T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

İYİ ÜRETİM UYGULAMALARI STANDARTLARINDA FARKLI TEKNİKLERLE İZOLE EDİLEN GÖBEK KORDONU KAYNAKLI ERKEN VE GEÇ PASAJ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İMMUNOFENOTİPİK, GENOMİK VE İMMUNSÜPRESİF ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

ZEHRAGÜL ERGÜL YÜKSEL

DANIŞMAN
PROF. DR. ERDAL KARAÖZ

KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

İSTANBUL-2021

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

İYİ ÜRETİM UYGULAMALARI STANDARTLARINDA FARKLI TEKNİKLERLE İZOLE EDİLEN GÖBEK KORDONU KAYNAKLI ERKEN VE GEÇ PASAJ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İMMUNOFENOTİPİK, GENOMİK VE İMMUNSÜPRESİF ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

ZEHRAGÜL ERGÜL YÜKSEL

DANIŞMAN
PROF. DR. ERDAL KARAÖZ

KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

İSTANBUL-2021

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum,“ İyi Üretim Uygulamaları Standartlarında Farklı Tekniklerle İzole Edilen Göbek Kordonu Kaynaklı Erken ve Geç Pasaj Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmunofenotipik, Genomik ve İmmunsüpresif Özelliklerinin Karşılaştırılması” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Zehragül ERGÜL YÜKSEL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve aynı zamanda beş buçuk seneyi geçen ve hala süren iş hayatım boyunca akademik bilgileri ve deneyimlerinden yararlandığım ve tüm desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam **Prof. Dr. Erdal Karaöz**'e;

Tez çalışmalarım boyunca, manevi desteğini benden esirgemeden bilgi birikim ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli çalışma arkadaşlarım **LivMedCell**'e;

Hayatım boyunca beni her konuda daima destekleyen, seven, hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve benim bu günlere gelmemi sağlayan annem **Elif Ergül**, babam **İsmail Ergül**, ablam **Işıl Ergül** ve eşim **Oğuz Yüksel**'e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... **HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.**
ETİK BEYANI ..... İİ
TEŞEKKÜR ..... İİİ
İÇİNDEKİLER ..... İV
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Vİİ
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... İX
ÖZET X
ABSTRACT ..... Xİ
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 4
1.1. MKH'lerin Genel Özellikleri 4
1.2. Göbek kordonundan WJ Kaynaklı Eksplant ve Enzimatik MKH İzolasyon Yöntemleri 5
1.3. Erken Pasaj ve Geç Pasaj MKH'ler 7
1.4. MKH'lerin Farklılaşma Kapasiteleri 8
1.5. MKH'lerin İmmunofenotipik ve Genomik Özellikleri 8
1.6. MKH'lerin İmmün Baskılama Kapasiteleri 10
1.7. MKH'lerin Klinik Kullanımları 13
1.7.1. Nörodejeneratif hastalıklar 17
1.7.2. Otoimmün hastalıklar 18
1.7.3. Kardiyovasküler hastalıklar 18
2. MATERYAL VE METOD 20
2.1. Göbek Kordonunun Seçilmesi ve Alınması 20
2.2. Göbek Kordonundan MKH İzolasyonu 20
2.2.1. Eksplant İzolasyon 20
2.2.2. Enzimatik İzolasyon 21
2.3. Alt Kültür İşlemleri 22
2.4. Hücre Dondurma ve Çözme İşlemleri 22
2.5. MKH'lerin Karakterizasyon Çalışmaları 23
2.6. Akım Sitometri Çalışmaları 23
2.7. Yara İyileşmesi Deneyi 23

