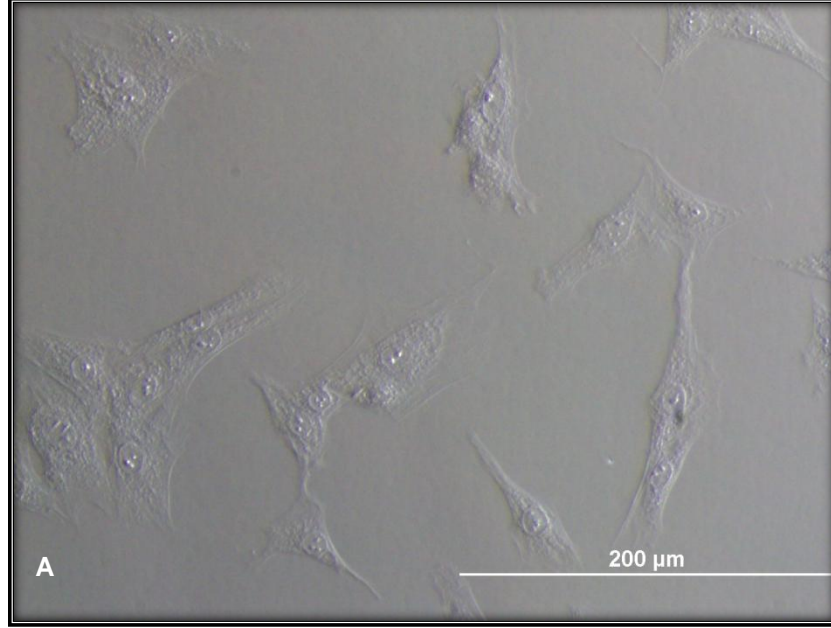
şekil 4.2.2. 1 Pasaj 1 (P1) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 2'de (P2) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.2.A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.2.B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P2 MKH'lerde CD29 yüzey antijenin pozitif ifadesi % 90.268 olarak hesaplanmıştır.



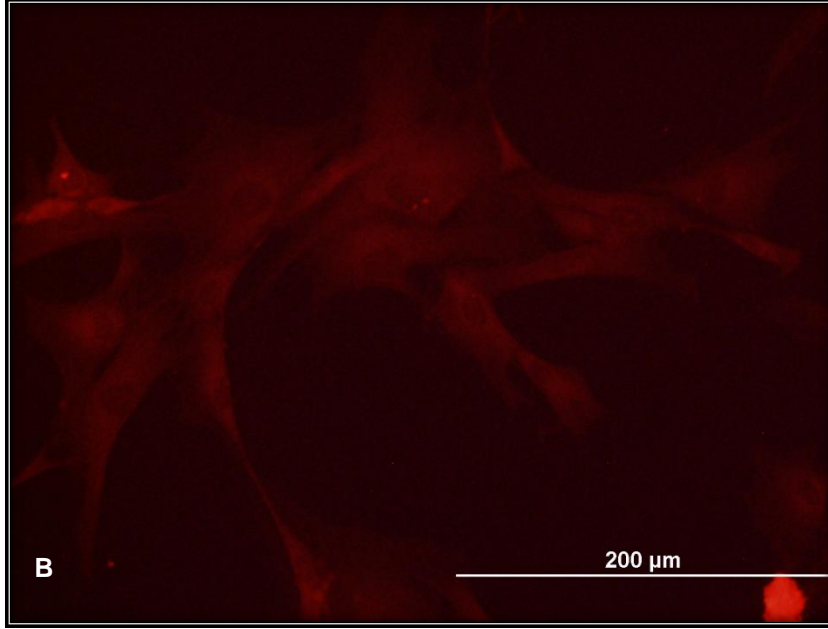
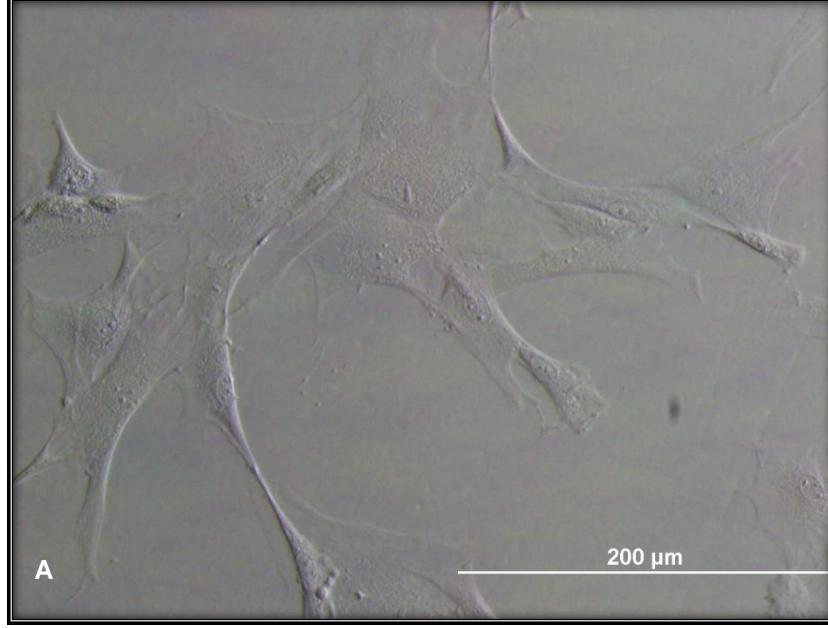
Şekil 4.2.2. 2 Pasaj 2 (P2) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 3'de (P3) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.2.3A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.2.3B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P3 MKH'lerde CD29 yüzey antijenin pozitif ifadesi % 93.021 olarak hesaplanmıştır.



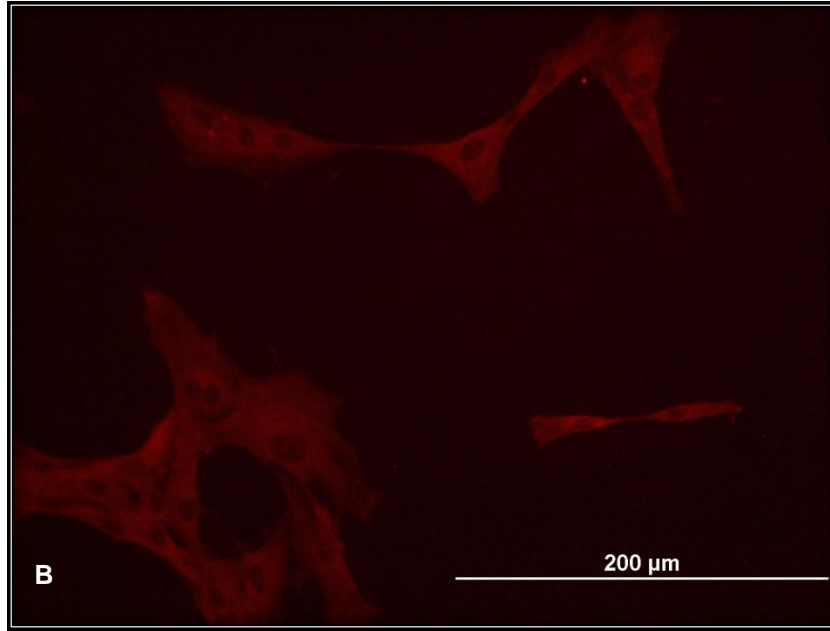
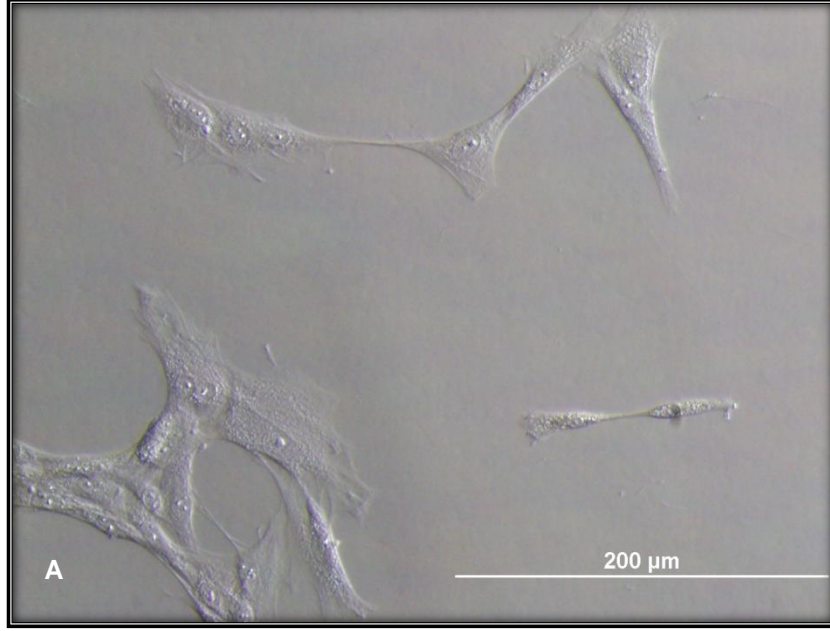
Şekil 4.2.2. 3 Pasaj 3 (P3) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 4'de (P4) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.2.4A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.2.4B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P4 MKH'lerde CD29 yüzey antijenin pozitif ifadesi % 83.753 olarak hesaplanmıştır.



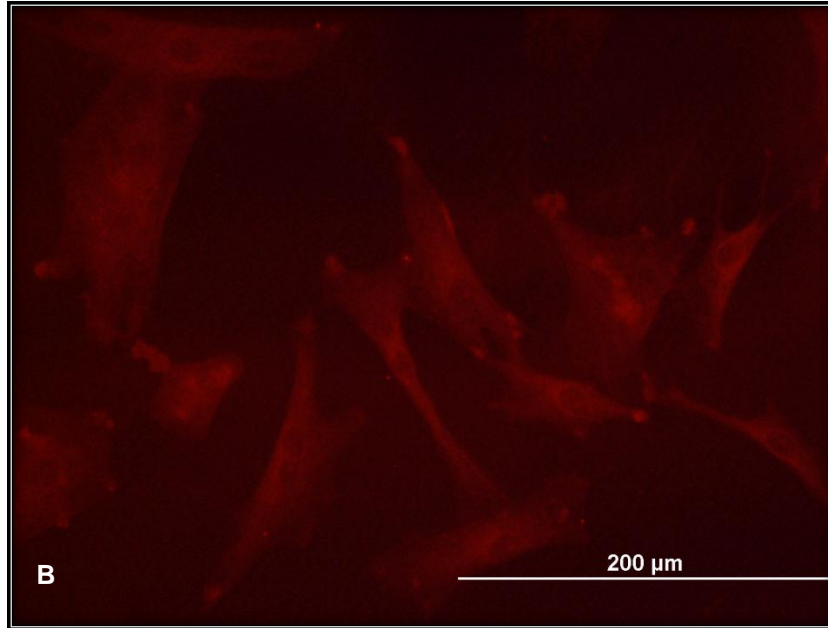
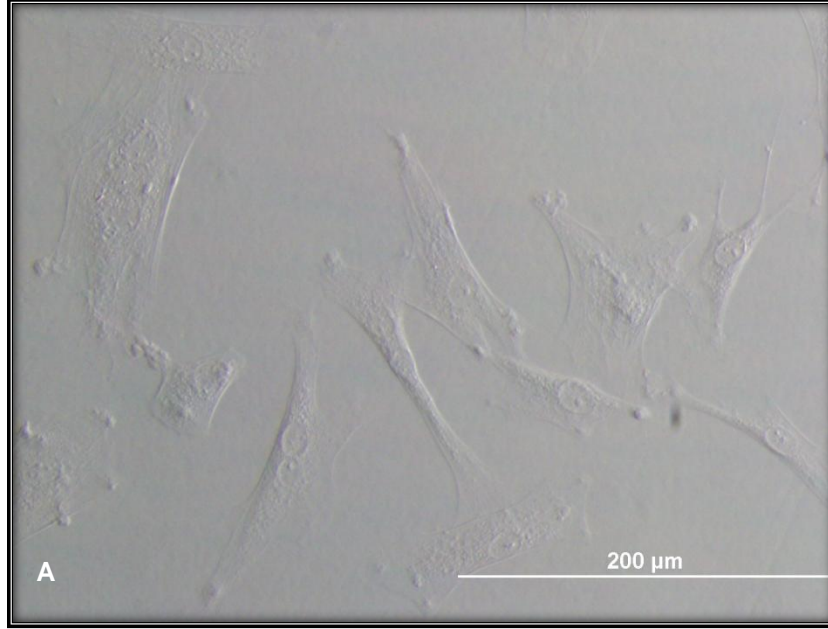
Şekil 4.2.2. 4 Pasaj 4 (P4) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 5'de (P5) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.2.5A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.2.5B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P5 MKH'lerde CD29 yüzey antijeninin pozitif ifadesi % 91.013 olarak hesaplanmıştır.



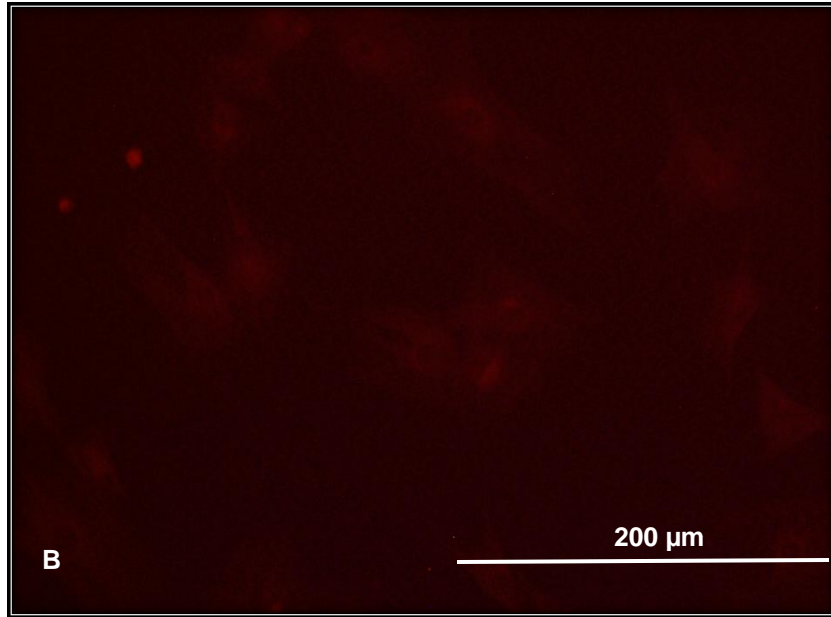
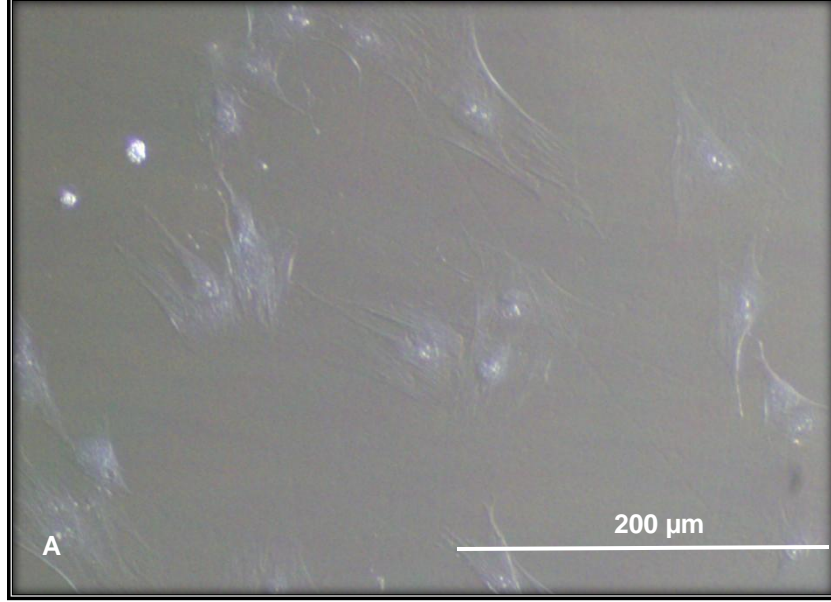
Şekil 4.2.2. 5 Pasaj 5 (P5) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 6'da (P6) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.2.6A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.2.6B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P6 MKH'lerde CD29 yüzey antijeninin pozitif ifadesi % 85.590 olarak hesaplanmıştır.



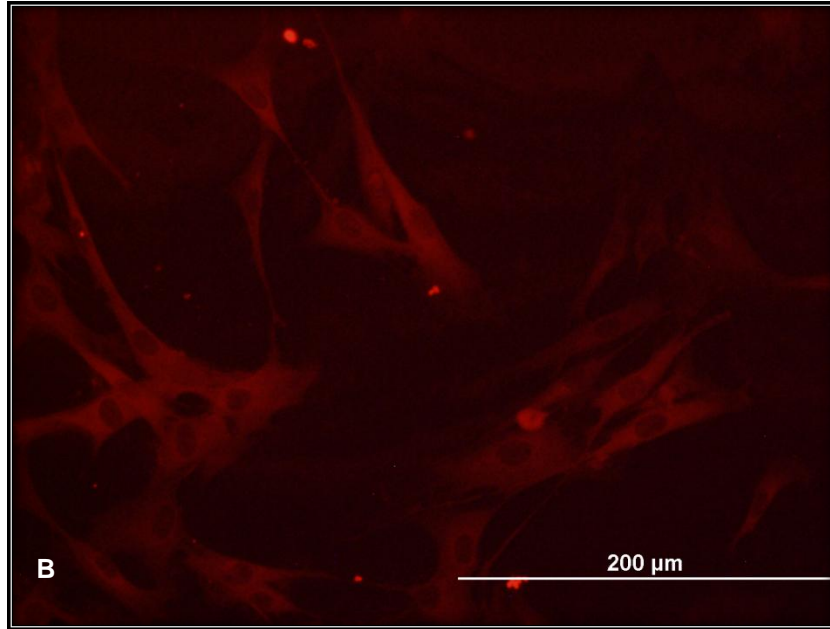
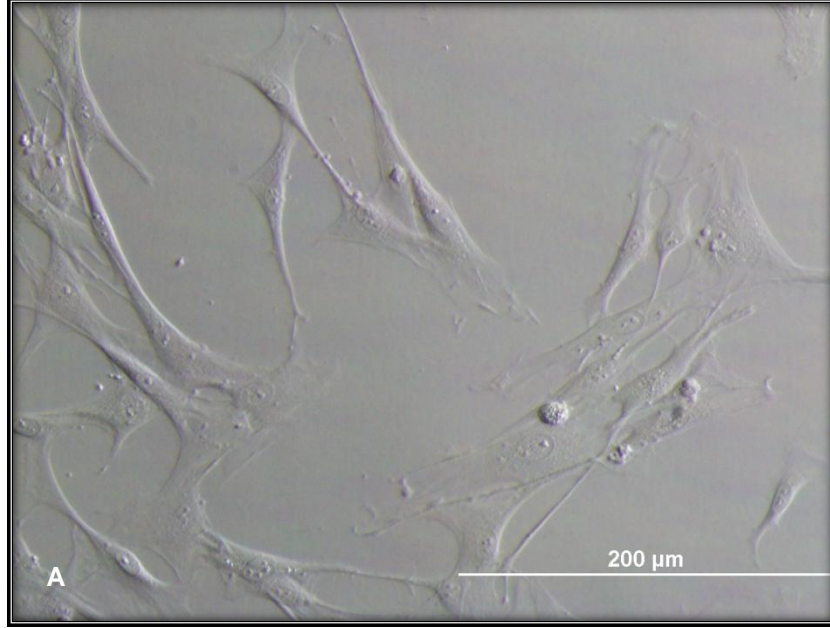
Şekil 4.2.2. 6 Pasaj 6 (P6) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 7'de (P7) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.2.7A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.2.7B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P7 MKH'lerde CD29 yüzey antijeninin pozitif ifadesi % 46.988 olarak hesaplanmıştır.



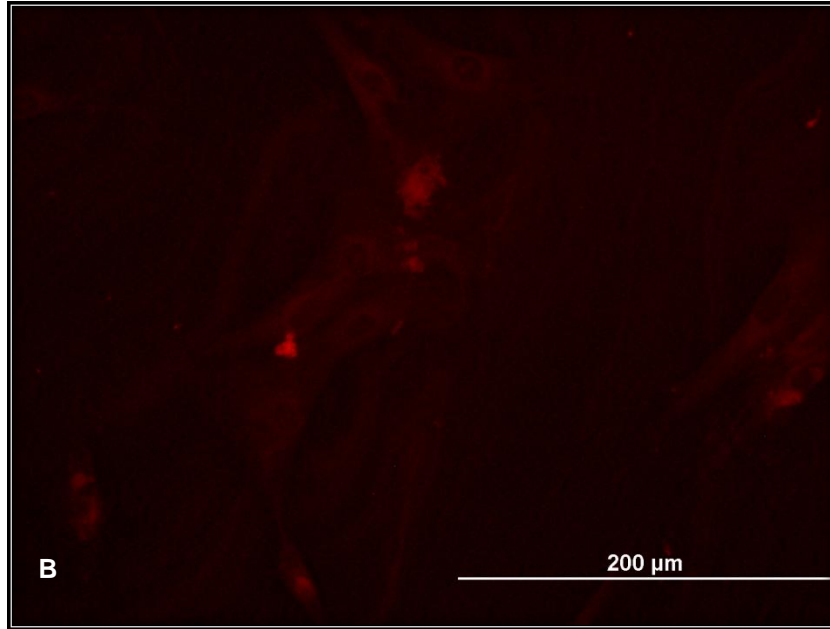
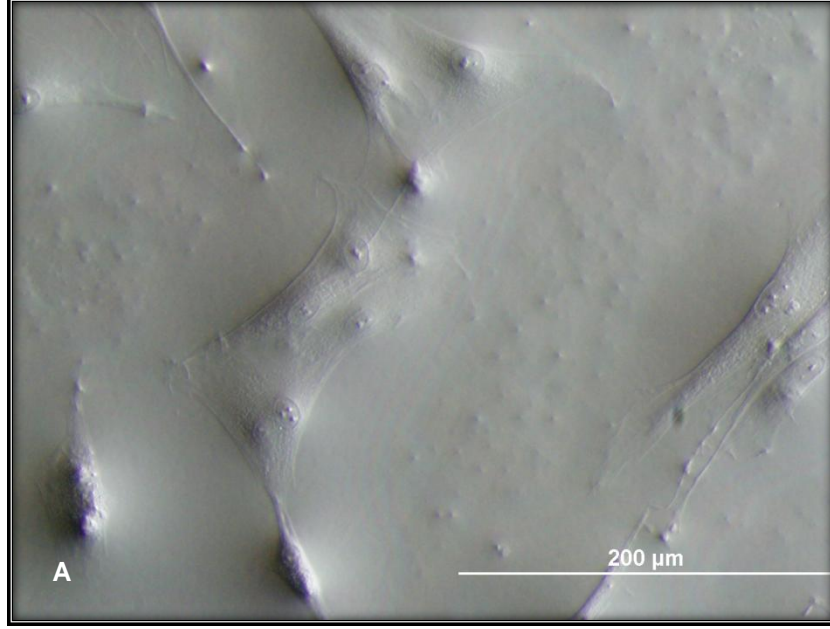
Şekil 4.2.2. 7 Pasaj 7 (P7) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 8'de (P8) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.2.8A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.2.8B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P8 MKH'lerde CD29 yüzey antijenin pozitif ifadesi % 69.571 olarak hesaplanmıştır.



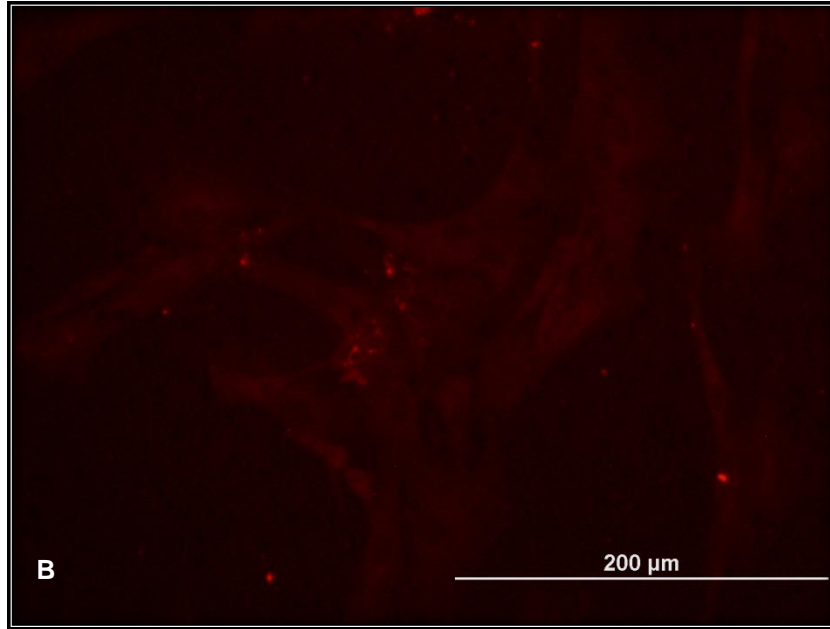
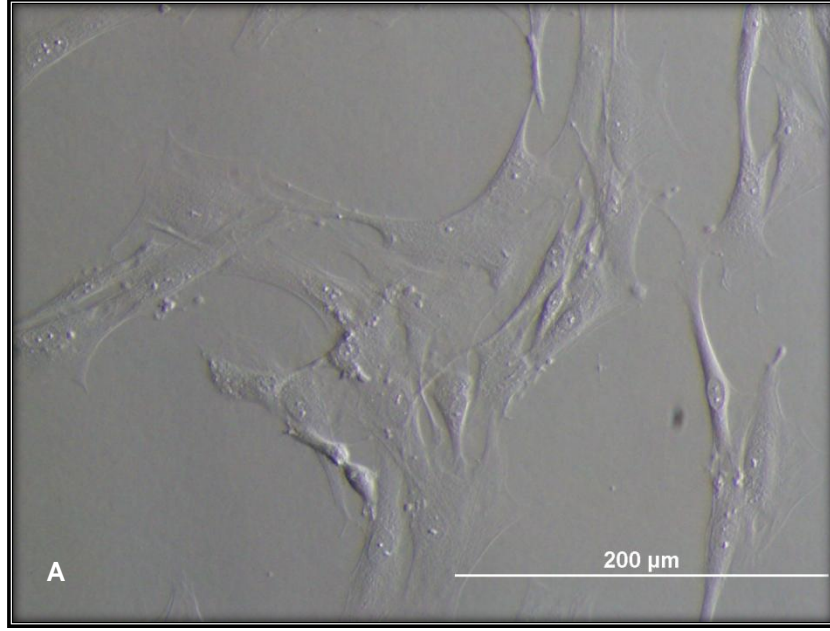
Şekil 4.2.2. 8 Pasaj 8 (P8) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 9'da (P9) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.2.9A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.2.9B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P9 MKH'lerde CD29 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 85.008 olarak hesaplanmıştır.



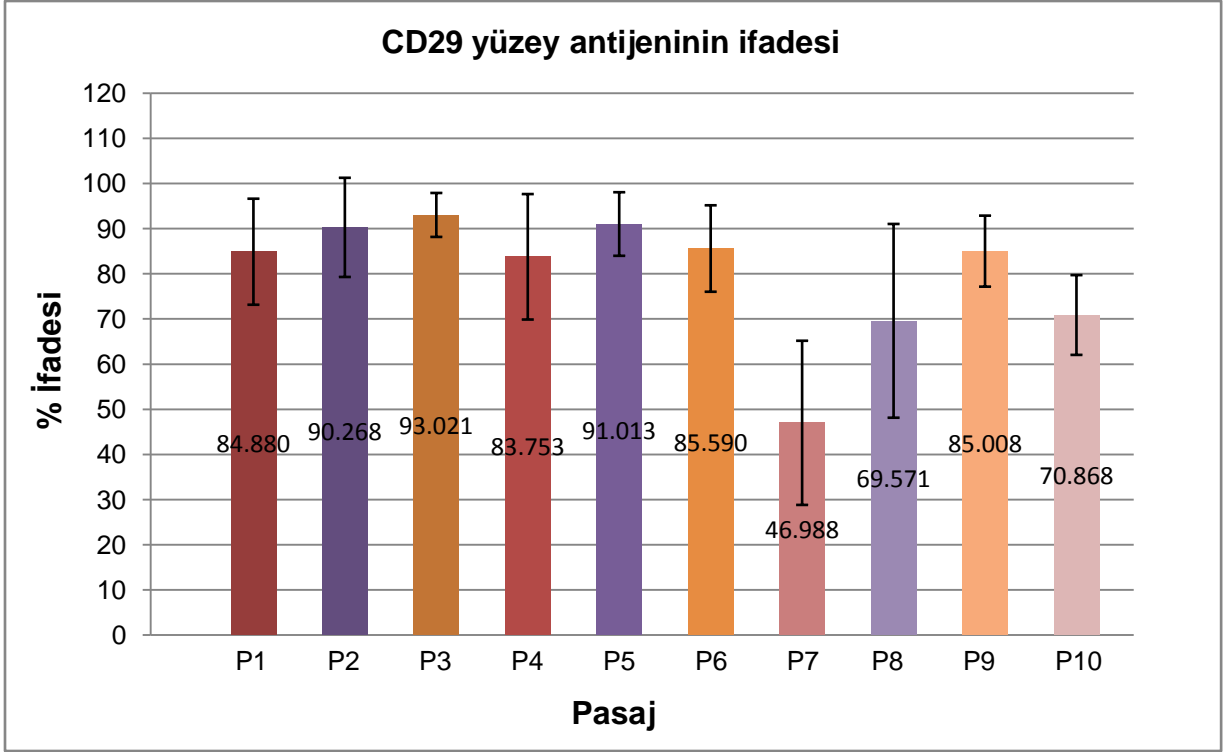
Şekil 4.2.2. 9 Pasaj 9 (P9) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 10'da (P10) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.2.10A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.2.10B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P10 MKH'lerde CD29 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 70.868 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.2.2. 10 Pasaj 10 (P10) MKH'lerinde CD29 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

CD29, yüzey antijenin % ifade oranına bakıldığında (Şekil 4.2.2.11) farklı pasajlarda anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür (p=0.002).



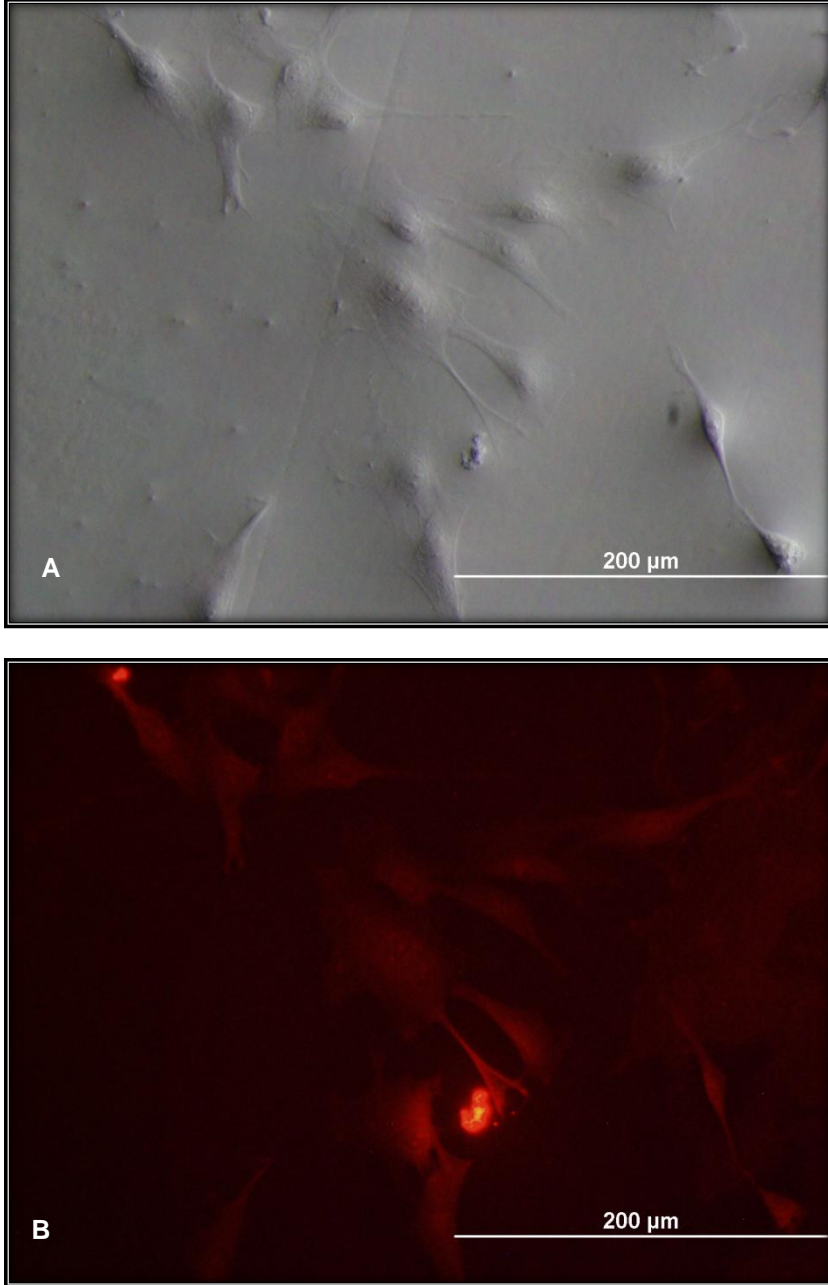
Şekil 4.2.2. 11 10 farklı pasajda CD29 yüzey antijeninin ifadesi (%)

CD 29 yüzey antijenin % ifadesinde P7' de önemli bir düşüş gözlenmektedir. Ancak bazı pasajlar arasında önemli derecede anlamlı farklılık görülmüştür (Çizelge 4.2.2.1).

Pasajlar	P değeri	Pasajlar	P değeri	Pasajlar	P değeri
P7-P1	0.007	P7-P6	0.007	P10-P2	0.014
P7-P2	0.018	P7-P9	0.009	P10-P3	0.007
P7-P3	0.006	P8-P2	0.039	P10-P5	0.017
P7-P4	0.006	P8-P3	0.020		
P7-P5	0.022	P8-P5	0.044		

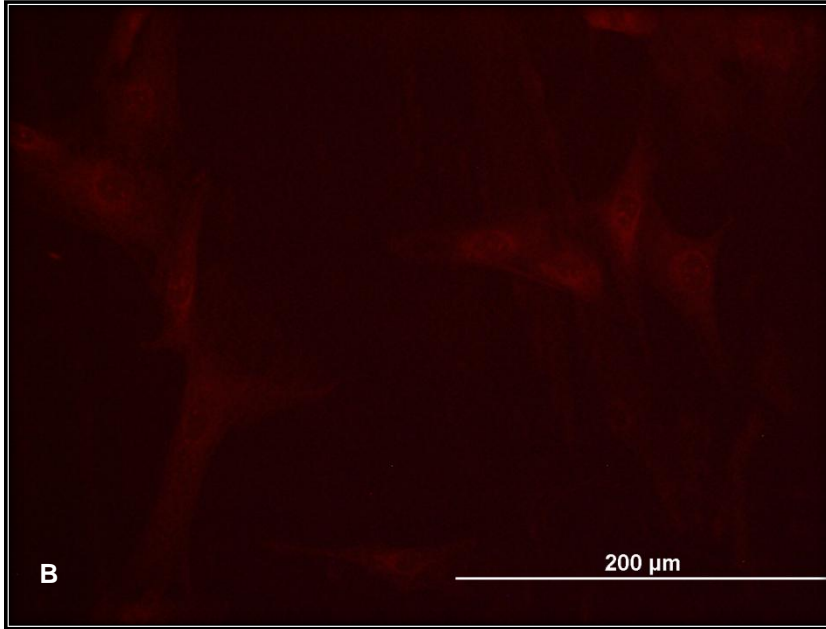
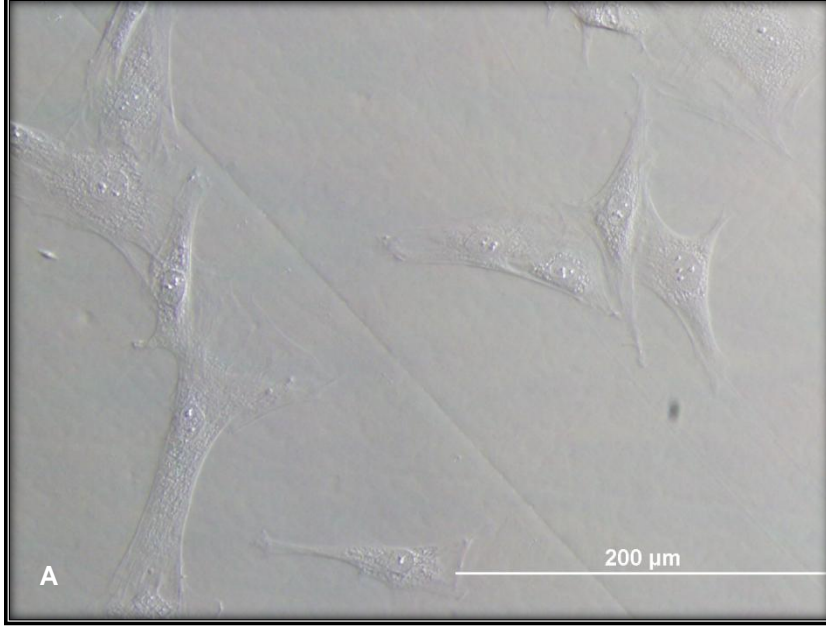
4.2.3. Mezenseşimal Kök Hücrelerin CD54 Yüzey Antijeni ile Karakterizasyonu

Pasaj 1'de (P1) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (şekil 4.2.3.1A) toplam ve floresan boyanmış (şekil 4.2.3.1B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P1 MKH'lerde CD54 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 84.870 olarak hesaplanmıştır.



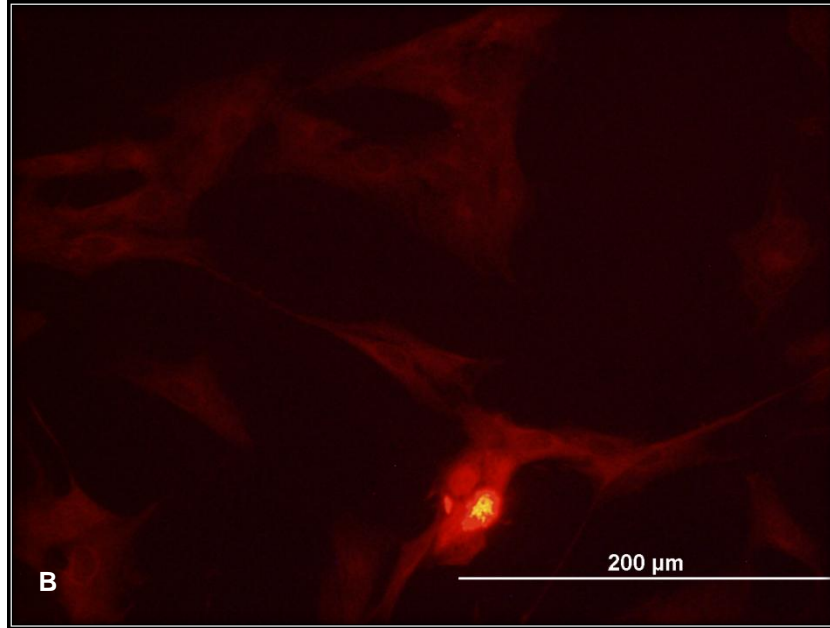
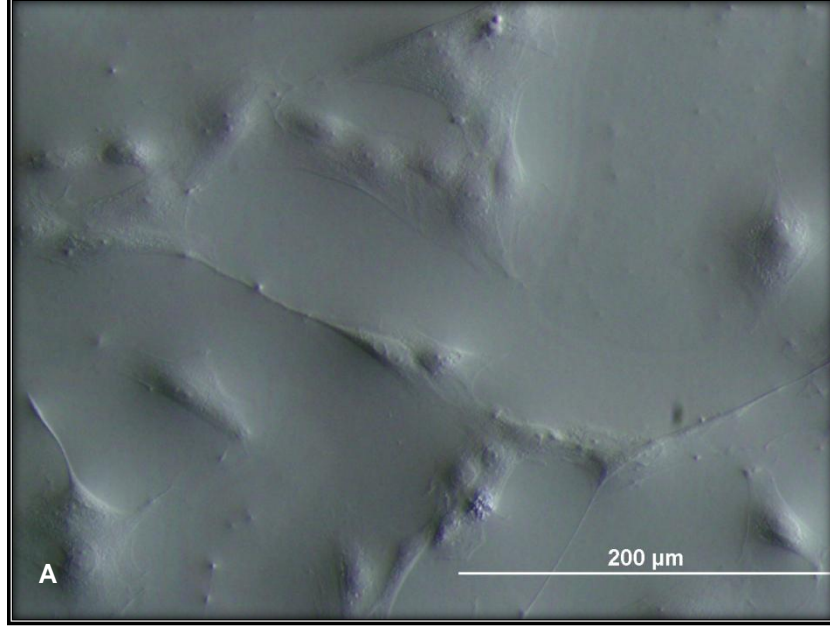
şekil 4.2.3. 1 Pasaj 1 (P1) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 2'de (P2) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.3.2A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.3.2B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P2 MKH'lerde CD54 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 75.298 olarak hesaplanmıştır.



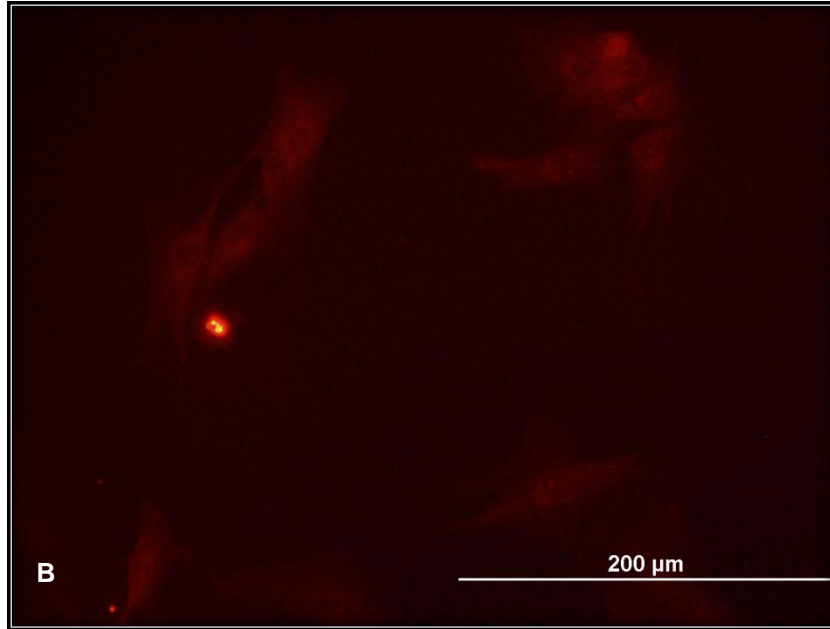
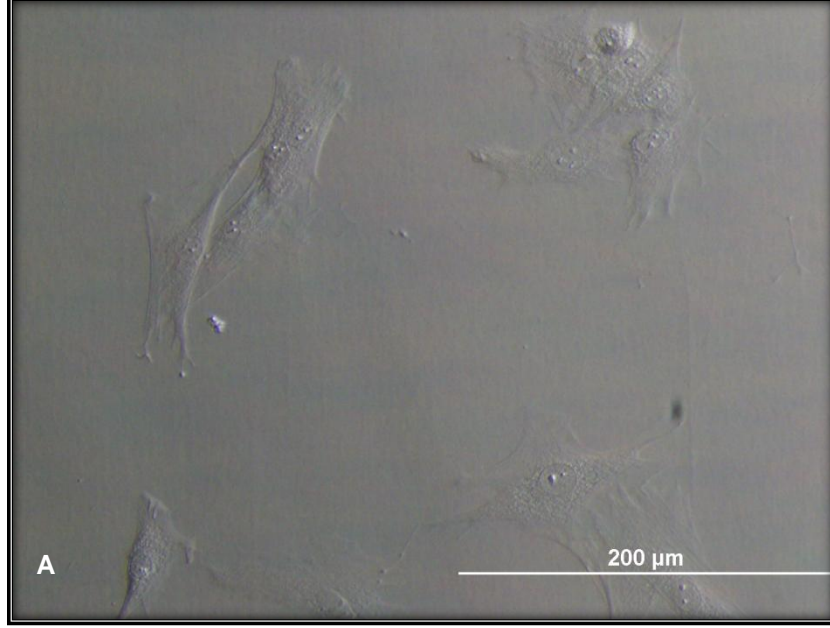
Şekil 4.2.3. 2 Pasaj 2 (P2) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 3'de (P3) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.3.3A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.3.3B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P3 MKH'lerde CD54 yüzey antijeninin pozitif ifade oranı % 82.461 olarak hesaplanmıştır.



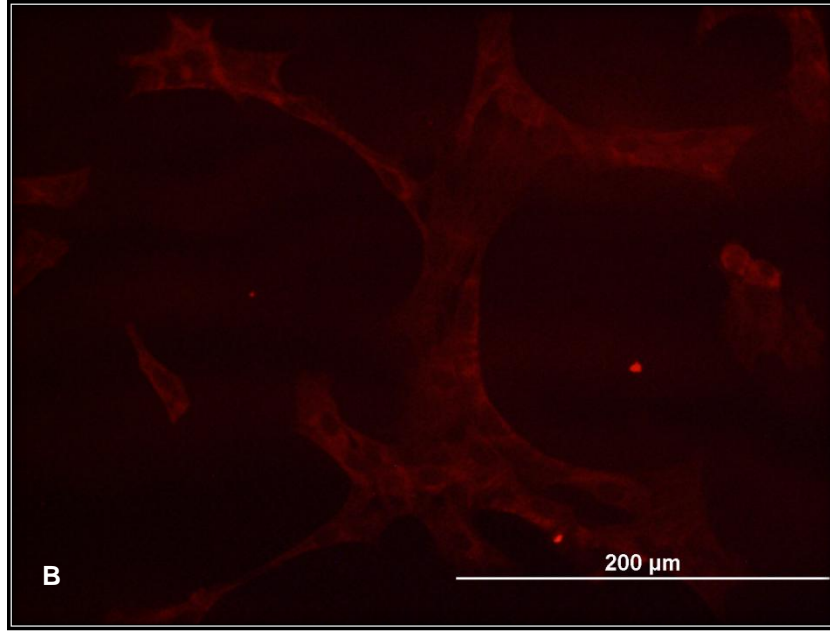
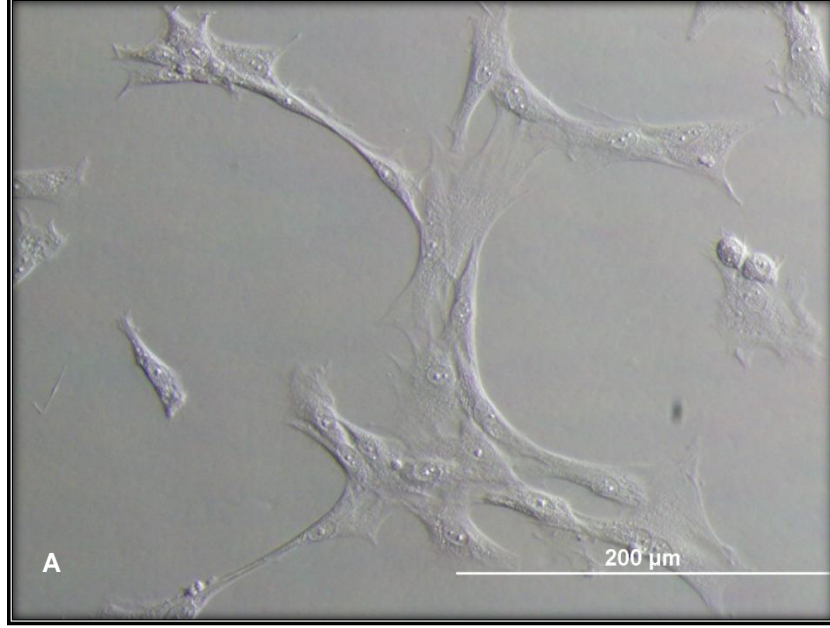
Şekil 4.2.3. 3 Pasaj 3 (P3) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 4'de (P4) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.3.4A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.3.4B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P4 MKH'lerde CD54 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 76.220 olarak hesaplanmıştır.