2.8. Farklılaştırma Çalışmaları....24
2.8.1. Osteojenik Farklılaştırma....24
2.8.2. Alkalin Fosfataz Deneyi....24
2.9. İmmun Baskılama Özelliklerinin Belirlenmesi....25
2.9.1. MTT Testi ile Proliferasyon Tespiti....26
2.10. Hücrelerin İki Katına Çıkma Süresinin Belirlenmesi....26
2.11. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi....27
2.11.1. RNA İzolasyonu....27
2.11.2. cDNA Sentezi....27
2.11.3. Real-Time PCR....28
2.12. İstatiksel Analiz....29
3. BULGULAR....30
3.1. Morfolojik Bulgular....30
3.2. İmmunofenotipik Bulgular....33
3.3. Yara İyileşmesi Deney Bulguları....39
3.4. MKH'lerin Farklılaşma Bulguları....41
3.5. İmmun Baskılama Özellik Analizi Bulguları....42
3.6. Hücrelerin İki Katına Çıkma Süresinin Belirlenmesi....43
3.7. Gen Ekspresyon Düzeyi Analizi Bulguları....44
4. TARTIŞMA VE SONUÇ....48
KAYNAKÇA....54
ETİK KURUL ONAYI....62
İNTİHAL RAPORU....64

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1: MKH kaynakları ve hücre yüzeyi belirteçlerinin özeti (Ullah ve ark., 2015). 9
Tablo 2.1: Gerçek zamanlı PCR analizinde kullanılan genlerin sembolleri, gen tanımları ve gen isimleri. 28
Tablo 3.1: Alt kültür işlemlerinde hücrelerin pasajının geldiği gün sayısı ve pasaj atlatma sonrası elde edilen hücre sayısı / canlılıklar (Tüm hücreler pasaj 1'den itibaren T225 flasklara $1x10^6$ hücre ekilmiştir. Yalnızca izolasyon sonrası pasaj 0'da enzimatik hücreler 4 adet T175 flaska, eksplant hücreler 4 adet 100 mm petriye ekilmiştir.) 31
Tablo 3.2: MKH'lerin akım sitometri analizi sonuçları. 38
Tablo 3.3: Hücrelerin iki katına çıkma süreleri. 43
Tablo 3.4: Eksplant ve enzimatik WJ-MKH'ler için genlerin C_T değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları. 44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1: İnsan göbek kordonunun kesit diyagramı, kök hücre kaynağı olan Wharton's jelly dahil anatomik bölmeleri göstermektedir. (Kim ve ark., 2013) 6
Şekil 1.2: MKH-NK etkileşimi (De ve ark., 2012). (A) Daha önce aktive edilmemiş NK'ler: NK'ler, MKH'lerde immünosupresif özellikleri aktive eden IFN-y'nin erken salınımına yol açan NKp30 ve LFA1 reseptörleri vasıtasıyla MKH'lerle etkileşime girmektedir. Bu MKH'ler NK reseptörlerinin ekspresyonunu düşürmekte ve böylece NK'lerin hedef hücrelerine karşı sitokin üretimini ve sitotoksisitesini inhibe etmektedir. Bu immünosupresyon, TGF-P, PGE-2 ve HLA-G5'in MKH üretimine aracılık etmektedir. (B) Önceden aktive edilmiş NK'lar: Daha önce IL-2 veya IL-15 tarafından aktive edilen NK'lar, perforin salınımıyla allojenik ve otojenik MKH'leri öldürebilirler. Bu etkileşime NK'lerde NKG2D, LFA-1, NKP30 ve DNAM-1 ve bunların MKH'lerdeki benzerleri aracılık etmektedir. 12
Şekil 1.3: MKH migrasyonu ve doku onarımı arasındaki ilişkinin şematik diyagramı. MKH'ler hasarlı dokudan salınan yaralanma sinyalini algıladığında, yaralanan dokuya çoklu mekanik ve kimyasal faktörler tarafından düzenlenen çevresel dolaşım yoluyla göç etmektedir. Hasarlı doku bölgesine ulaştıktan sonra, MKH'ler hasarlı dokuların yara iyileşmesini iki anahtar rolle gerçekleştirebilmektedir; parakrin mekanizma veya yönlendirilmiş farklılaşma (Fu ve ark., 2019). 14
Şekil 2.1: Eksplant ve enzimatik izolasyon metotlarının şematik gösterimi. 21
Şekil 3.1: Enzimatik kültür MKH (A, B, C) ve eksplant kültür MKH'lerinin (D, E, F) izolasyondan sonra P0'daki 4., 7. Ve 10. günlerine ait zıt faz mikroskobisindeki morfolojik görünümleri. (Orijinal Büyütme: A, B, C, D, E, F: 4X) 30
Şekil 3.2: Eksplant izolasyon MKH P2'nin akım sitometrik verileri. 34
Şekil 3.3: Eksplant izolasyon MKH P6'nın akım sitometrik verileri. 35
Şekil 3.4: Enzimatik izolasyon MKH P2'nin akım sitometrik verileri. 36
Şekil 3.5: Enzimatik izolasyon MKH P6'nın akım sitometrik verileri. 37
Şekil 3.6: Enzimatik ve eksplant kültür MKH'lerin yara oluşturulmasını takip eden kontrol (0. Saat) ile 8, 24, 32, 48, 56, 72, 96 saatlerine ait zıt faz mikroskobisindeki morfolojik görünümleri. (Orijinal Büyütme: 4X) 39
Şekil 3.7: MKH'lerin yara iyileşme bölgeleri %'si grafiği. 40
Şekil 3.8: 21 gün boyunca osteojenik farklılaşmaları indüklenen ve kontrol MKH'lerin Alizarin Red S boyamaları. 41