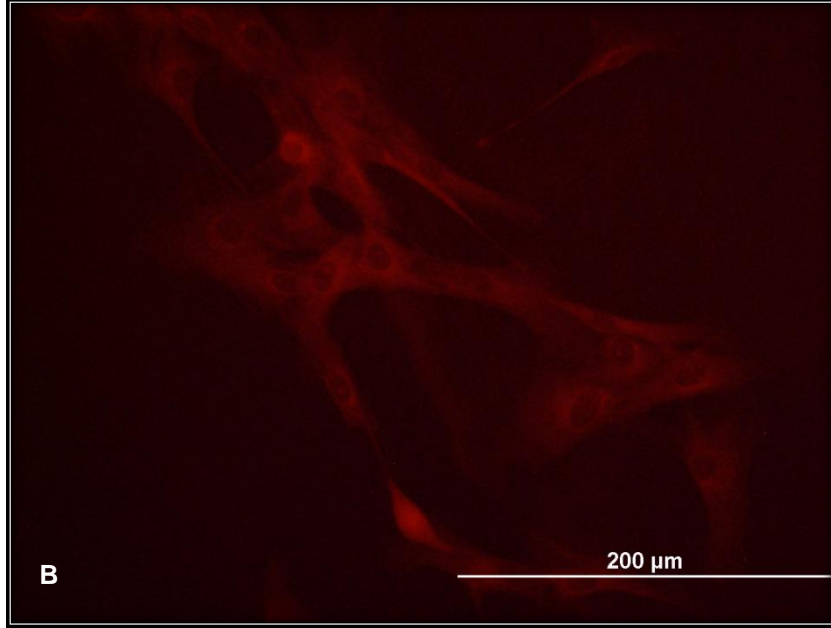
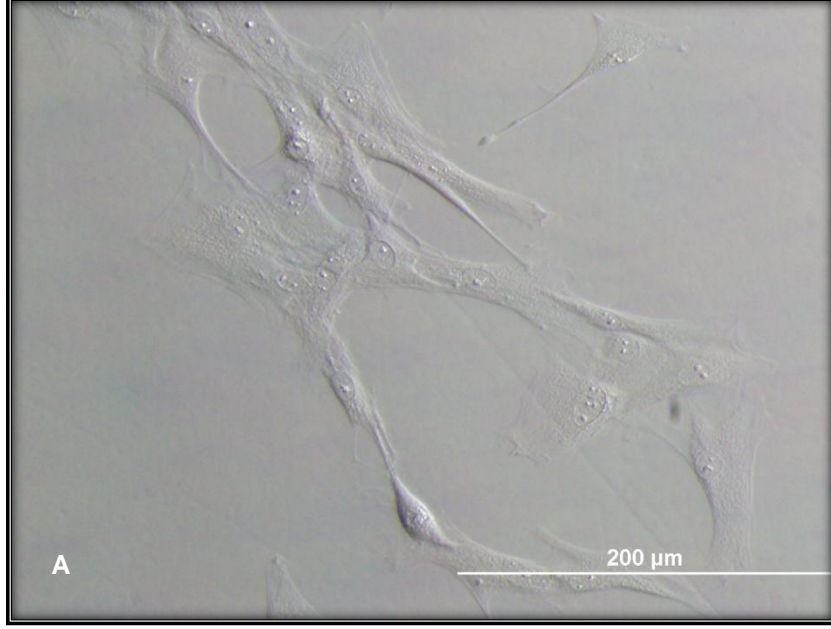
Şekil 4.2.3. 4 Pasaj 4 (P4) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 5'de (P5) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.3.5A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.3.5B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P5 MKH'lerde CD54 yüzey antijeninin pozitif ifade oranı % 75.811 olarak hesaplanmıştır.



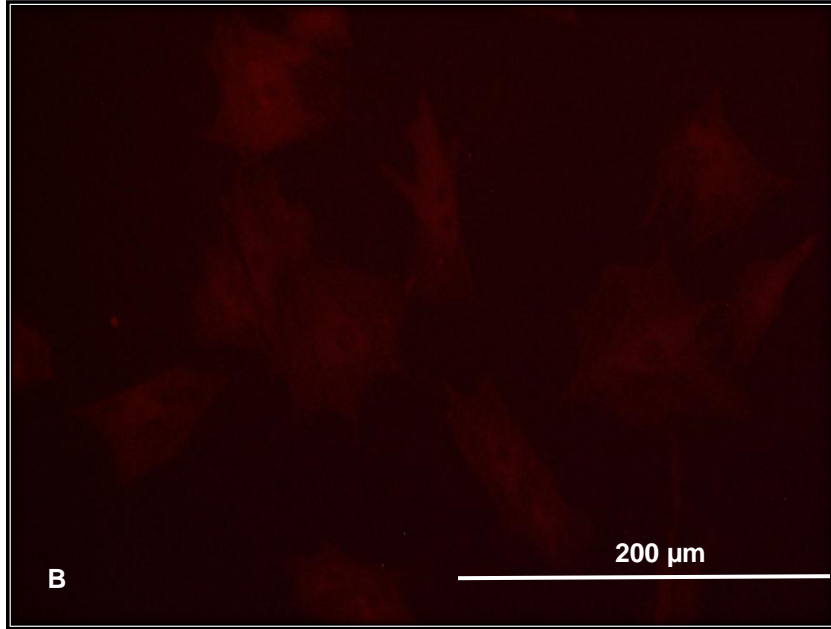
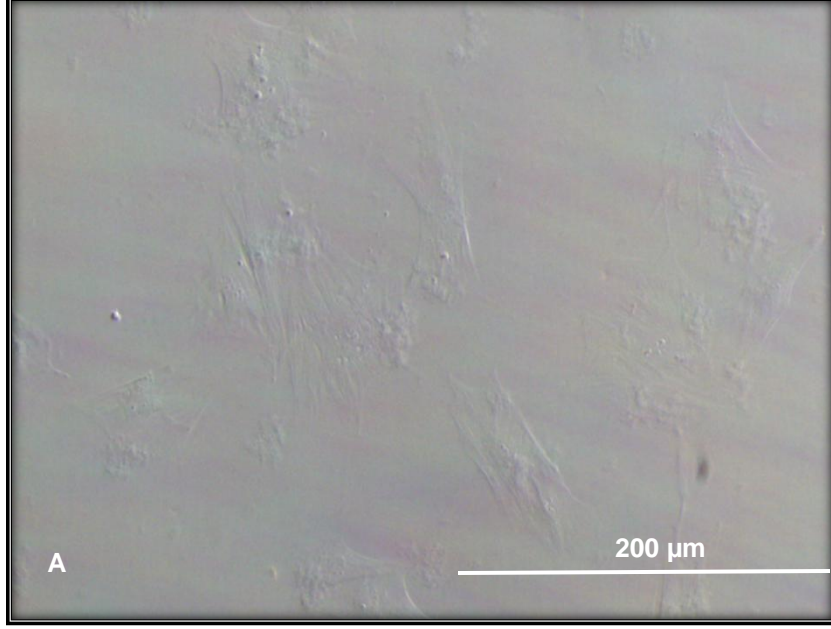
Şekil 4.2.3. 5 Pasaj 5 (P5) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 6'da (P6) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.3.6A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.3.6B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P6 MKH'lerde CD54 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 76.128 olarak hesaplanmıştır.



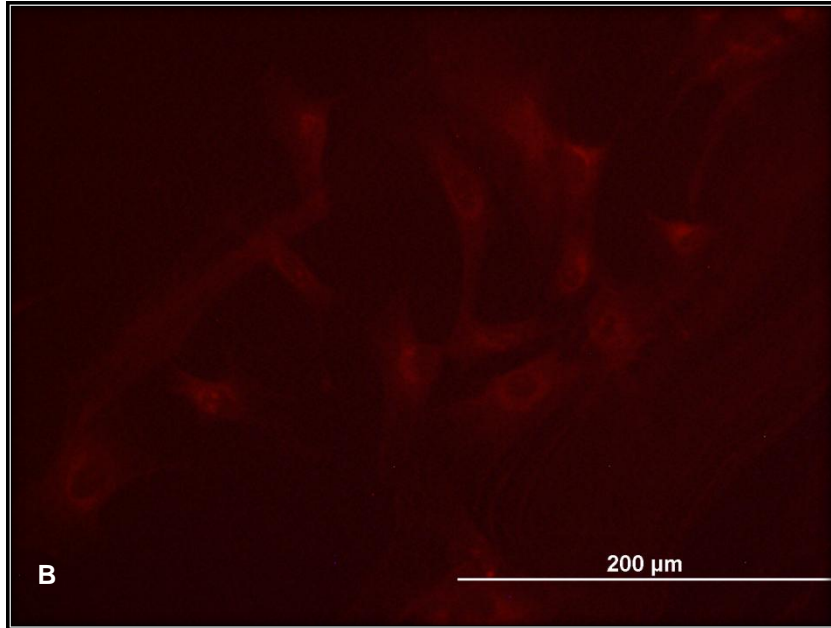
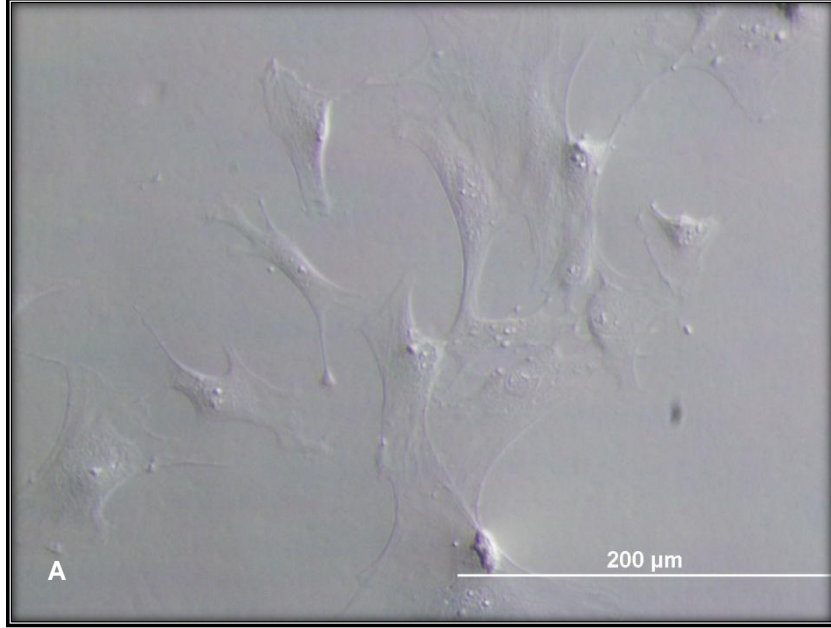
Şekil 4.2.3. 6 Pasaj 6 (P6) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 7'de (P7) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.3.7A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.3.7B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P7 MKH'lerde CD54 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 61.520 olarak hesaplanmıştır.



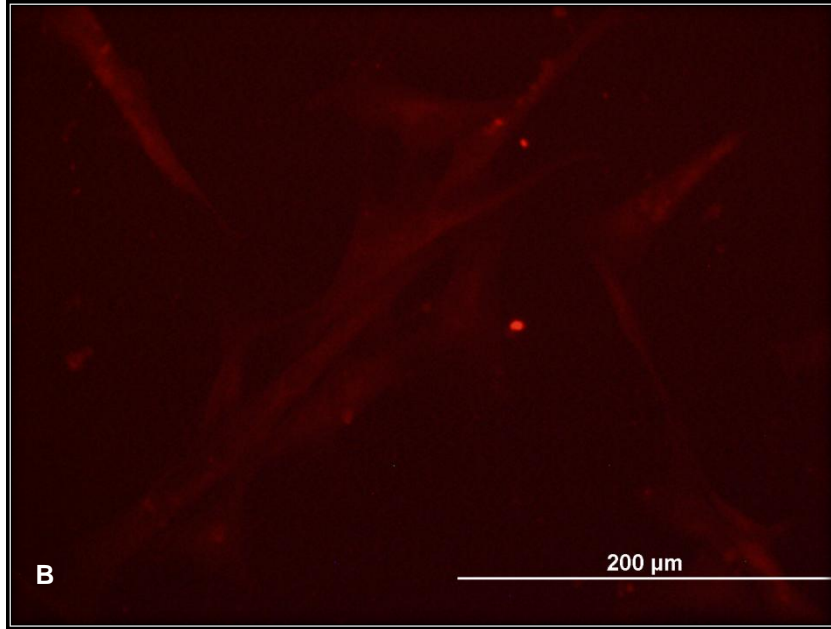
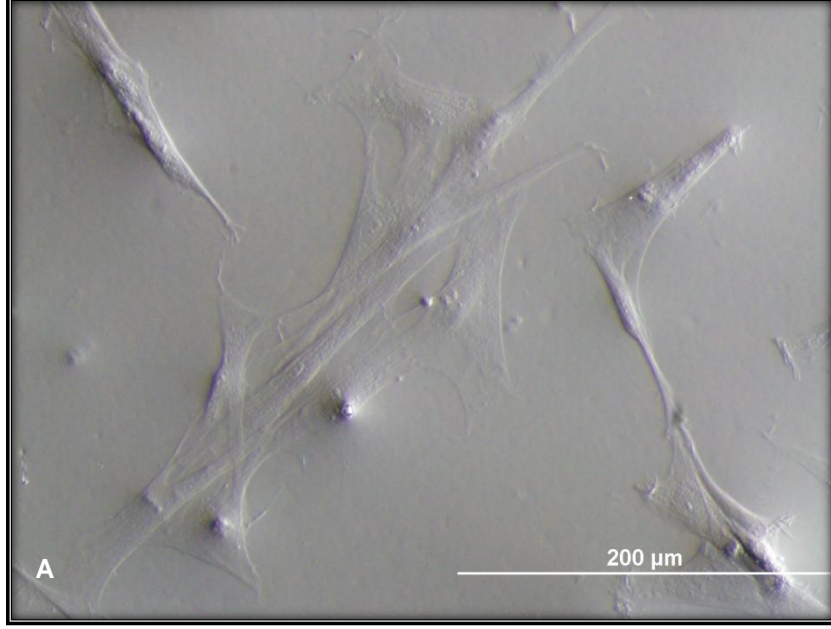
Şekil 4.2.3. 7 Pasaj 7 (P7) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 8'de (P8) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.3.8A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.3.8B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P8 MKH'lerde CD54 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 65.686 olarak hesaplanmıştır.



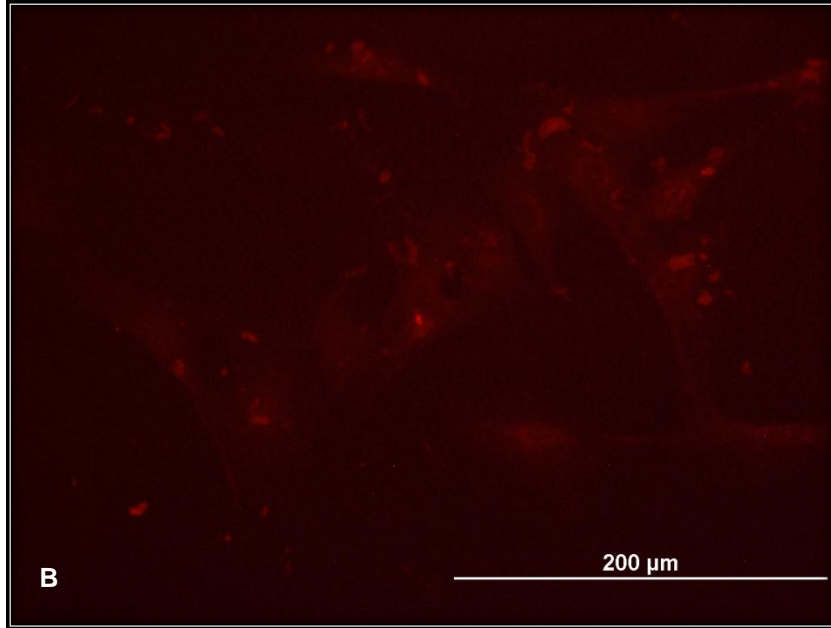
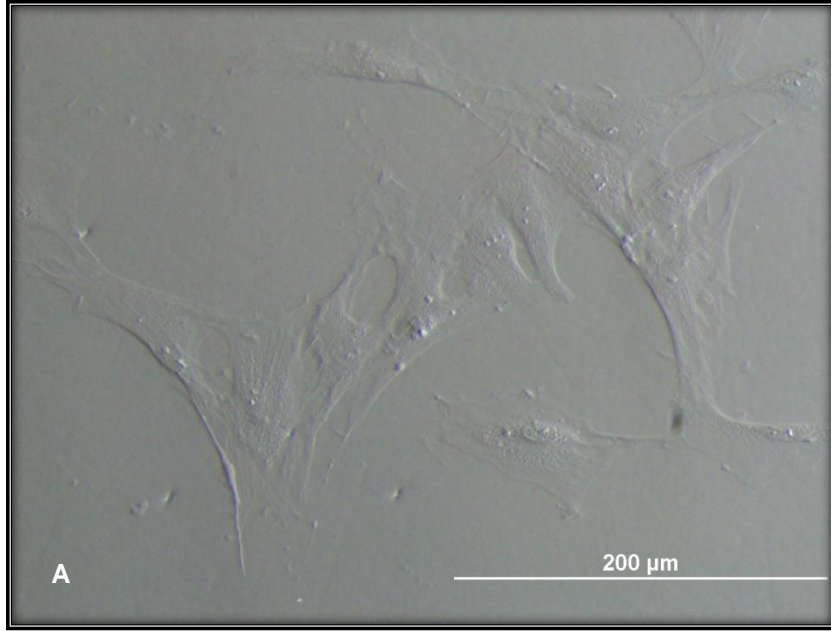
Şekil 4.2.3. 8 Pasaj 8 (P8) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 9'da (P9) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.3.9A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.3.9B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P9 MKH'lerde CD54 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 75.675 olarak hesaplanmıştır.



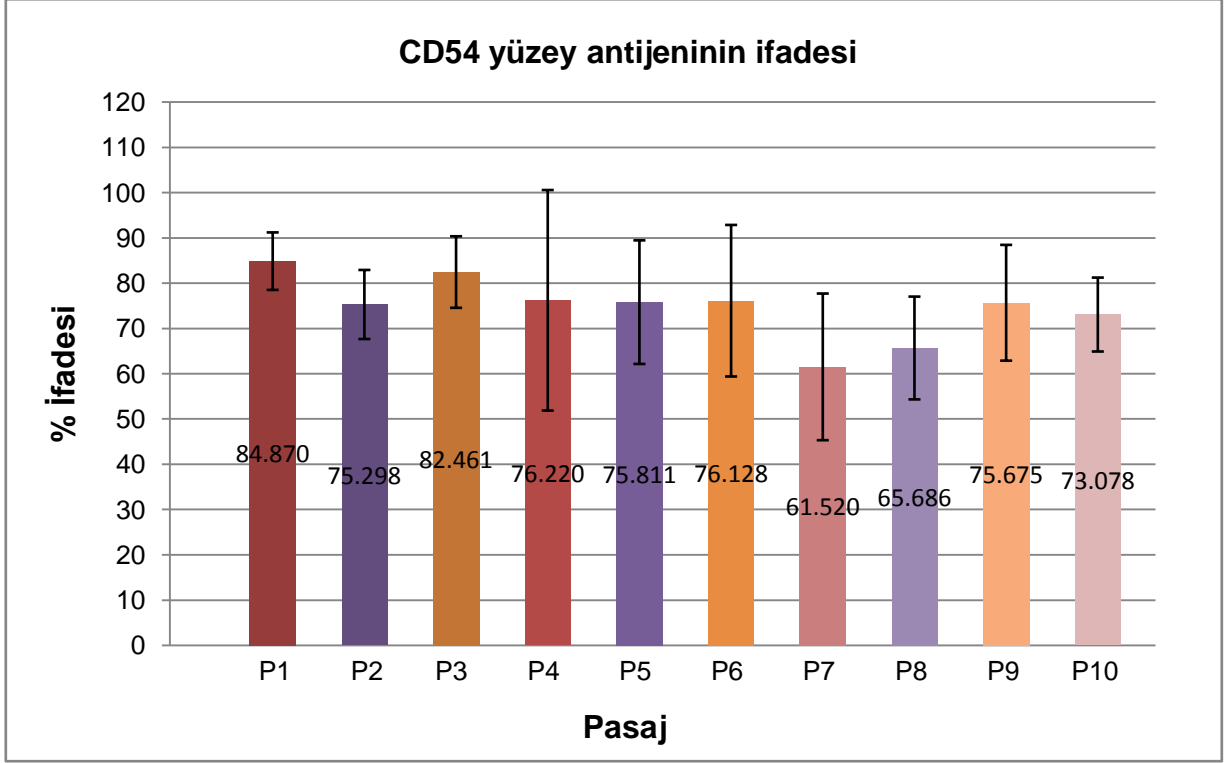
Şekil 4.2.3. 9 Pasaj 9 (P9) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 10'da (P10) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.3.10A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.3.10B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P10 MKH'lerde CD54 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 73.078 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.2.3. 10 Pasaj 10 (P10) MKH'lerinde CD54 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

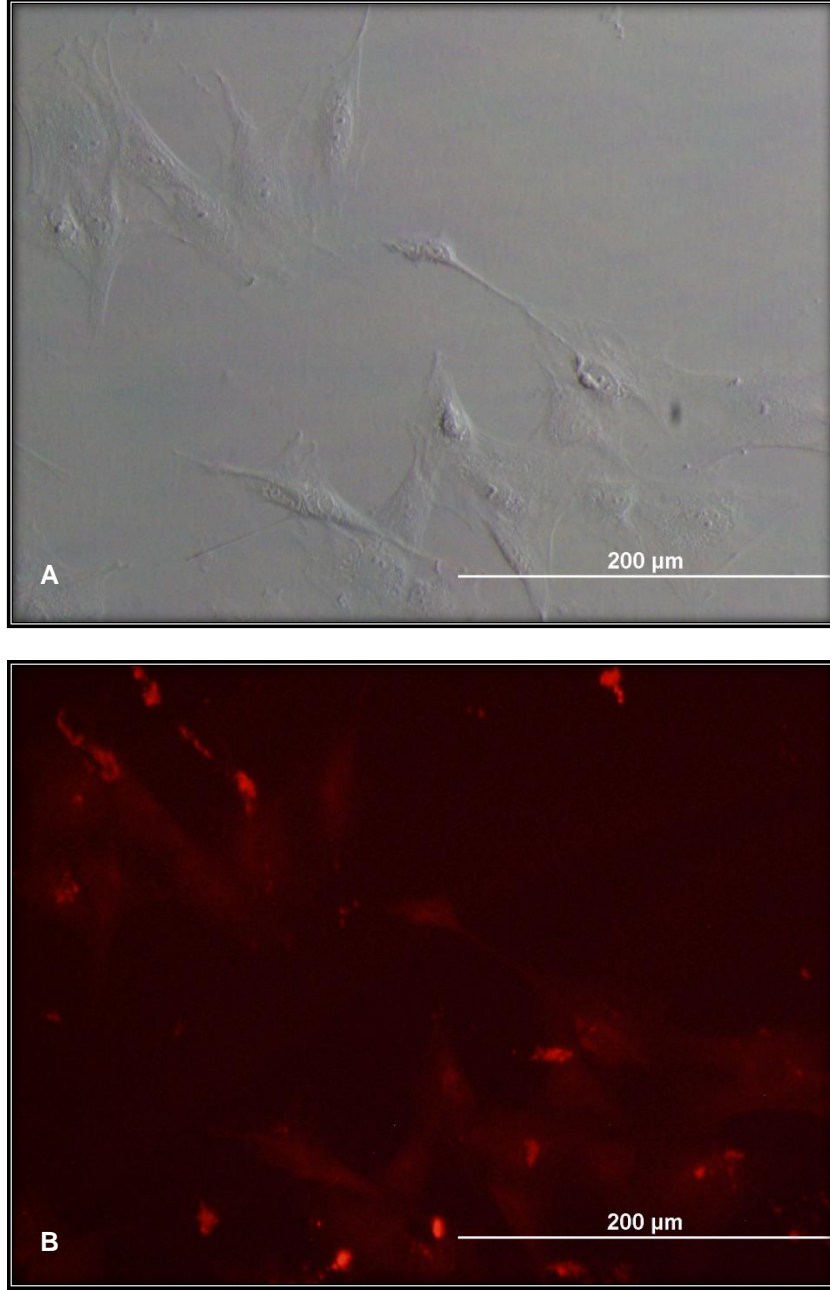
CD 54 yüzey antijeninin de ifadesinde, farklı pasajlarda (Şekil 4.2.3.11) bir farklılık olmadığı gözlenmiştir (p=0.123).



Şekil 4.2.3. 11 10 farklı pasajda CD54 yüzey antijeninin ifadesi (%)

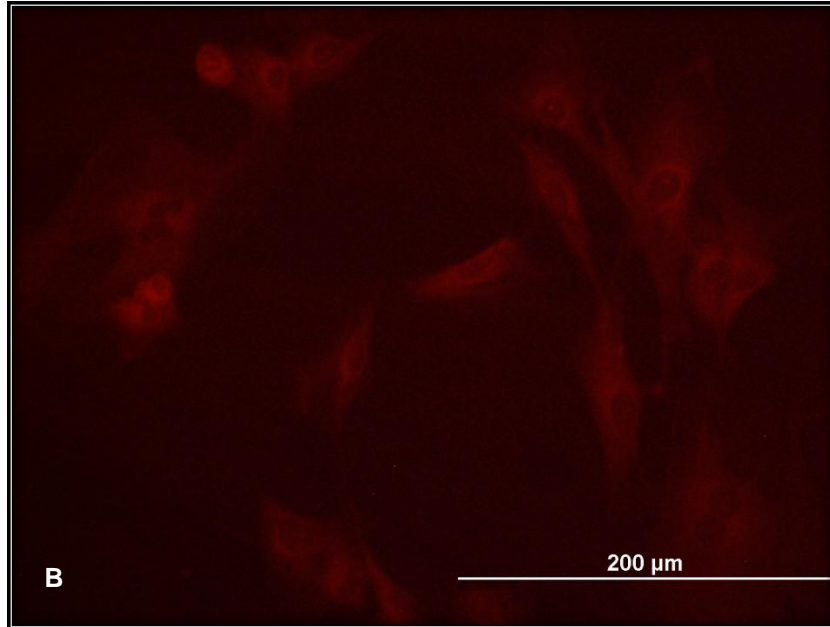
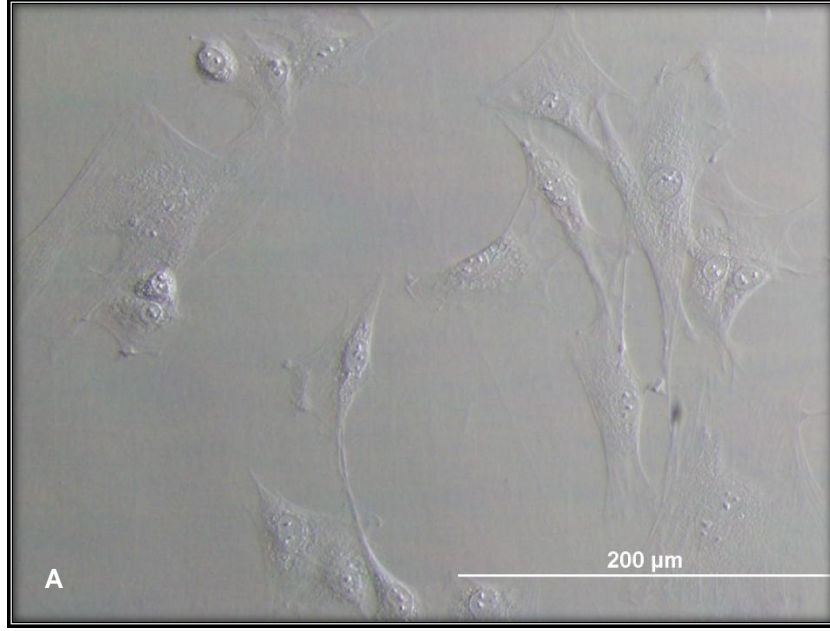
4.2.4. Mezenşimal Kök Hücrelerin CD90 Yüzey Antijeni ile Karakterizasyonu

Pasaj 1'de (P1) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.4.1A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.4.1B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P1 MKH'lerde CD90 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 77.001 olarak hesaplanmıştır.



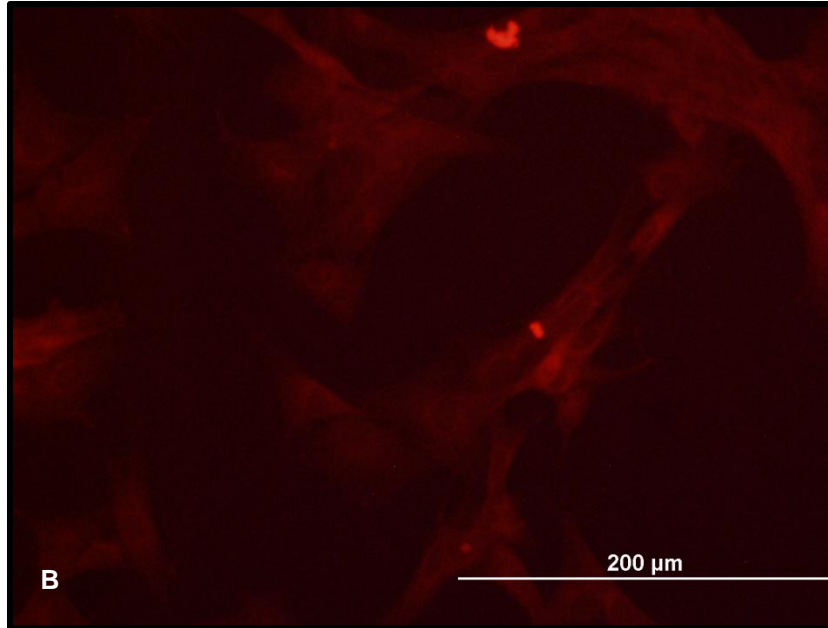
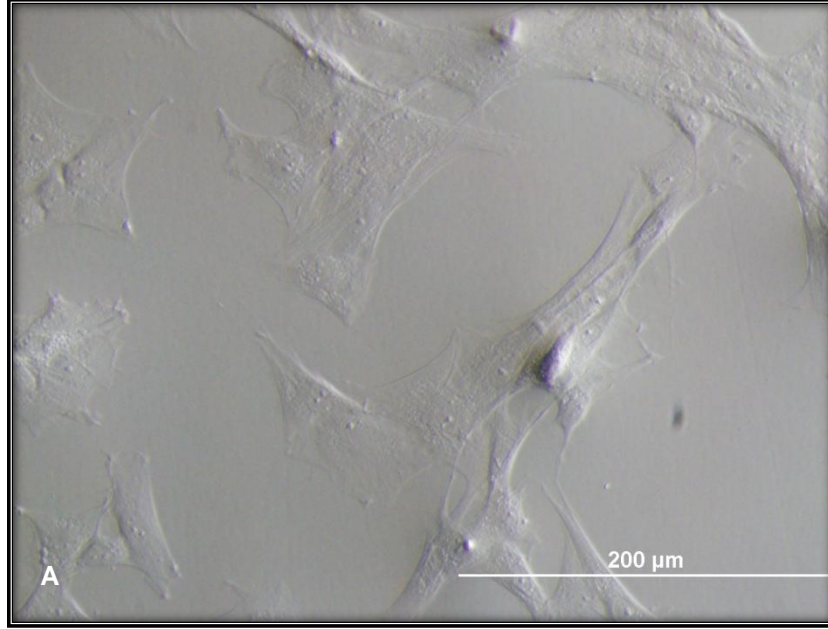
Şekil 4.2.4. 1 Pasaj 1 (P1) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 2'de (P2) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.4.2A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.4.2B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P2 MKH'lerde CD90 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 84.093 olarak hesaplanmıştır.



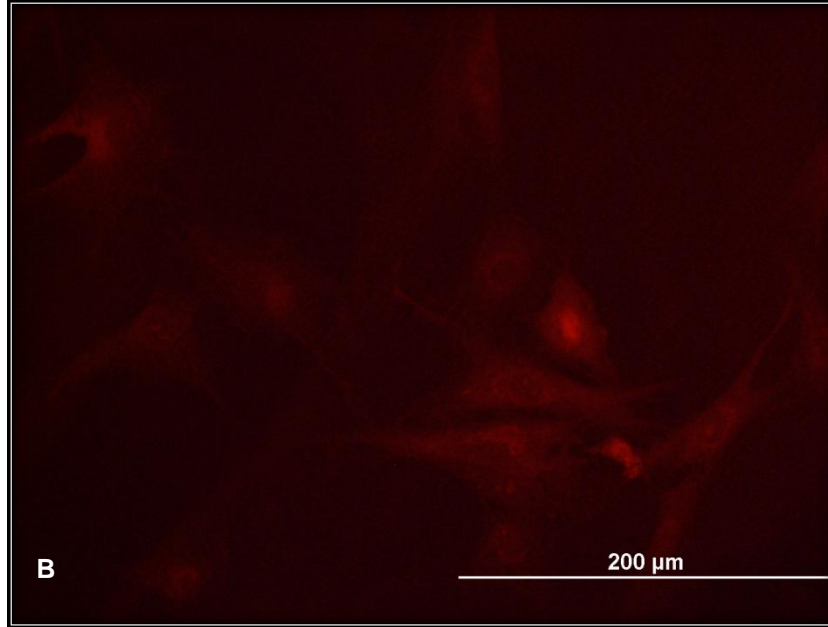
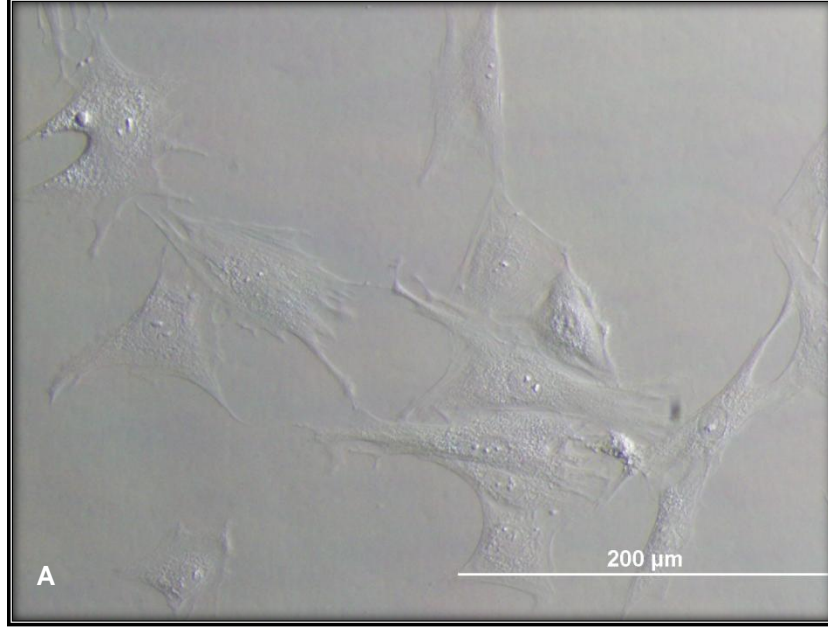
Şekil 4.2.4. 2 Pasaj 2 (P2) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 3'de (P3) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.4.3A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.4.3B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P3 MKH'lerde CD90 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 85.390 olarak hesaplanmıştır.



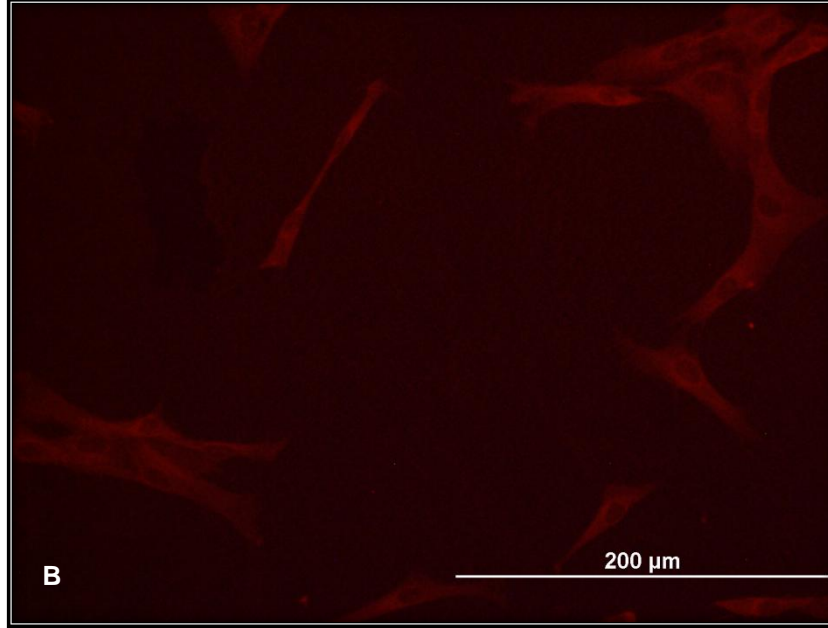
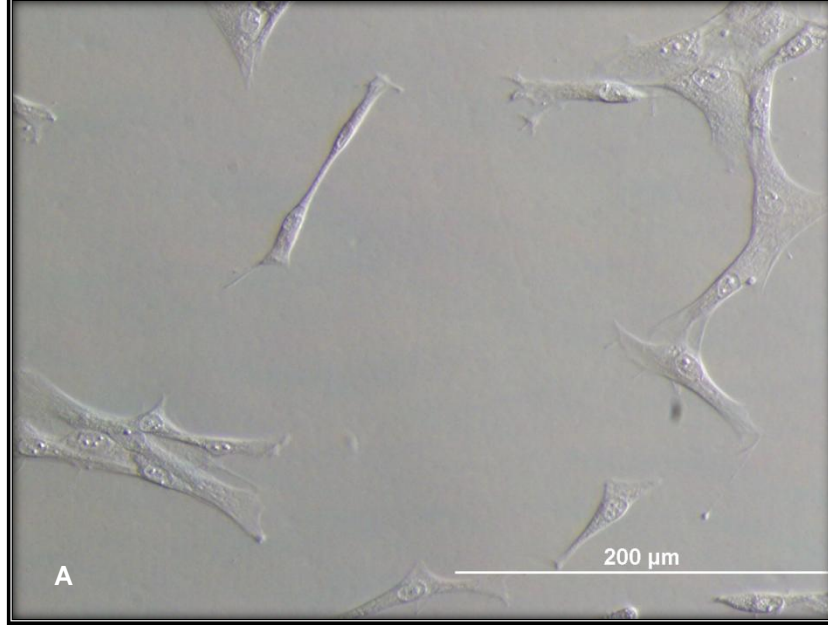
Şekil 4.2.4. 3 Pasaj 3 (P3) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 4'de (P4) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.4.4A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.4.4B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P4 MKH'lerde CD90 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 78.680 olarak hesaplanmıştır.



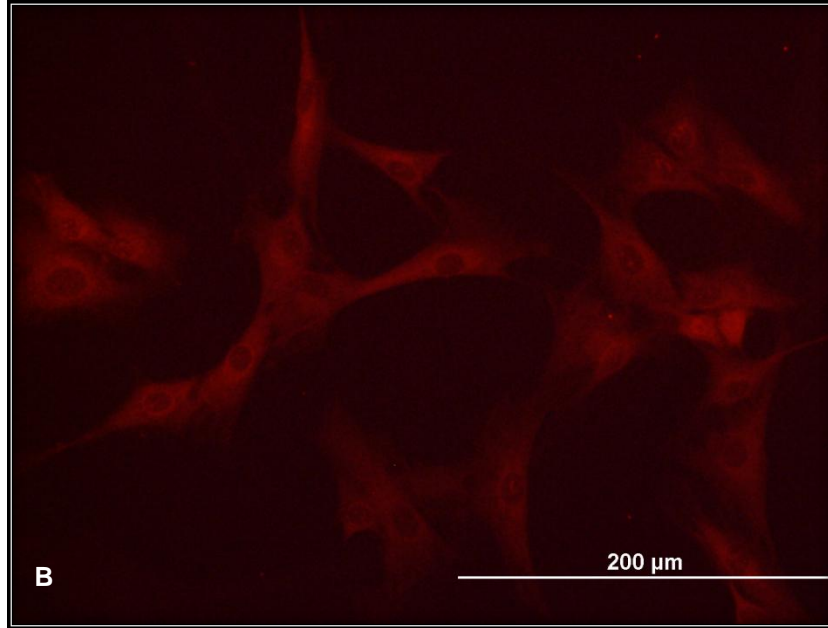
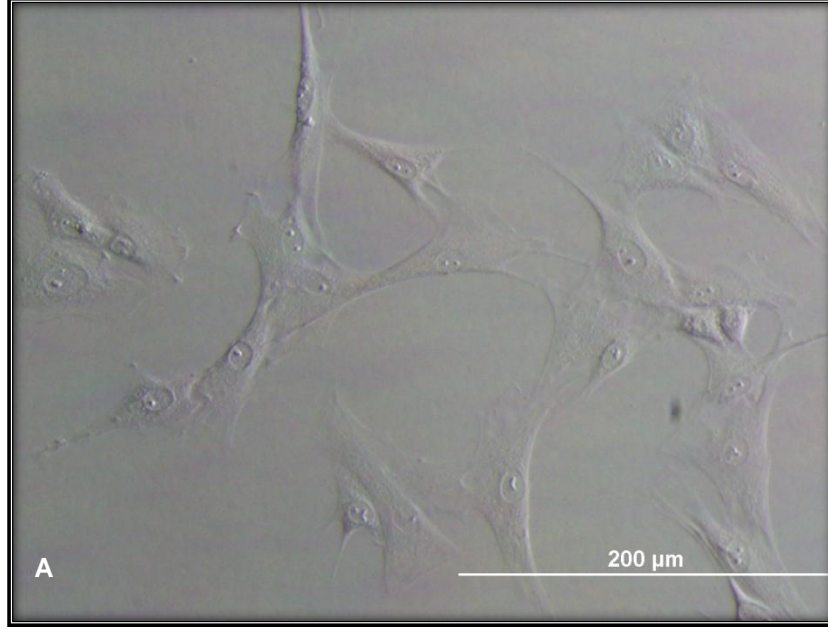
Şekil 4.2.4. 4 Pasaj 4 (P4) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 5'de (P5) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.4.5A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.4.5B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P5 MKH'lerde CD90 yüzey antijeninin pozitif ifade oranı % 84.996 olarak hesaplanmıştır.



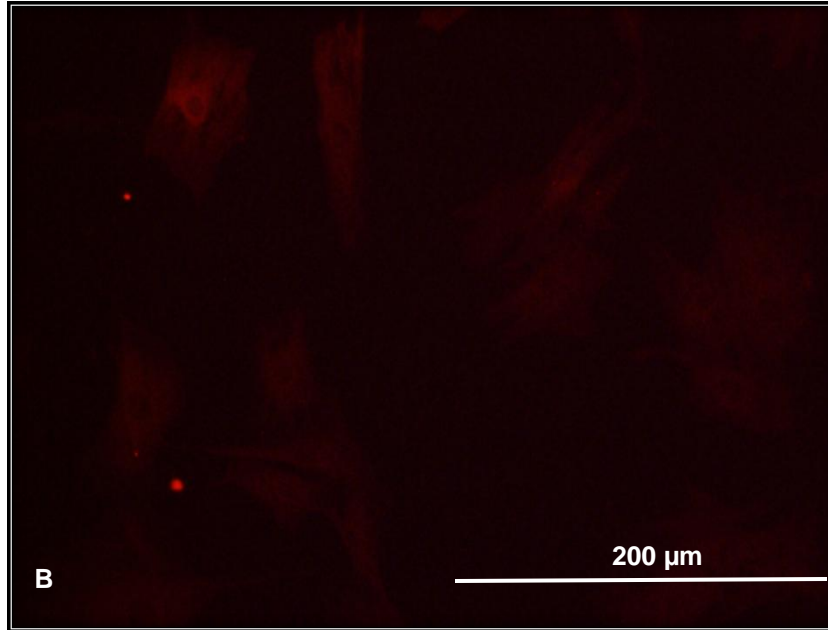
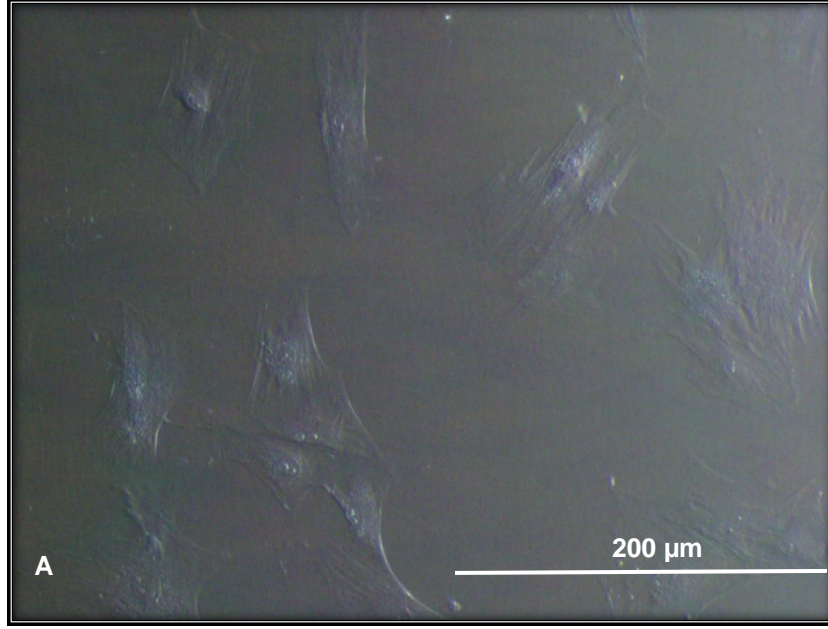
Şekil 4.2.4. 5 Pasaj 5 (P5) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 6'da (P6) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.4.6A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.4.6B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P6 MKH'lerde CD90 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 88.368 olarak hesaplanmıştır.



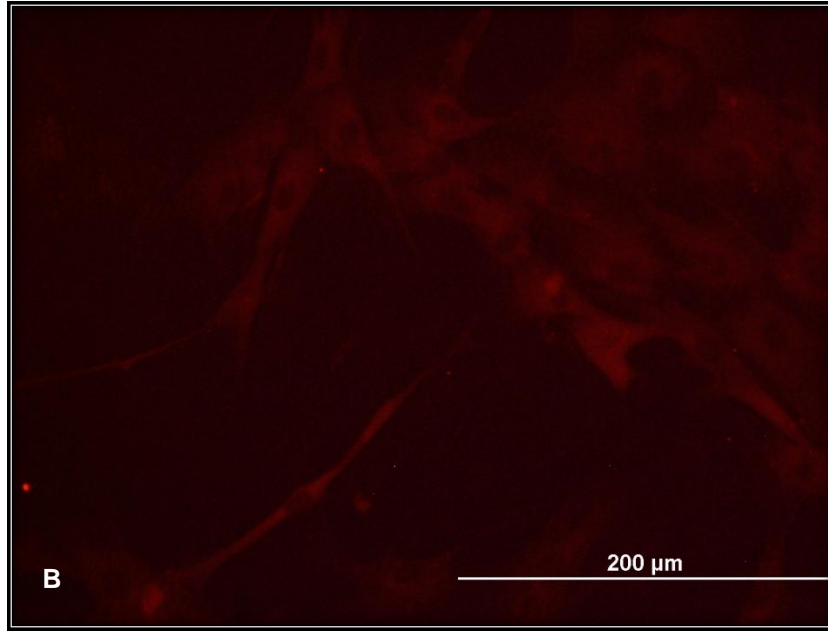
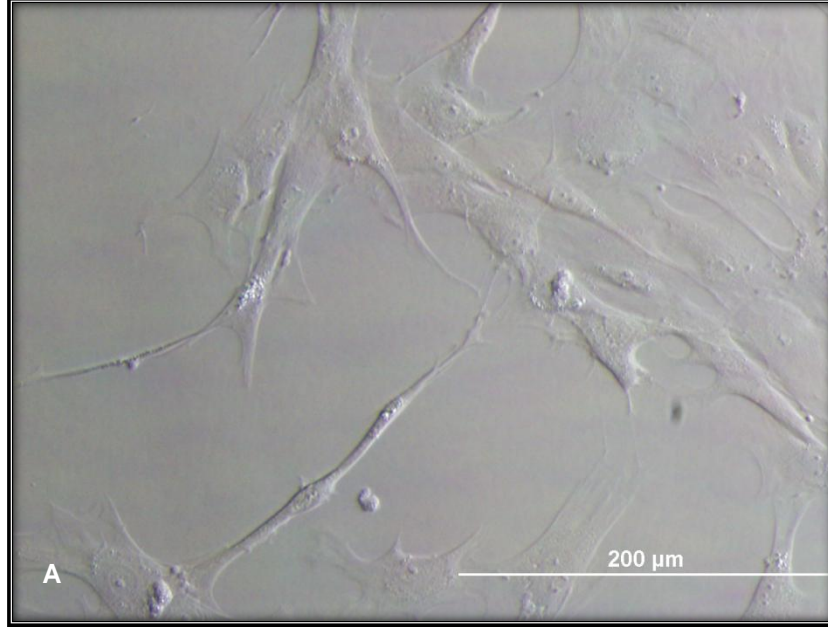
Şekil 4.2.4. 6 Pasaj 6 (P6) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 7'de (P7) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.4.7A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.4.7B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P7 MKH'lerde CD90 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 71.356 olarak hesaplanmıştır.



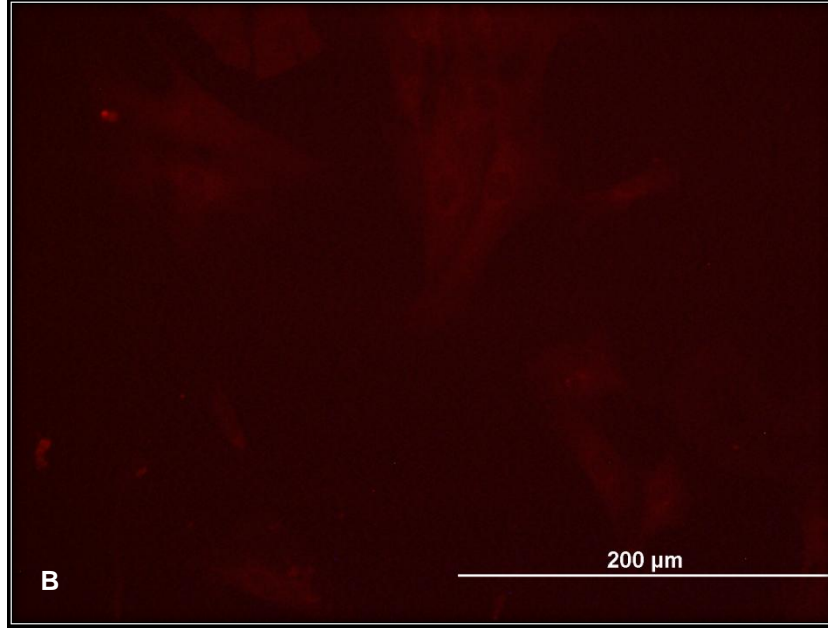
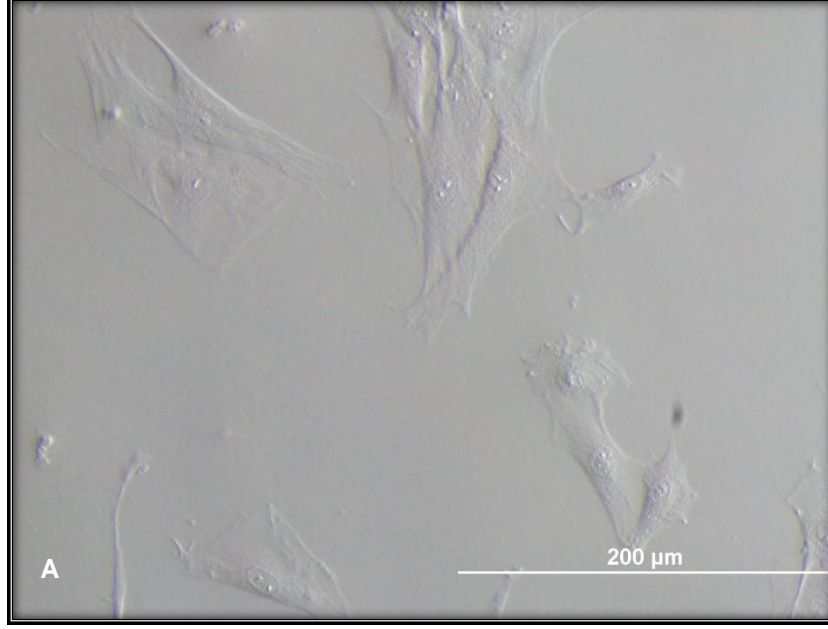
Şekil 4.2.4. 7 Pasaj 7 (P7) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 8'de (P8) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.4.8A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.4.8B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P8 MKH'lerde CD90 yüzey antijeninin pozitif ifade oranı % 67.793 olarak hesaplanmıştır.



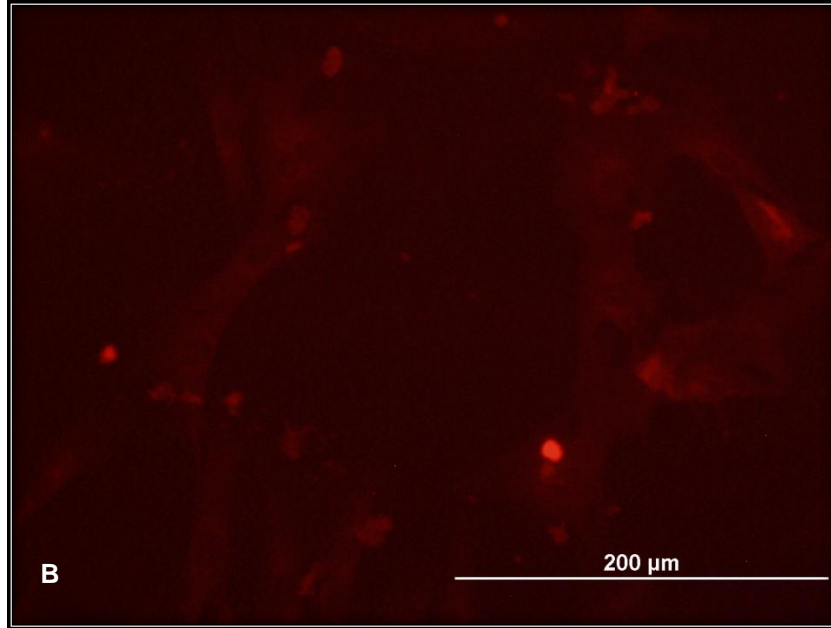
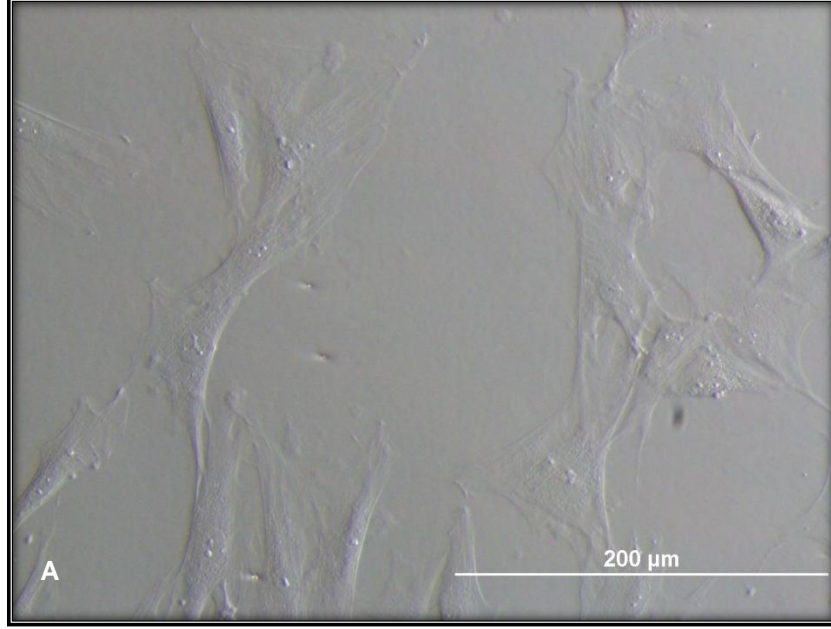
Şekil 4.2.4. 8 Pasaj 8 (P8) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 9'da (P9) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.4.9A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.4.9B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P9 MKH'lerde CD90 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 77.645 olarak hesaplanmıştır.



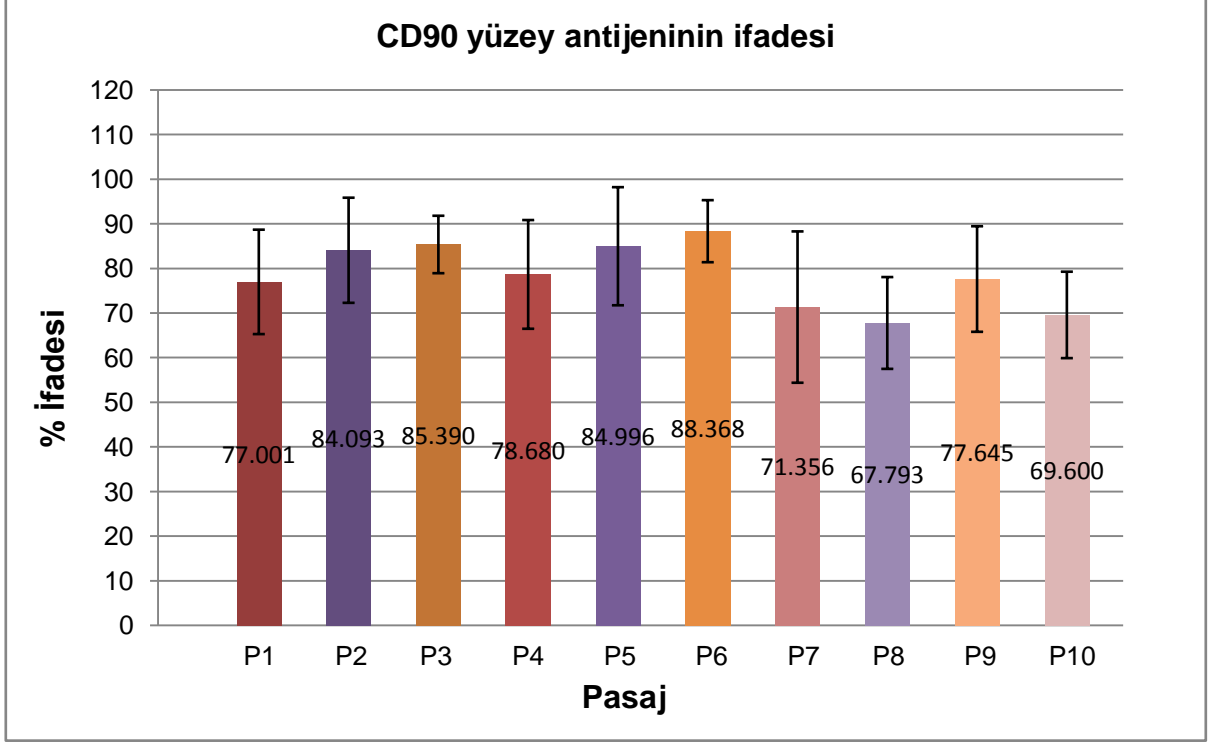
Şekil 4.2.4. 9 Pasaj 9 (P9) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 10'da (P10) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.4.10A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.4.10B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P10 MKH'lerde CD90 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 69.600 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.2.4. 10 Pasaj 10 (P10) MKH'lerinde CD90 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

CD 90 da aynı istatistik analizi uygulanarak tekrar 10 farklı pasajda % ifadesine bakıldığında (Şekil 4.2.4.11) anlamlı farklılık tespit edilmiştir (p=0.031).



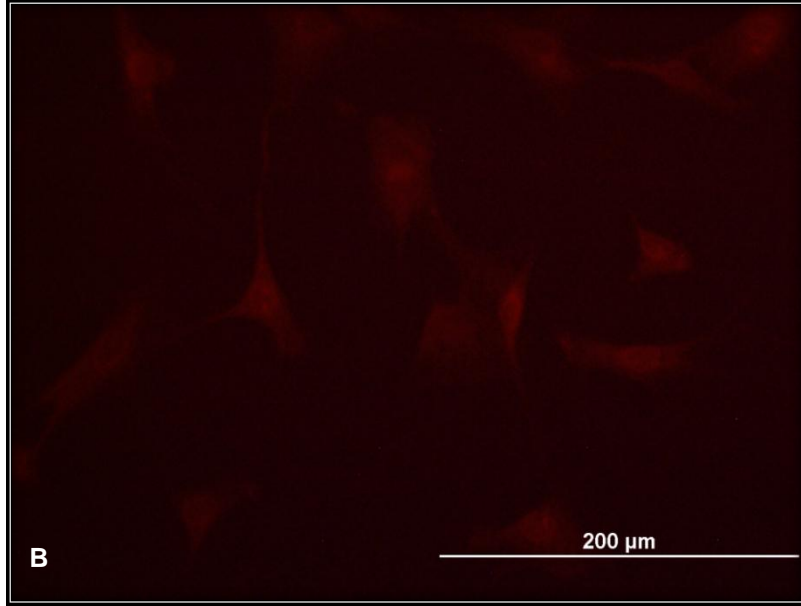
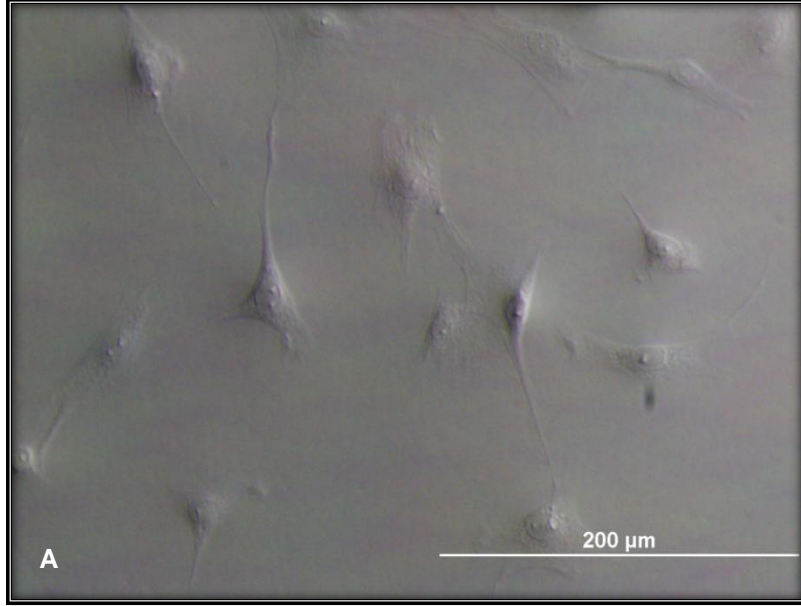
Şekil 4.2.4. 11 10 farklı pasajda CD90 yüzey antijeninin ifadesi (%)

CD90 yüzey antijenin en düşük % ifade oranı P8'de ve P10'da görülmüştür. Bu nedenle, hem bu iki pasajın hem de diğer pasajların karşılaştırılması yapılmış ve p değerleri ($p \leq 0.05$) aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.2.4.1).

Çizelge 4.2.4. 1 CD90 yüzey antijeninin pasajlarının karşılaştırılması					
Pasajlar	P değeri	Pasajlar	P değeri	Pasajlar	P değeri
P8-P2	0.033	P10-P2	0.039	P7-P6	0.032
P8-P3	0.018	P10-P3	0.022		
P8-P5	0.010	P10-P5	0.013		
P8-P6	0.004	P10-P6	0.004		

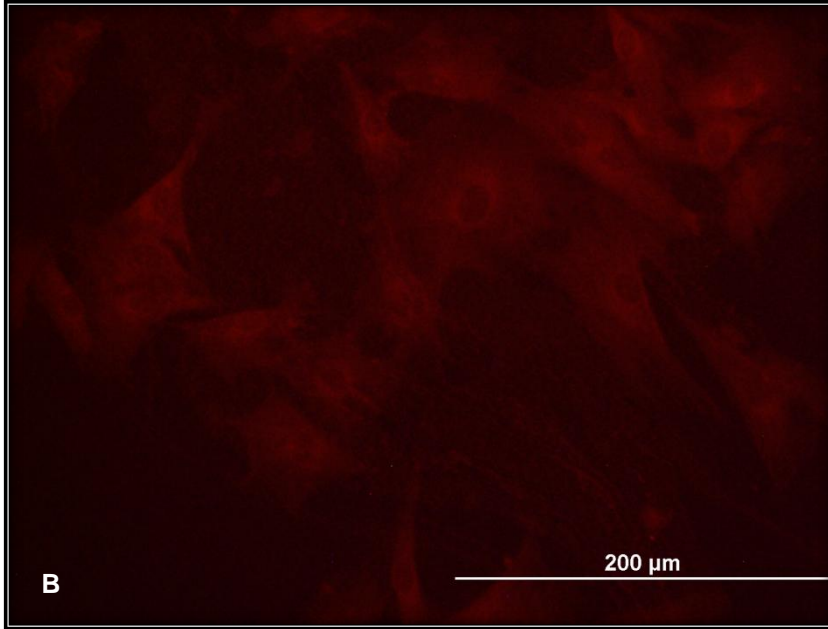
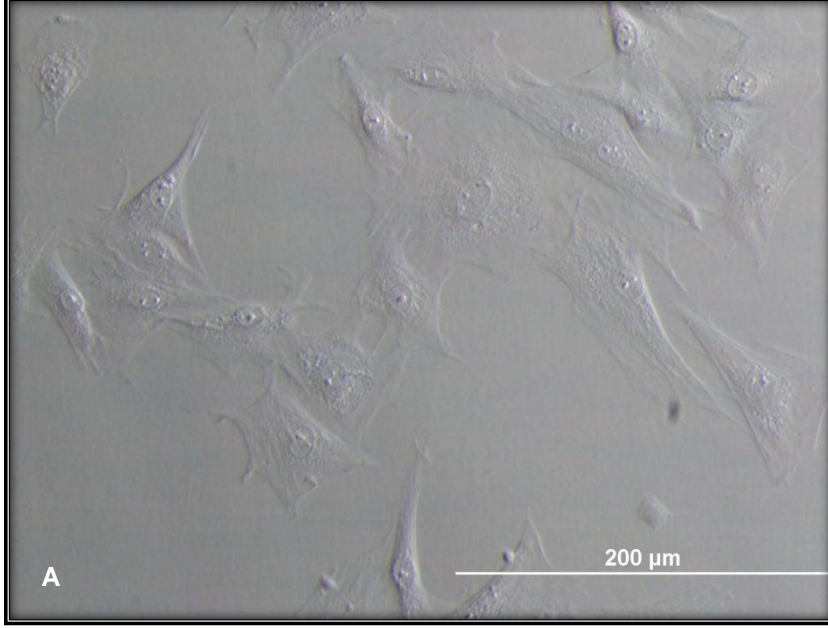
4.2.5. Mezenşimal Kök Hücrelerin CD34 Yüzey Antijeni ile Karakterizasyonu

Pasaj 1'de (P1) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.5.1A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.5.1B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P1 MKH'lerde CD34 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 73.636 olarak hesaplanmıştır.



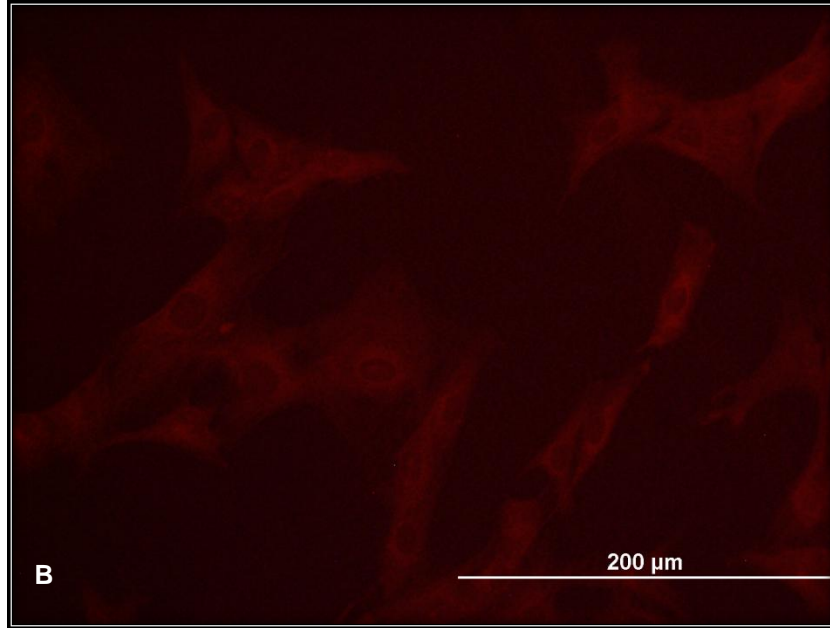
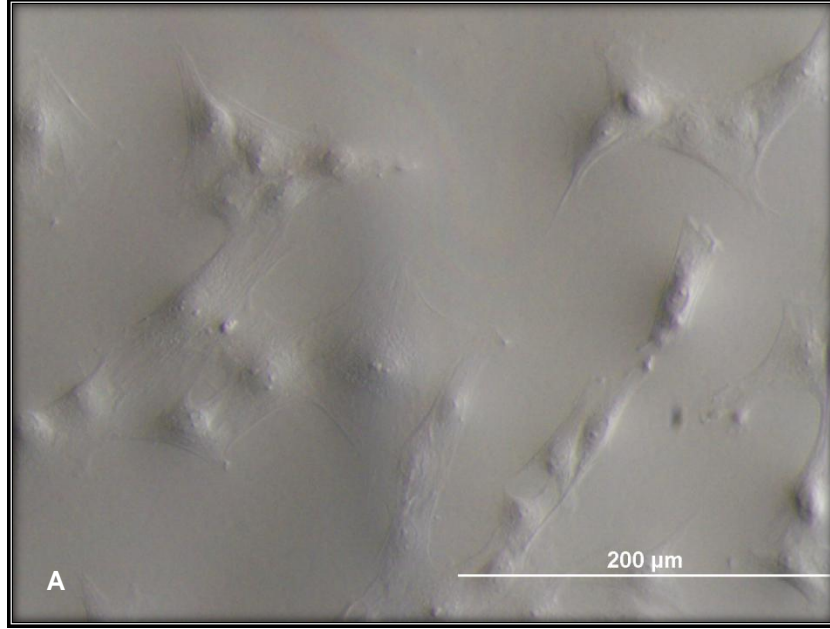
Şekil 4.2.5. 1 Pasaj 1 (P1) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 2'de (P2) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.5.2A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.5.2B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P2 MKH'lerde CD34 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 75.326 olarak hesaplanmıştır.



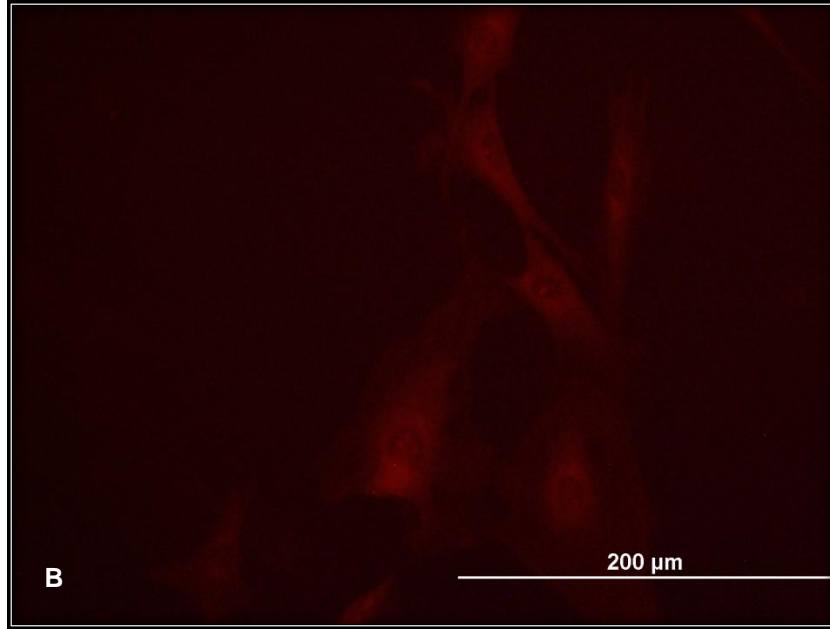
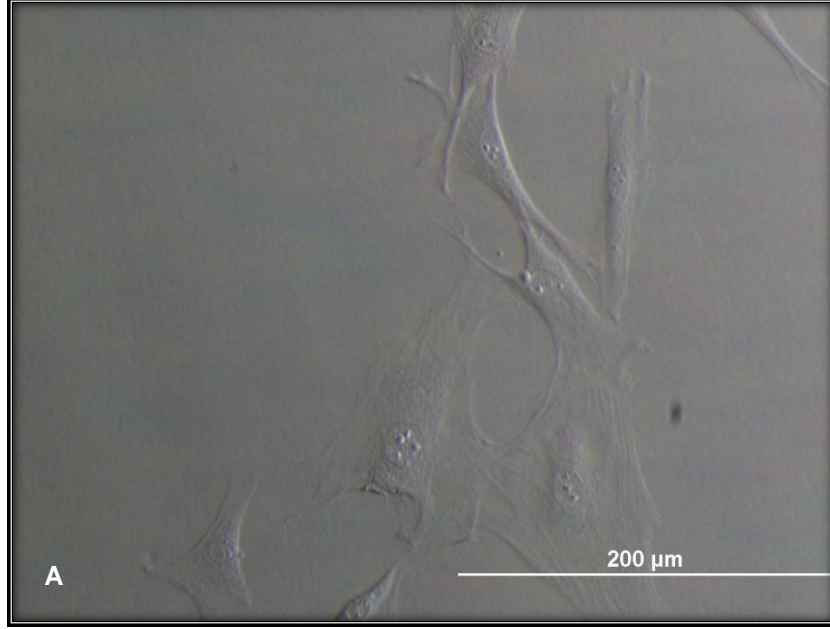
Şekil 4.2.5. 2 Pasaj 2 (P2) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 3'de (P3) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.5.3A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.5.3B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P3 MKH'lerde CD34 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 73.563 olarak hesaplanmıştır.



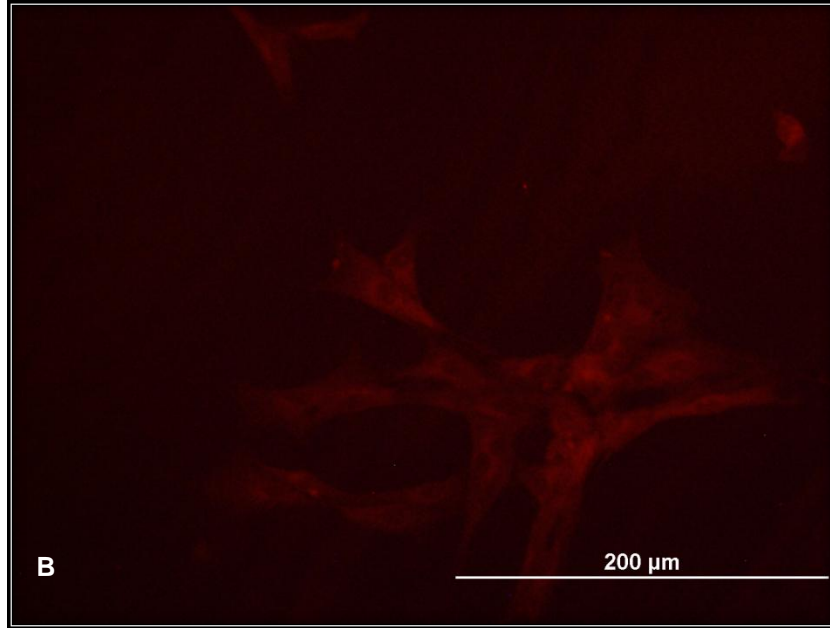
Şekil 4.2.5. 3 Pasaj 3 (P3) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 4'de (P4) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.5.4A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.5.4B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P4 MKH'lerde CD34 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 77.830 olarak hesaplanmıştır.



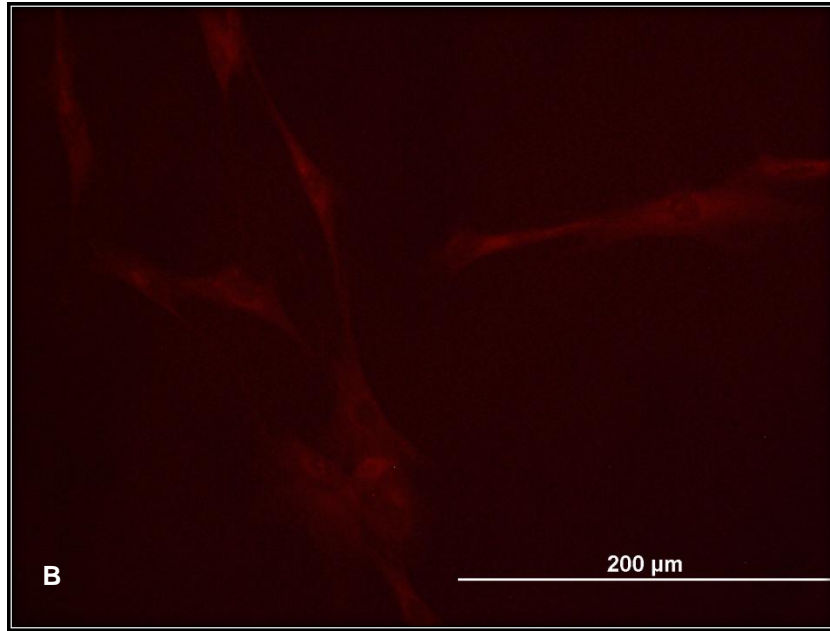
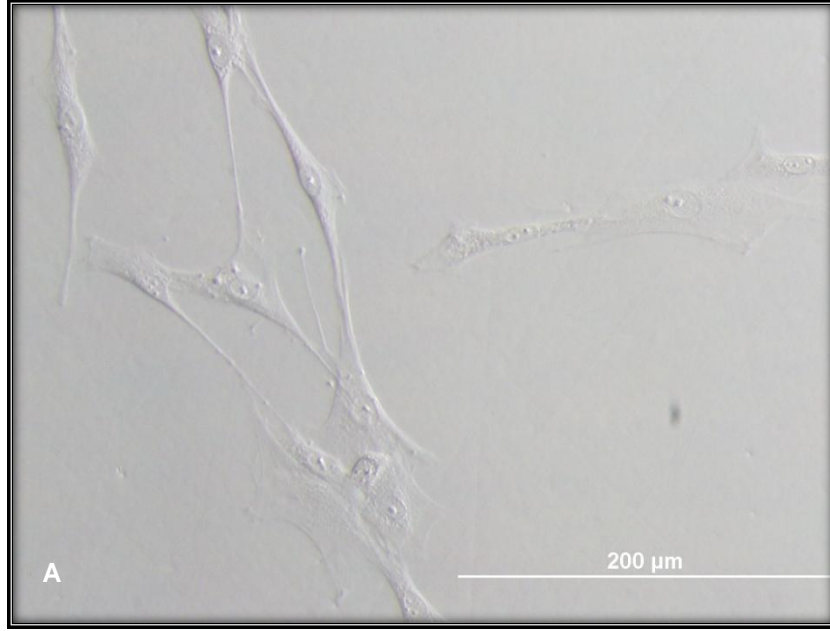
Şekil 4.2.5. 4 Pasaj 4 (P4) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 5'de (P5) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.5.5A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.5.5B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P5 MKH'lerde CD34 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 61.920 olarak hesaplanmıştır.



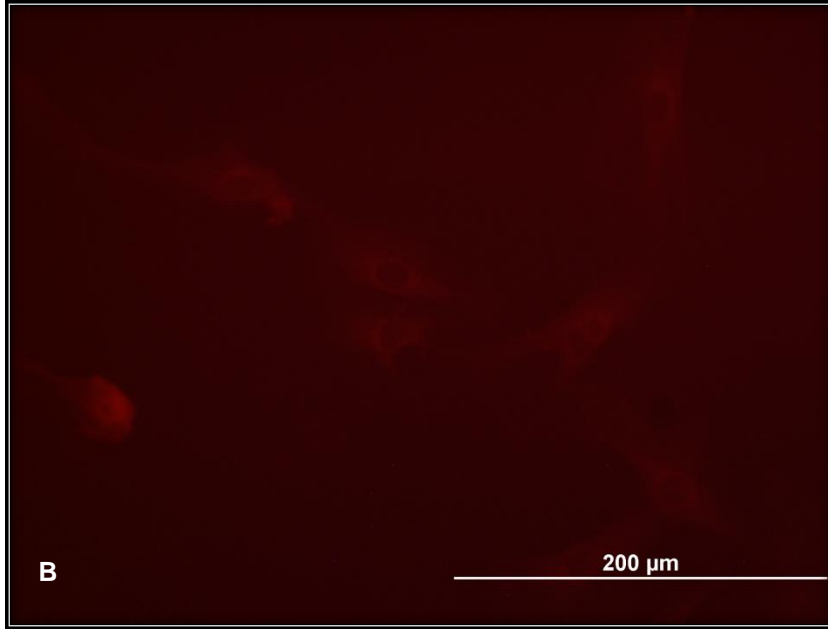
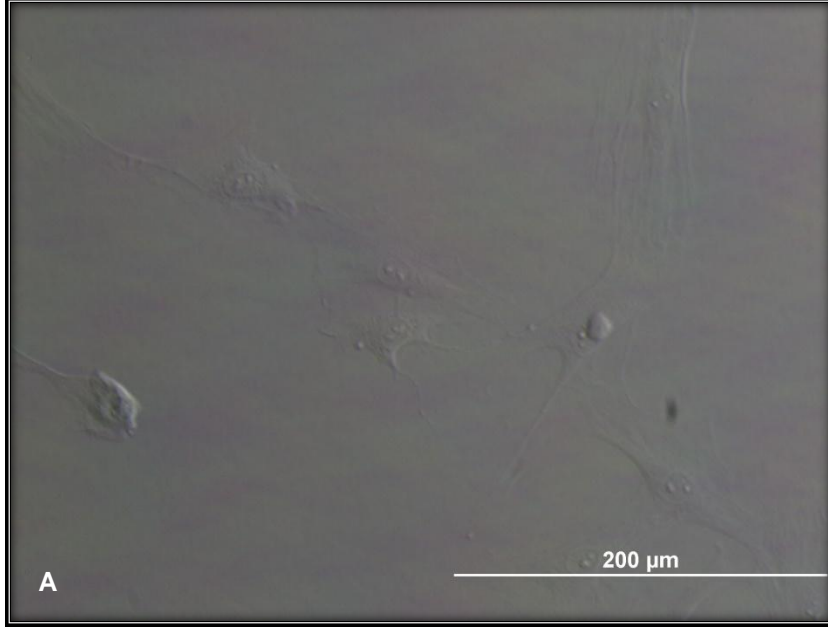
Şekil 4.2.5. 5 Pasaj 5 (P5) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 6'da (P6) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.5.6A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.5.6B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P6 MKH'lerde CD34 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 77.395 olarak hesaplanmıştır.



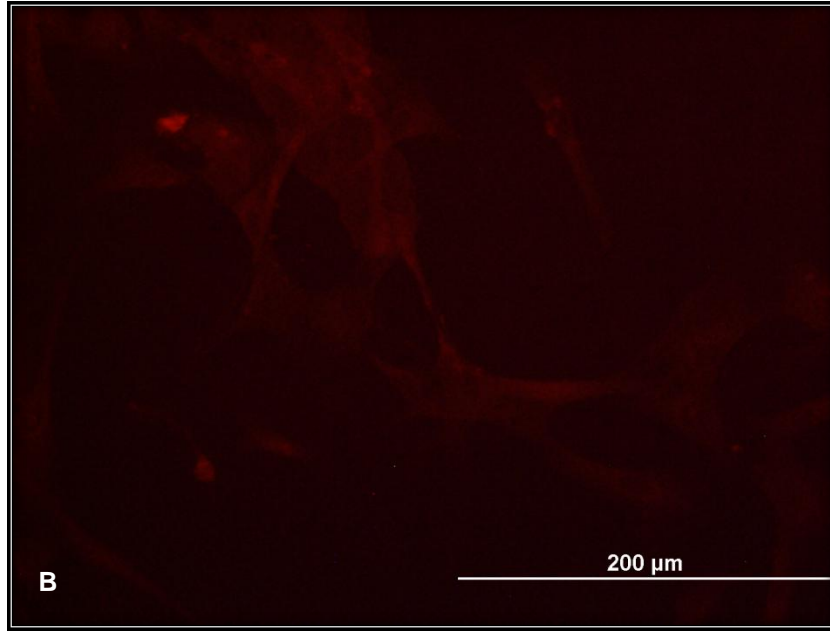
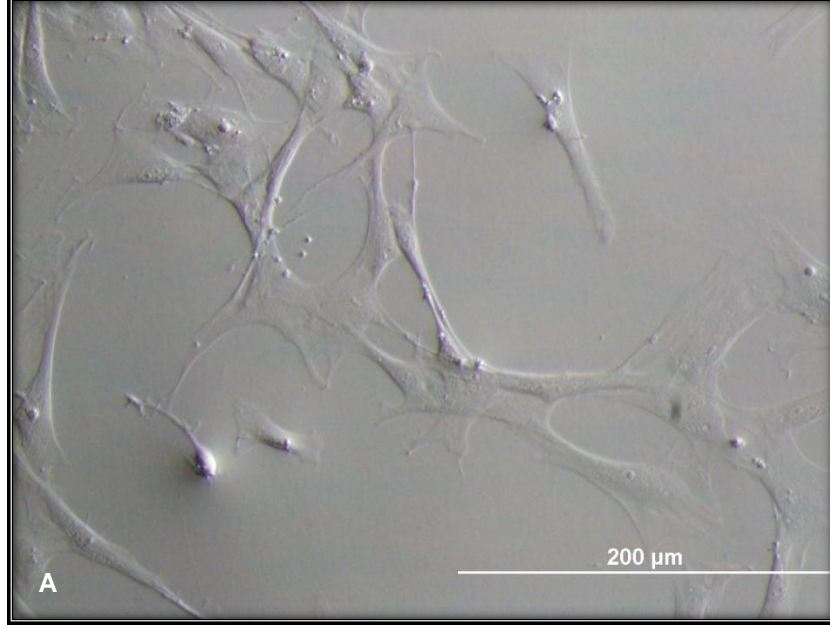
Şekil 4.2.5. 6 Pasaj 6 (P6) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 7'de (P7) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.5.7A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.5.7B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P7 MKH'lerde CD34 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 67.078 olarak hesaplanmıştır.



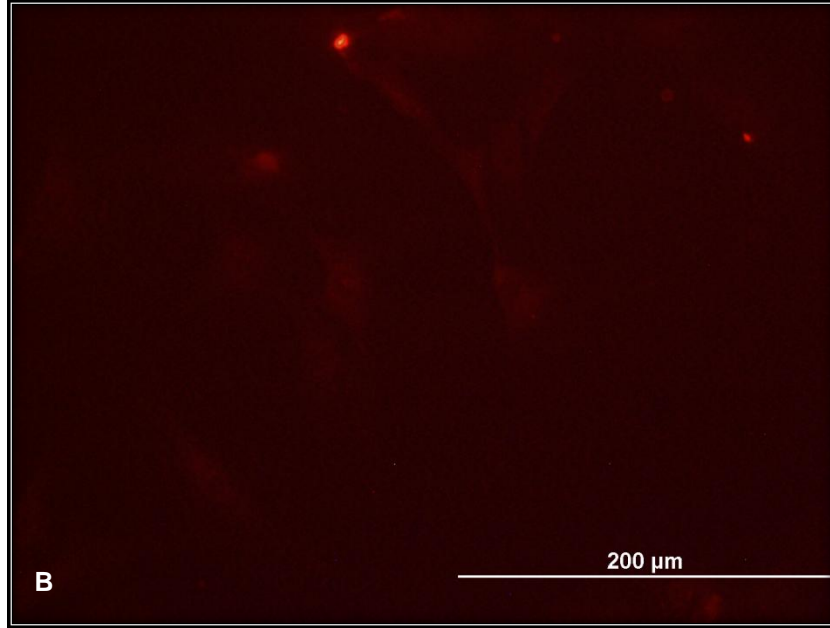
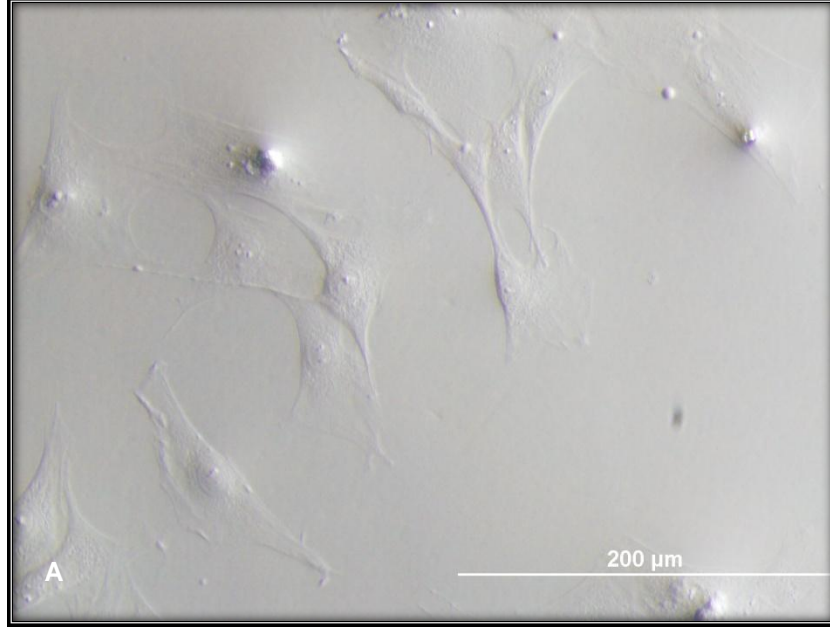
Şekil 4.2.5. 7 Pasaj 7 (P7) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 8'de (P8) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.5.8A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.5.8B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P8 MKH'lerde CD34 yüzey antijeninin pozitif ifade oranı % 55.036 olarak hesaplanmıştır.



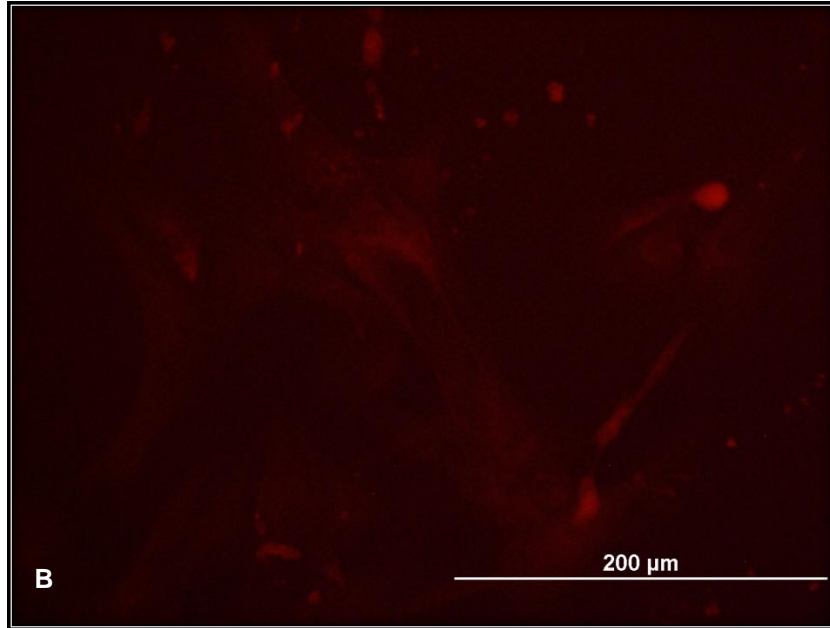
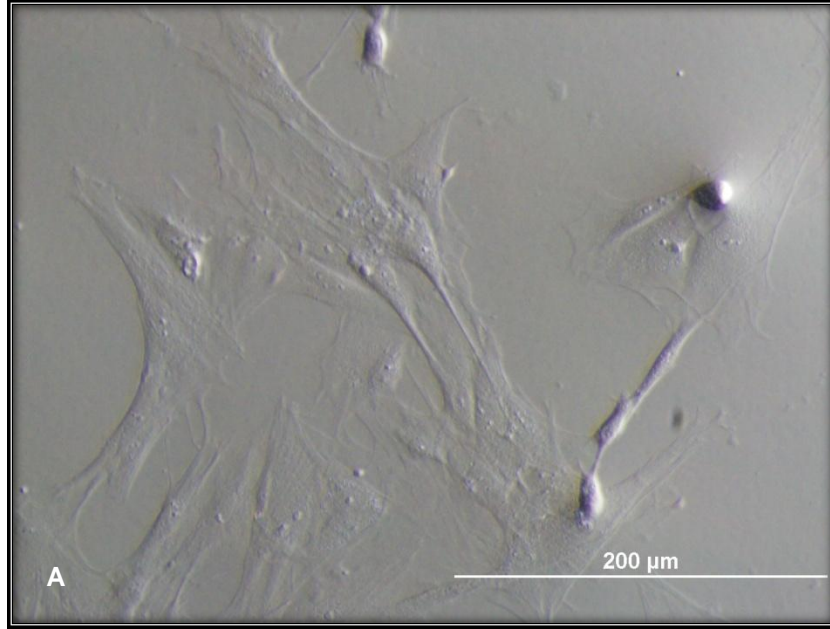
Şekil 4.2.5. 8 Pasaj 8 (P8) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 9'da (P9) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.5.9A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.5.9B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P9 MKH'lerde CD34 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 76.920 olarak hesaplanmıştır.



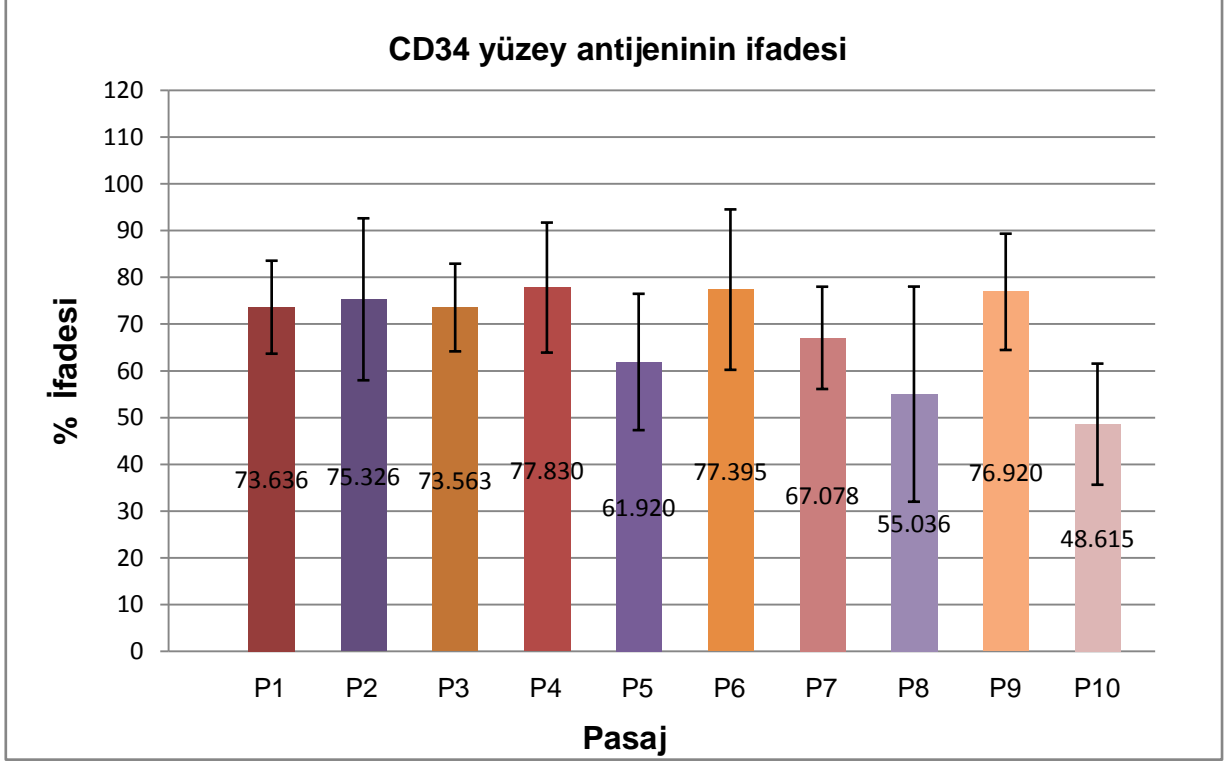
Şekil 4.2.5. 9 Pasaj 9 (P9) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Pasaj 10'da (P10) hücreler morfolojik olarak incelendiğinde fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Normal görüntüden (Şekil 4.2.5.10A) toplam ve floresan boyanmış (Şekil 4.2.5.10B) hücrelerin sayısı belirlenmiş ve bu şekilde P10 MKH'lerde CD34 yüzey antijenin pozitif ifade oranı % 48.615 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.2.5. 10 Pasaj 10 (P10) MKH'lerinde CD34 yüzey antijeninin ifadesi A) Hücrelerin normal görüntüsü B) Hücrelerin floresan boyama görüntüsü (X20)

Son olarak, diğer yüzey antijenlerine göre en düşük % ifadesi olan CD34 yüzey antijeninin de farklı pasajlarda % ifade oranında (Şekil 4.2.5.11) farklılık olduğu görülmüştür (p=0.016).

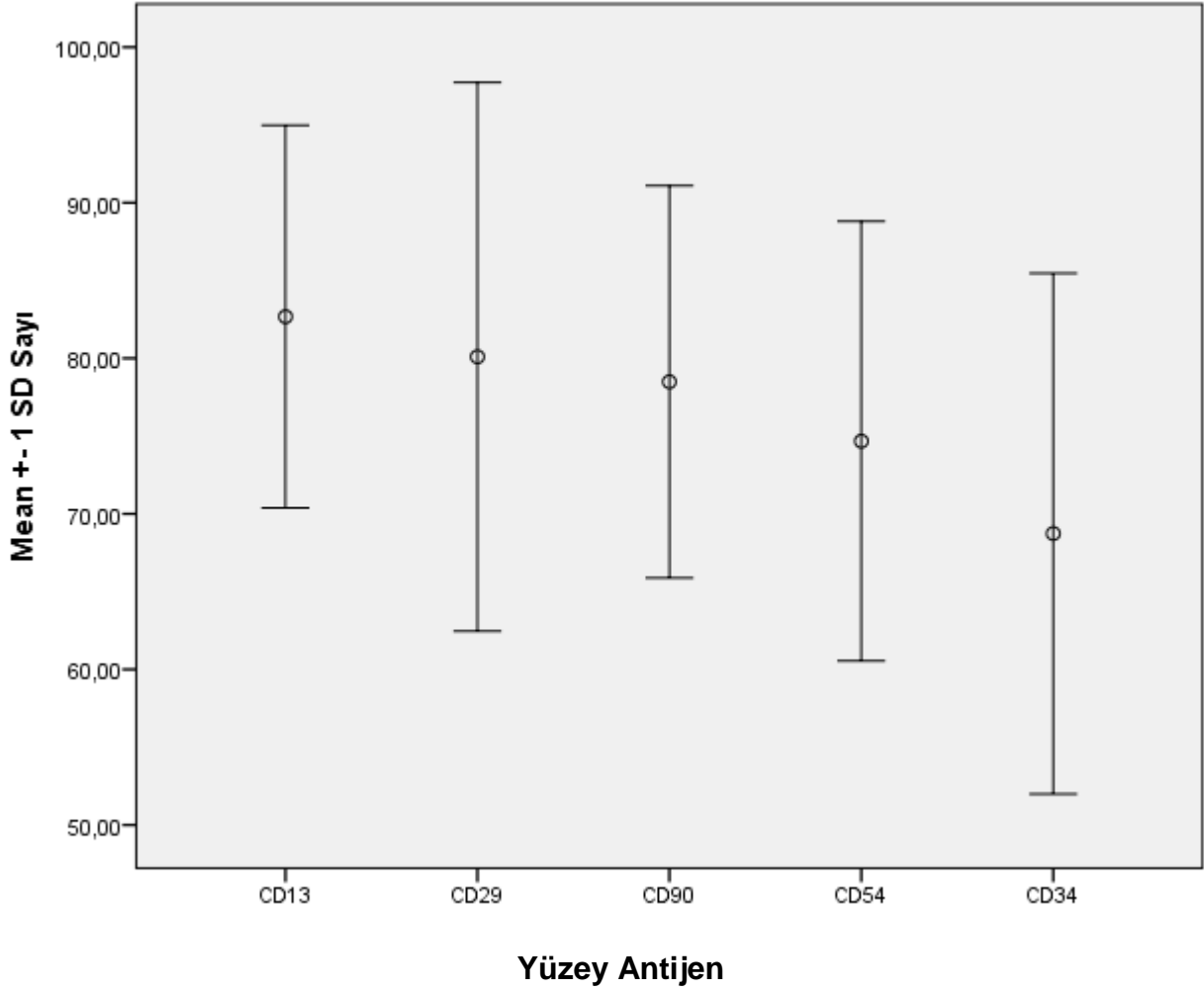


Şekil 4.2.5. 11 10 farklı pasajda CD34 yüzey antijeninin ifadesi (%)

CD34 yüzey antijenin en düşük % ifade oranı P8'de ve P10'da görülmüştür. Bu nedenle hem bu iki pasajın hem de diğer pasajların karşılaştırılması yapılmış ve p değerleri ($p \leq 0.05$) aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.2.5.1).

Pasajlar	P değeri	Pasajlar	P değeri	Pasajlar	P değeri
P8-P4	0.020	P10-P2	0.006	P10-P9	0.004
P8-P6	0.031	P10-P3	0.012		
P8-P9	0.041	P10-P4	0.002		
P10-P1	0.010	P10-P6	0.003		

Beş farklı yüzey antijeninin genel ifadesine bakıldığında, mezenşimal kök hücrelerde CD13 yüzey antijeninin en yüksek oranda ifade edildiği görülmüştür (% 82.677). Daha sonra CD29 (% 80.096) ve CD90 yüzey antijenlerinin (% 78.492) bu hücrelerin yüzeylerinde ifade edildiği gözlenmiştir, daha CD 54 yüzey antijeninin de pozitif ifadesi gelmektedir (% 74.675). Son olarak diğer yüzey antijenlere göre en düşük % ifade oranı gösteren CD34 yüzey antijeninin ifadesi % 68.732 olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.2.5. 11 Bütün yüzey antijenlerinin ifadesi

Kök hücreler kendilerini yenileyebilme özelliği ve yüksek plastisite gösterebilen hücrelerdir. Bu hücreler, dokulara spesifik olan hücrelerinin ifade profilleri ve fenotipik özelliklerini gösterebilme özelliğine sahiptir. Fizyolojik açıdan yetişkin kök hücreler doku homeostazını sağlamaktadır. Yetişkin kök hücreler belirli progenitor hücrelere farklılaşabilir ve bu şekilde hasarlı dokunun iyileşmesini sağlar. Yetişkin kök hücreler spesifik stromal dokularda bulunur ve kolaylıkla mezoderm dokulardan-kemik iliği, kas, yağ doku-, endoderm dokudan - bağırsak - ve ektoderm dokudan-deri-elde edilebilir.

Yetişkin kök hücre tiplerinden biri olan mezenşimal kök hücreler (MKH), ilk çalışmalarda sadece kemik iliğinden izole edilebilirken, yapılan yeni çalışmalarda yağ doku gibi farklı dokulardan da bu hücrelerin izolasyonu gerçekleştirilmektedir [7][15]. MKH'ler genel olarak mezoderm spesifik hücre tiplerine farklılaşabilir. Bu farklı dokulara *in vitro* farklılaşma özelliği sayesinde, bu hücreler *in vivo* hasarlı organların onarılmasında ve immun sistemin düzenlenmesinde kullanılır. Aynı zamanda bu hücreler endotel hücrelere farklılaşabilirler ve yeni damar oluşumuna katkıda bulunur. Bahsedilen bu özelliklerinden dolayı MKH'ler, temel araç olarak, hücresel tedavi ve rejeneratif tıpta çok yaygın kullanılmaktadır.

Birçok araştırma, kültüre edilen MKH'lerin çeşitli biyoaktif moleküller salgıladıklarını göstermektedir. Bu moleküllerin anti-apoptotik, immunmodulator, immunsupresif ve angienez özellikleri sayesinde *in vivo* ortamda lokal rejenerasyon sağlanır.

Daha önce bahsedildiği gibi, yağ doku, yetişkin kök hücreler için kolayca ulaşılabilen ve çok zengin bir kaynaktır. Yağ doku kaynaklı kök hücreler, kemik iliği mezenşimal kök hücrelerine çok benzer bir yüzey protein profili gösterir. Bu hücrelerin ilk izolasyon ve karakterizasyon çalışmasında ve diğer birçok çalışmada uzun süre kültüre edilen hücrelerin yüzey özelliklerinin değişikliğe uğradığı görülmüştür [14][27][54][55].

Bu tez çalışmasında MKH'ler, CD13,CD29, CD54, CD90 ve CD34 yüzey antijenleri için karakterize edilmiş ve bu yüzey antijenlerinin % ifade oranı on farklı pasajda belirlenmiştir.

MHK'lerin izolasyonu, primer eksplant kültür yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Primer eksplant kültür yönteminin bir çok farklı yönden avantajları bulunmaktadır. Bu yöntemde hücreler yağ dokusundan doğrudan ayrılarak izole edilmiştir. Bu yöntem, diğer yöntemlere göre oldukça hızlı bir yöntemdir. Aynı zamanda hücre izolasyonunda kolojenaz ya da tripsin gibi herhangi bir enzim kullanılmadığı için, hücrelerde çok az yüzeysel hasar neden olmakta ve hücre yüzey antijenlerinde de çok az değişiklik gözlemlenmektedir.

Elde edilen yağ doku karışık ve heterojen bir hücre popülasyonu içermektedir. MKH'ler, yüzeye tutunma özelliği gösterdiği için bu hücreler doku eksplantından ayrıldıklarında, hem tutunma özelliği taşımayan diğer hücrelerden kolaylıkla ayrılmakta, hem de MKH'lerin dışındaki tüm hücreler elimine edilebilmektedir. Daha homojen bir hücre popülasyonu elde etmek için, besiyeri ortamı her gün değiştirilmiş ve bu şekilde eritrositlerin ve diğer hücrelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Aynı zamanda, bu hücrelerin salgılamış oldukları faktörler diğer yandan sitokin ve diğer büyüme faktörlerinin olası farklılaştırıcı etkileri de ortadan kaldırılmıştır.

Bu yöntemde MKH'ler ortalama 5 günde tam konfluensiye ulaşmadan ilk pasajları yapılmıştır. İlk pasajdan sonra bu hücrelerin proliferasyon yeteneğinin arttığı görülmüş ve P1'den P4'e kadar, her pasaj 2-3 gün içerisinde elde edilmiştir. İlk tripsinizasyon işlemi ve hücrelerin ilk kez tutundukları yüzeylerden ayrılması, bu hücrelerin daha hızlı proliferasyon olmasını başlatmış ve bu şekilde hücrelerin tam konfluensiye gelme sürelerinin ilk pasajlarda daha hızlı gerçekleştiği görülmüştür. İlerli pasajlarda hücrelerin çoğalma hızının azaldığı görülmüş ve hücrelerin tam konfluensiye ulaşmak için daha fazla zaman gerektiği gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada, MKH'ler tüm pasajlarda fibroblastik morfoloji göstermişlerdir. Ancak, pasaj 6'dan sonra hücrelerde bazı morfolojik değişiklikler farkedilmiştir. Bu değişiklikler, ilerleyen pasajlarda MKH'lerin farklılaşabildiği yönünde bir takım sonuçlar ortaya çıkarmaktadır.

MKH'ler karışık bir hücre fraksiyonundan izole edildiği için, bu heterojen hücre popülasyonu preadiposit, endotel progenitor hücreleri gibi bir takım farklı hücre tipleri içermektedir [7].

Bu nedenle ilerleyen pasajlarda, MKH'lerde saptanan morfolojik değişiklikler sonucunda, bu hücrelerin endotel hücrelere farklılaştığı söylenebilir. Fakat, hiç bir zaman bu farklılaşmış hücreler, kültür ortamında MKH'lerin fibroblastik morfolojiye göre baskın hale gelmemişlerdir.

Yapılan bir çalışmaya göre MKH'lerin P10'a kadar kültüre edildikleri zaman, bu hücrelerin morfolojileri ve yüzeylerinde bulunan moleküllerin ifadelerinin değişmediği saptanmış fakat, uzun süre kültür ortamında bu hücrelerin spontene transformasyon riski taşıdıkları görülmüştür [15].

Başka bir çalışmaya göre, MKH'lerin azalan proliferasyonun sonucunda hücre yaşlanması ve bazı morfolojik değişiklikler görülmüştür. Aynı çalışmada MKH'ler uzun süre, P7'den P12'e kadar kültüre edilmiş ve hücrelerde bir takım morfolojik anormalite, hücre büyümesi ve bazı spesifik yüzey antijenlerinin ifadelerinin ve proliferasyonun azalması gözlemlenmiştir [56].

Hücre kültür metodu, çok sayıda hücreler elde etmek için güvenli bir yöntemdir. Fakat eğer bu hücreler *in vivo* uygulamalarda kullanılacaksa, MKH'lerin farklı pasajlarda genetik stabilitelerini korumaları ve kök hücre özelliklerini göstermeye devam etmeleri gerekir. Uzun süreli kültür, MKH'lerin proliferatif kapasite ve farklılaşma potansiyeli MKH'lerin kalitesini düşürebilmektedir.

Bu çalışmada, bazı yüzey moleküllerinin ifade oranında değişiklikler olmuş ve seri pasajlama sonrasında ifadenin azaldığı görülmüştür. Yağ doku kökenli MKH'ler biyolojik özelliklerini kaybetmeden kültür ortamında çoğaltılabilir, ancak farklı pasajlarda kendilerine özgü hem pozitif hem de negatif yüzey antijenlerinin ifadesinde bazı kabul edilebilir değişiklikler ortaya çıkabilmektedir.

Bu tez çalışmasında MKH'lerinin beş farklı yüzey antijeni için karakterizasyonu yapıldığında **CD13** yüzey antijeninin ifadesi bu hücrelerin yüzeylerinde % 82.677 olarak hesaplanmıştır. CD13 yüzey antijeninin ifade oranı 10 farklı pasajda karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (p=0.237).

Birinci pasajda (P1), en düşük ifade oranı % 73.575 ve en yüksek ifade oranı P5'de % 91.740 olarak belirlenmiştir. CD13 ifadesi için elde edilen veriler, bu yüzey antijeninin pasajlar ilerledikçe sabit kaldığını göstermektedir.

CD13'ün potansiyel görevi halen tam olarak bilinmemesine rağmen, bu tip-II çinko bağlı metalopeptidaz bir çoklu fonksiyona sahip olarak enzime bağlı (biyoaktif peptitlere bölebilmesi) ve enzime bağlı olmayan adezyon molekül ya da anjiyojenik regülatör gibi fonksiyonları vardır. Bu fonksiyonlar, hücre adezyonunda, hücre migrasyonunda, anjiyojenez ve inflammatör hareketlerine katkıda bulunmaktadır [33] [57] [58] [59] [60].

CD13 ifadesi bütün pasajlarda aynı seviyede olduğu için, bu hücrelerin *in vivo* uygulamalarda kullanımı, bütün pasajlardaki hücrelerin güvenli bir şekilde kullanılmasını sağlar.

CD13 hücre adezyonunda, migrasyonunda ve vasküler ağ formasyonunda önemli bir görev almaktadır. Rahman ve ark.'nın çalışmasına göre, CD13 anjiyogenezin fonksiyon regülatörü olarak çalıştığı tespit edilmiş ve MKH'lerin yüzeylerinde CD13 bulunmadığı durumlarda, bu hücrelerin endotel ağlara dönüşmekte yetersiz kaldığı görülmüştür [34].

Aynı çalışmada, CD13'ün bir adezyon molekülü olarak fonksiyon üstlendiği gözlenmiştir. MKH'lerin ekstraselüler matriks (ECM) proteinleri ile etkileşimleri incelendiği zaman, yüzeylerinde CD13 bulunmayan MKH'lerin, yüzeylerinde CD13 bulunan normal hücrelere göre daha az tutunma özelliği gösterdiği saptanmıştır. Adezyon molekülleri aracılığı ile gerçekleştirilen ekstraselüler matrikse tutunma, bir takım sinyal iletim yollarını aktive eder ve sonuç olarak hücre iskeletinden intraselüler değişiklikleri uyarır. CD13 molekülü bulunmayan hücrelerde, hücre iskeletinde bütünlüğün bozulduğu gözlenmiştir [34].

Bu tez çalışmasında, yağ doku MKH'lerinin farklı pasajlarda CD13 yüzey antijeninin ifadesinde değişiklik olmadığı için, bu hücrelerin tutunma özellikleri CD13 molekülü ile regüle edilir ve bu esnada fokal adezyon kinaz (FAK) aktivasyonu gerçekleşir. FAK aktivasyonu adezyonu regüle eder, bu da MKH'lerin hayatta kalmasını, migrasyon ve invazyonu kontrol ederek, MKH'lerin entegre olmasını, hayatta kalmasını ve hasarlı dokuda yerleşmesini yönetir [61][62][63]. *İn vivo* ve *in vitro* özelliklerin kıyaslandığında, MKH'lerin popülasyonu, MKH'lerinde bulunan CD13 molekülünün bir

çok fonksiyonu yerine getirdiğini, CD13'ün yokluğunda iskelet kaslarının iyileşmesine daha az etkisinin olduğunu göstermiştir [34].

MKH'ler *in vivo* ortamda yara iyileşmesine katkıda bulunurlar ve Rahman ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada, enjekte edilen CD13'ten yoksun MKH'lerin kas dokusunda kan akışında düzelenin daha geç gerçekleştiğini göstermişlerdir. Bu gözlem, *in vitro* ortamda bozulmuş olan MKH'lerin adezyonu, yani bu hücrelerde CD13 molekülü yokluğunda, *in vivo* ortamda MKH'lerin fonksiyonunun azaldığını öngörmektedir [34].

Aynı çalışmada, CD13 bulunmayan MKH'lerde *in vitro* vasküler ağların oluşmadığı gösterilmiştir. Bu aynı zamanda göstermektedir ki, CD13, endotel hücrelerinin kaderini belirlemektedir [34].

Çalışmamızda **CD29** yüzey antijeni, % 80.096 oranı ile ikinci en çok ifade gösteren yüzey antijeni olarak tespit edilmiştir. CD29 yüzey antijenin ifadesine 10 farklı pasajda bakıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür (p=0.002). İlk pasajlarda CD29 ifadesinde bir artış gözlenmiştir, ve en yüksek ifadesi P3 'de (% 93.021) ve P5'de (% 91.014) görülmüştür. MKH'ler için CD29 karakterizasyonu yapıldığında, P7'de ve P7'den sonra hücrelerin morfolojilerinde değişiklikler gözlemlenmiştir. Ayrıca, pasaj 7'de CD29 yüzey antijeninin ifade oranında bir düşüş tespit edilmiştir (% 46.968). P8 ve P9' da tekrar bir artış görülmüştür, ama ilk pasajlardaki ifadesine göre CD29 yüzey antijenin daha düşük ifade edildiği belirlenmiştir. Bu artışı hücre kültüründe MKH'lerin yüzeylerinde çeşitli molekülerin uyarılmış hale gelmeleri ile açıklanabilir. P10' da CD29 ifadesinde tekrar bir azalma görülmektedir (%70.868).

Literatürde yapılan çalışmalar, farklı pasajlarda farklı yüzey antijenlerinin değişebilen ifadeler gösterdiklerini ortaya koymaktadır. Yeni izole edilmiş yağ doku kök hücreleri, ilk ve ilerleyen pasajlarda yüzey antijenlerinin ifadelerinde değişiklik gösterir. Yağ doku kökenli mezenşimal kök hücreler tüm yüzey proteinlerini ifade etmez, fakat genel olarak bu hücreler P2'de ve P3'te, kendilerine özgü pozitif yüzey antijenleri ifade ederler [14][15][27][55].

Bu tez çalışmasında hem CD13 hem de CD29 yüzey antijenleri, MKH'lerinin yüzeylerinde yüksek oranda ifade gösterirler, ama CD13 ifadesi kültür ortamında belirgin olarak değişmezken, CD29 ifadesi ilerleyen pasajlarda azalmaktadır. Bir araştırmaya göre CD29 ifadesinin izolasyondan hemen sonra (stromal vasküler fraksiyonda) P3'e kadar yükseldiği saptanmıştır. Çeşitli proteinler ve yüzey moleküllerinin MKH'lerde orta derecede ifade edilmesi gerekmektedir. Çünkü bu moleküller aracılığıyla MKH'ler hedef dokuya göç edebilmekte, diğer hücrelerle füzyon yapabilmekte ve hasarlı dokuda yerleşmeleri sağlanmaktadır.

MKH'lerin, hedef dokulara yerleşmesinde, bu hücrelerin spesifik dokuya farklılaşması yerine, asıl faydalı etkileri o dokuda büyüme ve diğer faktörlerin üretimini sağlamasıdır [55].

MKH'lerin, kan damarından geçmesi, göçü ve dokulara yerleşmesi, tam olarak bilinmemektedir. Ama çok muhtemelen, hasarlı dokuda bulunan spesifik reseptörler, ya da çeşitli ligandlar, MKH'lerin bu dokulara yerleşmesinde, göç etmelerinde ve adezyonunda yardımcı olmaktadır. Kimokinler dışında, MKH'lerde çeşitli adezyon molekülleri de bulunmaktadır ve bu moleküller, yukarıda bahsedilen MKH'lerin migrasyonunda ve hasarlı dokuya yerleşmesinde yardımcı olmaktadır. Bu moleküllerden biri olan integrinlerin hem hücre adezyonunda hem migrasyonunda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir [64][65]. Ip ve ark.'nın yaptığı çalışmalarda, integrin $\alpha 4$ yerine integrin $\beta 1$ 'in, kemik iliği kök hücrelerin intramiyokardiyal migrasyonunda ve doku yerleşmesinde ayrı bir görev aldığını tespit etmiştir [36].

Elde ettiğimiz bu sonuçlara göre MKH'lerin intravenöz uygulamalarda kullanılması durumunda, bu hücrelerin ilk pasajlarının tercih edilmesi gerekir, çünkü bu pasajlarda yüzey antijeninin ifade oranının en yüksek seviyede olduğu görülmüştür. Bu şekilde hücrelerin hedef dokuya kolaylıkla göç edebilmeleri sağlanabilecektir.

Bazı araştırmalar, MKH'lerin migrasyonunun CD73 ve CD29 yüzey antijenlerinin kontrolünde gerçekleştiğini göstermektedir. MKH'lerin CD73 ve CD29 yüzey antijenlerinin ifadelerinin fonksiyonel seviyede azalması durumunda MKH'lerin migrasyonu azalır [42].

Birçok araştırma, MKH'lerin üzerinde, **CD54** molekülünü tanımlamıştır, öte yandan bazı diğer araştırmalara göre MKH'lerde bu antijenin ifadesine rastlanmamıştır [7][43][44]. Bu tez çalışmasında MKH'ler bu adezyon molekülü (CD54) için karakterize edilmiş ve farklı pasajlarda CD54 ifade oranında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır ($p=0.123$).

Diğer yüzey antijenleri ile karşılaştırıldığında, CD54 daha düşük ifade (% 74.675) gösterir. P1'de bu yüzey antijeninin ifadesinin en yüksek olduğu tespit edilmiştir (% 84.870). İlerleyen pasajlarda bu ifade oranında azalma görülmüştür. En düşük ifade oranı P7' de (% 61.520) ve P8' de (% 65.686) tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalara göre MKH'de bulunan ICAM-1 (CD54) molekülü, bu hücrelerin endotelyuma tutunmasında fonksiyonel öneme sahiptir [9]. Bunun yanı sıra ICAM-1 molekülü, MKH'ler aracılı immunosüpresyonda kritik bir rol üstlenir [43][44].

ICAM-1 ve VCAM-1 genellikle MKH'lerin işaretleyicileri olarak görülmektedir. Bu adezyon molekülleri MKH'lerin göç edebilme ve hasarlı dokuların yenilenmesinde kritik bir rol almaktadır. Aynı zamanda MKH'ler aracılı, immunosüpresyonda gerekli olan hücre-hücre adezyonunun sağlanması önemli bir fonksiyon üstlenmektedir. Ren ve ark. yaptıkları çalışmalarında, MKH'lerde ICAM-1 ve VCAM-1 ifadelerinin yükselmesi durumunda, daha yüksek immunosüpresyon gözlemlenmiştir [44]. Adezyon molekülleri, immün aktivasyon ve immunosüpresyon arasında denge kurmada önemli rol oynamaktadır. Endotelyuma ulaştıktan sonra, adezyon molekülleri hücre hareketlerini desteklemekte ve bu şekilde T-lenfositler ve antijen sunucu hücrelerin arasında etkileşimi stabilize eder. Bu etkileşim, T-hücrelerin aktivasyonu için kritik bir olay olmaktadır. T hücreleri aktif hale geldiği zaman, IFN- γ , TNF- α ya da IL-1 gibi bir takım sitokinler salgırlar ki bu sitokinler ICAM-1 ve VCAM-1 adezyon moleküllerinin ifadesini artırır. Bu iki molekülün, MKH'ler ve T-hücreleri arasındaki etkileşimi arttırdığı gösterilmiştir [44].

Bu durumda MKH'lerde ICAM-1 ifadesi immunolojik hastalıklarda önemli rol oynamaktadır. Bu da MKH'lerin bir çok immunolojik hastalığın tedavisinde immunosüpresif olarak etki etmesini sağlamaktadır.

Adezyon moleküllerinin ligandlarının ya da reseptörlerinin engellenmesi hayvan modellerde birçok hastalığın kontrol altına alınmasında büyük fayda göstermektedir. ICAM-1 olmayan MKH'lerde, bu hücrelerin hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamda immunosüpresiv etkilerinin azaldığı gözlenmiştir [44].

İlk pasajlarda yağ dokusu izolasyonundan hemen sonra, MKH'ler stromal belirteç olarak **CD90**'ı (Thy-1) ifade eder. Hücreler pasajlandıkça, bu yüzey antijeninin ifadesinin yükseldiği ve P6'da en yüksek ifadesi gözlemlenmiştir (% 88.368). Sonuç olarak, CD90 yüzey antijeninin ifadesinin farklı pasajlarda değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir (p=0.031). P7 ve sonrasında morfolojik değişiklikler görülmüş, P7 ve sonraki pasajlarda ifadenin azaldığı tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmaya göre, CD90 (Thy-1) bir farklılaşma işaretleyicisi, özellikle osteoblastların farklılaşmasında işaretleyici olarak incelenmiştir [66]. Bu GPI-bağlı membran proteinin kesin bir biyolojik fonksiyonu bilinmemekte ve MKH'lerinde potansiyel rolü araştırılmaktadır.

Adipoz doku heterojen bir hücre popülasyonu içermekte ve stromal vasküler fraksiyon adipositler, vasküler endotel hücreleri ve bunların progenitor hücreleri ve hematopoetik hücreleri içermektedir. MKH'lerin kültüre edilmesi durumunda daha homojen hücre popülasyonu elde etmek mümkündür fakat kültür esnasında hücrelerin immunofenotipik özellikleri değişebilmektedir. MKH'leri için hem pozitif hem de negatif olarak tespit edilen bir başka yüzey antijeni ise **CD34**'tür. Gronthos ve ark. ve bir çok diğer araştırmacılar, MKH'lerin yüzeylerinde CD34 bulunduğunu [14][67][68], Katz ve ark. ve diğer araştırmacılar ise aynı işaretleyicinin bulunmadığını söylemiştir [27][28][69].

CD34 bir transmembran siyalomusin proteindir ve bu proteinin fonksiyonu hala tam olarak bilinmemektedir. Fakat çeşitli araştırmalara göre bu yüzey antijeni hem adezyon hem de adezyon olmayan molekül olarak, farklı mikroçevreye bağlı görev yaptığı gösterilmiştir. CD34'ün hematopoietik kök hücrelerin ve progenitor hücrelerin izolasyonunda ve tanımlanmasında kullanıldığı söylenmektedir [70]. Yakın zamanda, CD34 doku spesifik kök hücreleri ve diğer progenitor hücrelerinin tanımlanmasında kullanılmıştır [52].

CD34 aynı zamanda endotel progenitor hücrelerinin belirteci olarak kullanılmaktadır [71]. Kültüre edilmiş kemik iliği MKH'leri, genel olarak CD34 yüzey antijeni için negatif ifade gösterir. Fakat bu yüzey antijeninin yağ dokudan yeni izole edilen MKH'lerde ifade edilip edilmediği hala tartışılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, CD34 genel ifadesine bakıldığında, diğer yüzey antijenlerine göre daha az miktarda saptanmıştır (% 68.732). CD34 ifadesinde, 10 farklı pasajda değişiklik görülmüştür ($p=0.016$). Bu yüzey antijeninin ifadesi, geç pasajlarda azalmış ve P10'da minimum (% 48.615) değerine ulaşmıştır.

Dominici ve ark. MKH'lerinin tanımlanmasında minimal kriterlerden birini, CD34 ifadesinin negatif olmasını önermiştir [12]. Öte yandan, CD34 yüzey antijeninin bir stromal hücre belirteci olduğuna dair tartışmalar hala devam etmekte ve CD34'ün ifadesinin, hücre izolasyonu ve hücre kültür koşullarına bağlı olduğu söylenmektedir. Yeni izole edilen hücreler (stromal vaskular fraksiyon), heterojen hücre popülasyonu içerdiği için bu hücreler CD34 gibi kök hücre belirteçleri için pozitif olduğu söylenebilir. Mitchell ve ark. yapmış olduğu çalışmalarda, insan yağ doku kök hücrelerinin izolasyonundan hemen sonra, CD34'ün % 60 oranında ifade edildiğini göstermiş ve CD34 ifadesinde ilerleyen pasajlarda azalma gözlemlemiştir [14].

Bu tez çalışması ve diğer birçok çalışmalar, yağ dokudan yeni izolen MKH'lerin, yağ CD34+ hücre popülasyonuna sahip olduğunu göstermektedir [68].

Diğer bazı araştırmalarda, yağ dokuda iki farklı progenitor hücre popülasyonu olduğu göstermiş; bu hücreler CD34 (+) hücrelerden köken alan yağ dokusu MKH'leri ve CD34 (-) hücrelerden köken alan yağ dokusu MKH'leri olarak tanımlanmıştır [72]. Ayrıca Traktuev ve ark. CD34+ adipoz doku kökenli hücrelerin, perisit kökenli olduğunu söylemiştir [73].

Sonuç olarak, elde edilen farklı veriler ve yüzey antijenlerinin ifadesindeki farklılıklar hücre kültür yöntemine bağlı olduğu şeklinde özetlenebilir. Yüzey antijenlerin ifadelerindeki değişikliklerin, hücrelerin kültür ortamında uzun süre kalmasından kaynaklandığı söylenebilir. Aynı zamanda lokal mikroçevrenin, kök hücrenin hayatta kalma ve fenotipik özelliklerini devam ettirebilmede önemli bir etken olduğu söylenebilir.

Özetle çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre MKH'lerin farklı yüzey antijenlerinin ifadesinin ilk pasajlarda stabil olduğu söylenebilir ve gelecekte yapılacak olan *in vivo* uygulamalarda bu hücrelerin P3 ve P6 arasında kullanılması tercih edilmelidir, sonucuna varılabilir. Bu pasajlar, hem yüzey antijenlerinin ifadeleri yüksek olduğu için hem de MKH'ler kendi özelliklerini ve morfolojilerini koruyabildiği için optimal pasajlar olarak seçilebilir.

Başka bir önemli nokta ise; birçok yüzey antijenlerinin ifadesi, ilk pasajlarda hücre kültüründe salgılanmış çeşitli faktörler ve sitokin molekülleri tarafından etkilenmektedir. *In vitro* yüzey antijenlerinin ifadesi, *in vivo* daki ifadeleriyle her zaman örtüşmeyebilir. Bu da MKH'lerin detaylı *in vitro* karakterizasyonu ile bile, *in vivo* davranışları hakkında daha fazla araştırma gerektiğini göstermektedir.

MKH'lerin detaylı karakterizasyonunu yapabilmek için bu hücrelere özgü moleküler biyomarkerler tanımlanmalı, yeni ve gelişmiş proteomik çalışmalar yapılmalıdır. Bu şekilde bu hücrelerin, hücresel tedavilerde verimliliği artırılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Lodi, D., Iannitti, T., Palmieri, B., Stem cells in clinical practice: applications and warnings, *Journal of Experimental and Clinical Research*, 30, 1-20, **2011**.
- [2] Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L., Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature*, 414, 105–111, **2001**.
- [3] Şahin, F., Saydam, G., Omay, S. B., Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi, *The Turkish Journal of Hematology and Oncology*, 15, 48-56, **2005**
- [4] Can, A., A concise review on the classification and nomenclature of stem cells, *Turkish Journal of Hematology*, 25, 57–59, **2008**
- [5] Fortier, L. A., Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications, *Veterinary Surgery*, 34, 415–23, **2005**.
- [6] Canatan, H., İskender, B., İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ve hücre tedavisi, *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 4, 550–561, **2013**.
- [7] Baer, P. C., Geiger, H., Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity, *Stem Cells International*, 2012, 1-11, **2012**.
- [8] Caplan, A. I., Bruder, S. P., Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century, *Trends in Molecular Medicine*, 7, 259–64, **2001**.
- [9] 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*, 25, 2739–49, **2007**.
- [10] Pittenger, M. F., Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells, *Science*, 284, 143–147, **1999**.
- [11] Demiralp, E.E., Hücre yüzey antijenleri (CD sistemi)'nin immünolojiye katkısı, *Antibiotik ve Kemoterapi Kongresi Dergisi*, 22, 97–103, **2008**.
- [12] Dominici, M., Blanc, K. Le., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C, Krause, D.S, Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E.M., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 8, 315–317, **2006**.
- [13] Peng, L., Jia, Z., Yin, X., Zhang, X., Liu, Y., Chen, P., Ma, K., Zhou, C., Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue, *Stem Cells and Development*, 17, 4, 761–73, **2008**.

- [14] Mitchell, J. B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z. E., Kloster, A., Halvorsen, Y. Di., Storms, R. W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X., Gimble, J. M., Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers, *Stem Cells*, 24, 376–85, **2006**.
- [15] Ra, J. C., Shin, I. S., Kim, S. H., Kang, S. K., Kang, B. C., Lee, H. Y., Kim, Y. J., Jo, J. Y., Yoon, E. J., Choi H. J., Kwon, E., Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans, *Stem Cells and Development*, 20,1297–308, **2011**.
- [16] Kode, J.A., Mukherjee, S., Joglekar, M. V., Hardikar, A. A., Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration, *Cytotherapy*, 11, 377–91, **2009**.
- [17] Estrela, C., Alencar, A. H. G. De., Kitten, G. T., Vencio, E. F., Gava, E., Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration, *Brazilian Dental Journal*, 22, 91–8, **2011**.
- [18] Chong, P.-P., Selvaratnam, L., Abbas, A. A., Kamarul, T., Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells, *Journal of Orthopaedic Research*, 30, 634–42, **2012**.
- [19] Balaji, A. B., Jamil, K., Maruthiram, G., Habibulla, C. M., Isolation of a novel population of multipotent stem cells from epidermal layer of human skin, *Biology and Medicine*, 2, 57–67, **2010**.
- [20] Mennan, C., Wright, K., Bhattacharjee, A., Balain, B., Richardson, J., Roberts, S., Isolation and Characterisation of Mesenchymal Stem Cells from Different Regions of the Human Umbilical Cord, *BioMed Research International*, 2013, 1-8, **2013**.
- [21] Barlow, S., Brooke, G., Chatterjee, K., Price, G., Pelekanos, R., Rossetti, T., Doody, M., Venter, D., Pain, S., Gilshenan, K., Atkinson, K., Comparison of human placenta and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells, *Stem Cells and Development*, 17, 1095–107, **2008**.
- [22] Coppi, P. De., Bartsch, G., Siddiqui, M. M., Xu, T., Santos, C. C., Perin, L., Mostoslavsky, G., Serre, A. C., Snyder, E. Y., Yoo, J. J., Furth, M. E., Soker, S., Atala, A., Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy, *Nature Biotechnology*, 25, 100–106, **2007**.
- [23] Liu, T. M., Martina, M., Hutmacher, D. W., Hui, J. H. P., Lee, E. H., Lim, B., Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages, *Stem Cells*, 25, 750–60, **2007**.
- [24] Meza-Zepeda, L. A., Noer, A., Dahl, J. A., Micci, F., Myklebost, O., Collas, P., High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*,12, 553–63, **2008**.

- [25] Dahl, J.-A., Duggal, S., Coulston, N., Millar, D., Melki, J., Shahdadfar, A., Brinchmann, J. E., Collas, P., Genetic and epigenetic instability of human bone marrow mesenchymal stem cells expanded in autologous serum or fetal bovine serum, *International Journal of Developmental Biology*, 52,1033–42, **2008**.
- [26] Gimble, J. M., Katz, A. J., B. A., Bunnell, “Adipose-derived stem cells for regenerative medicine.,” *Circulation Research*, 100, 1249–60, **2007**.
- [27] Capra E., Beretta, R., Parazzi, V., Viganò, M., Lazzari, L., Baldi, A., Giordano, R., Changes in the proteomic profile of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells during passages, *Proteome Science*., 10, 1-13, **2012**.
- [28] Blaber, S. P., Webster, R. A., Hill, C. J. ., Breen, E. J., Kuah, D. , Vesey, G., Herbert, B. R., Analysis of in vitro secretion profiles from adipose-derived cell populations, *Journal of Translational Medicine*,10, 1-16 , **2012**.
- [29] Bourin, P., Bunnell, B.A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl H., Rubin, J. P., Yoshimura, K., Gimble J. M., Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy, *Cytotherapy*, 15, 641–8, **2013**.
- [30] Ong, W. K., Tan, C. S., Chan, K. L., Goesantoso, G. G., Chan, X. H. D., Chan, E., Yin, J., Yeo, C. R., Khoo, C. M., So, J. B. Y., Shabbir, A., Toh, S.-A., Han, W., Sugii, S., Identification of specific cell-surface markers of adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral fat depots., *Stem Cell Reports*, 2, 171–9, **2014**.
- [31] Docheva, D., Haasters, F., Schieker, M., Mesenchymal Stem Cells and Their Cell Surface Receptors, *Current Rheumatology Reviews*, 4, 155–160, **2008**.
- [32] Lazarus, H. M., Koç O.N., Mini-review Mesenchymal stem cells : heading into the clinic, *Bone Marrow Transplantation*, 27, 235–239, **2001**.
- [33] Luan, Y., Xu, W., The Structure and Main Functions of Aminopeptidase N, *Current Medicinal Chemistry*,14, 639-47, **2007**.
- [34] Rahman, M. M., Subramani, J., Ghosh, M., Denninger, J. K., Takeda, K., Fong, G.-H., Carlson, M. E., Shapiro, L. H., CD13 promotes mesenchymal stem cell-mediated regeneration of ischemic muscle, *Frontiers in Physiology*, 4, 1-12, **2014**.
- [35] Wong, A. H. M., Zhou, D., Rini, J. M., The X-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing, *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 804–813, **2012**.
- [36] Ip, J. E., Wu, Y., Huang, J., Zhang, L., Pratt, R. E., Dzau, V. J., Mesenchymal Stem Cells Use Integrin β 1 Not CXCR4 Chemokine Receptor 4 for Myocardial Migration and Engraftment, *Molecular Biology of the Cell*, 18, 2873–2882, **2007**.

- [37] Kansu, E., Hücre adezyon sistemi, *Antibiotik ve Kemoterapi Kongresi Dergisi*, 10, 314-317, **1996**.
- [38] Alberts, B., Johnson A., Lewis J., et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4. Baskı, Garland Science, New York, **2002**.
- [39] Kollar, K., Cook, M. M., Atkinson, K., Brooke, G., Molecular mechanisms involved in mesenchymal stem cell migration to the site of acute myocardial infarction, *International Journal of Cell Biology*, 2009, 1-9, **2009**.
- [40] Pruszek, J., Ludwig, W., Blak, A., Alavian, K., Isacson, O., CD15, CD24, and CD29 Define a Surface Biomarker Code for Neural Lineage Differentiation of Stem Cell, *Stem Cells*, 27, 2928–2940, **2012**.
- [41] Anonim, İntegrin connects the extracellular matrix with the actin cytoskeleton inside the cell, <http://www.nature.com/scitable/content/integrin-connects-the-extracellular-matrix-with-the-14707425> (Haziran, **2014**).
- [42] Ode, A., Kopf, J., Kurtz, A., Schmidt-Bleek, K., Schrade, P., Kolar, P., Buttgerit, F., Lehmann, K., Huttmacher, D. W., Duda, G. N., Kasper, G., CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells, *European Cells and Materials*, 22, 26–42, **2011**.
- [43] Ren, G., Roberts, A. I., Shi, Y., Adhesion molecules: key players in Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression, *Cell Adhesion and Migration*, 5, 20–2, **2011**.
- [44] Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L’Huillier, A., Ling, W., Roberts, A. I., Le, A. D., Shi, S., Shao, C., Shi Y., Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression., *The Journal of Immunology*, 184, 2321–8, **2010**.
- [45] Anonim, Novacastra CD54 (ICAM-1) <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/novacastra-reagents/primary-antibodies/details/product/cd54-icam-1-1/> (Haziran, **2014**).
- [46] Akar, A. R., Arat, M., Beksaç, M., et al., Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi, **2009**.
- [47] Wang, H.-W., Babic, A. M., Mitchell, H. A., Liu, K., Wagner, D. D., Elevated soluble ICAM-1 levels induce immune deficiency and increase adiposity in mice, *FASEB Journal*, 19, 1018–20, **2005**.
- [48] Lin, C.-S., Xin, Z.-C., Dai, J., Lue, T. F., Commonly Used Mesenchymal Stem Cell Markers and Tracking Labels: Limitations and Challenges, *Histology and Histopathology*, 28, 1109–1116, **2013**.
- [49] Homans, S.W., Ferguson, M. A. J., Dwek, R. A., Rademacher, T. W., Anand R., Williams, A. F., Complete structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein, *Nature*, 333, 269-272, **1988**.

- [50] Anonim, Oxford Glycobiology Institute. <http://www.bioch.ox.ac.uk/glycob/archive/>, (Haziran, **2014**).
- [51] Nielsen J. S., McNagny, K. M., CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery, *Microcirculation*, 16, 487–96, **2009**.
- [52] Nielsen, J. S., McNagny, K. M., Novel functions of the CD34 family, *Journal of Science*, 121, 4145–4145, **2008**.
- [53] Freshney, R. I., *Basic Principles of Cell Culture*, **2006**.
- [54] Niyaz, M., Gürpınar, Ö. A., Günaydin, S., Onur, M. A., Isolation , culturing and characterization of rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: a simple technique, *Turkish Journal of Biology*, 36, 658–664, **2012**.
- [55] Park E., Patel, A. N., Changes in the expression pattern of mesenchymal and pluripotent markers in human adipose-derived stem cells, *Cell Biology International*, 34, 979–84, **2010**.
- [56] Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V., Ho, A. D., Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process, *PLoS One*, 3, 1-12, **2008**.
- [57] Bhagwat, S. V., Lahdenranta, J., Giordano, R., Arap, W., Pasqualini, R., Shapiro, L.H., CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation, *Blood*, 97, 652–659, **2001**.
- [58] Winnicka, B., O’Conor, C., Schacke, W., Vernier, K., Grant, C. L., Fenteany, F. H., Pereira, F. E., Liang, B., Kaur, A., Zhao, R., Montrose, D. C., Rosenberg, D. W., Aguila, H. L., Shapiro, L. H., CD13 is dispensable for normal hematopoiesis and myeloid cell functions in the mouse, *Journal of Leukocyte Biology*, 88, 347–59, **2010**.
- [59] Pereira, F. E., Cronin, C., Ghosh, M., Zhou, S.-Y., Agosto, M., Subramani, J., Wang, R., Shen, J.-B., Schacke, W., Liang, B., Yang, T. H., McAulliffe, B., Liang, B. T., Shapiro, L. H., CD13 is essential for inflammatory trafficking and infarct healing following permanent coronary artery occlusion in mice, *Cardiovascular Research*, 100, 74–83, **2013**.
- [60] Subramani, J., Ghosh, M., Rahman, M. M., Caromile, L. A., Gerber, C., Rezaul K., Han, D. K., Shapiro, L. H., Tyrosine phosphorylation of CD13 regulates inflammatory cell-cell adhesion and monocyte trafficking, *The Journal of Immunology*, 191, 3905–12, **2013**.
- [61] Hu, X., Wei, L., Taylor T. M., Wei, J., Zhou, X., Wang, J., Yu, S. P., Hypoxic preconditioning enhances bone marrow mesenchymal stem cell migration via Kv2 . 1 channel and FAK activation, *American Journal of Cell Physiology*, 301, 362–372, **2011**.

- [62] Liao, X., Lu, S., Zhuo, Y., Winter, C., Xu, W., Wang, Y., Visualization of Src and FAK activity during the differentiation process from HMSCs to osteoblasts," *PLoS One*, 7, **2012**.
- [63] Meng, F., Rui, Y., Xu, L., Wan, C., Jiang, X., Li, G., Aqp1 enhances migration of bone marrow mesenchymal stem cells through regulation of FAK and β -catenin, *Stem Cells and Development*., 23, 66–75, **2014**.
- [64] Gao, J. X., Issekutz, A. C., The beta 1 integrin, very late activation antigen-4 on human neutrophils can contribute to neutrophil migration through connective tissue fibroblast barriers, *Immunology*, 90, 448-54, **1997**.
- [65] Lindbom, L., Werr, J., Integrin-dependent neutrophil migration in extravascular tissue, *Seminars in Immunology*, 14, 115–21, **2002**.
- [66] Wiesmann, A., Bühring, H.-J., Mentrup, C., Wiesmann, H.-P., Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation, *Head and Face Medicine*, 2, **2006**.
- [67] Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P.G., Storms, R. W., Gimble, J. M., Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells, *Journal of Cellular Physiology*, 189, 54–63, **2001**.
- [68] Maumus, M., Peyrafitte, J., D'Angelo, R., Fournier-Wirth, C., Bouloumié, A., Casteilla, L., Sengenès, C., Bourin, P., Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype, *International Journal of Obesity*, 35, 1141–53, **2011**.
- [69] Katz, A. J., Tholpady, A., Tholpady, S. S., Shang, H., Ogle, R. C., Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells, *Stem Cells*, 23, 412–23, **2005**.
- [70] Weissman I. L., Shizuru, J. A., 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*, 112, 3543–53, **2008**.
- [71] Fina, L., Molgaard, H. V., Robertson, D., Bradley, N. J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D. R., Baker, M. A., Greaves, M. F., Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells, *Blood*, 75, 2417–26, **1990**.
- [72] Yañez, R., Lamana, M. L., García-Castro, J., Colmenero, I., Ramírez, M., Bueren, J. A., Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease, *Stem Cells*, 24, 2582–91, **2006**.
- [73] Traktuev, D. O., Merfeld-Clauss, S., Li, J., Kolonin, M., Arap, W., Pasqualini, R., Johnstone, B. H., March, K. L., A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks, *Circulation Research*. 102, 77–85, **2008**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Minela Jusovic

Doğum Yeri: Prijepolje, Serbia

Medeni Hali: Bekar

E-posta: minela.jusovic@gmail.com

Adresi: 511. Slavna br.b SP 30/6 77240 Bos.Krupa, Bosnia & Herzegovina

Eğitim

Lise: Sarajevo college

Lisans: International University of Sarajevo, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Biological Sciences and Bioengineering

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce: ileri

Türkçe: C1

İş Deneyimi

-

Deneyim Alanları

-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-