Şekil 3.9: Osteojenik farklılaşmaları indüklenen MKH'lerin ALP aktivasyonu bulguları. 41
Şekil 3.10: 1 ve 4 gün boyunca MKH'lerle ko-kültür yapılan periferik kan mononükleer hücrelerin proliferasyon bulguları. 42
Şekil 3.11: Eksplant ve enzimatik P2 MKH'lerin gen ekspresyonu bulguları. 46
Şekil 3.12: Eksplant ve enzimatik P6 MKH'lerin gen ekspresyonu bulguları. 46

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

AH : Alzheimer Hastalığı

ALP : Alkalin Fosfataz

ALS : Amyotrophic Lateral Sclerosis (Amyotrofik Lateral Skleroz)

DH : Dendritik Hücre

DMSO : Dimetilsülfoksit

DPBS : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi)

FBS : Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumu)

GMP : Good Manufacturing Practices (İyi Üretim Uygulamaları)

GVHH : Graft Versus Host Hastalığı

IBMX : 3-Isobutyl-1-Methylxanthine

IL-2 : Interleukin-2 (İnterlökin-2)

ITS : Insulin-Transferrin-Selenium (İnsülin-Transferrin-Selenyum)

MKH : Mezenkimal Kök Hücre

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NK : Natural Killer (Doğal öldürücü)

P : Pasaj

PBS :Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi)

PD :Parkinson's Disease (Parkinson Hastalığı)

PHA :Phytohemagglutinin (Fitohemaglutinin)

PA :Rheumatoid arthritis (Romatoid Artrit)

SLE :Systemic Lupus Erythematosus (Sistemik Lupus Eritematozus)

WJ :Wharton's Jelly (Wharton'un Jölesi)

ÖZET

ERGÜL YÜKSEL, Zehragül. (2021). İyi Üretim Uygulamaları Standartlarında Farklı Tekniklerle İzole Edilen Göbek Kordonu Kaynaklı Erken ve Geç Pasaj Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmunofenotipik, Genomik ve İmmunsüpresif Özelliklerinin Karşılaştırılması. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ve Doku Mühendisliği ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH'ler); kemik, kıkırdak, kas, yağ, sinir, epitel vb. hücrelere farklılaşma kapasitelerinin yanında kendini yenileme özelliğine de sahiptir. Göbek kordonu, Wharton's Jelly (WJ) olarak adlandırılan ve MKH bakımından oldukça zengin bir jelatinli bir bağ dokusu içermektedir. WJ-MKH'ler; hem otolog hem allojenik kullanımda terapötik özelliklere sahip olmaları, üç germ katmanına farklılaşma yetenekleri, immün yanıtı modüle etme özellikleri, doku onarımını teşvik etmeleri, hasarlı dokuda birikerek sitokin salınımları gibi özellikleri rejeneratif tıpta kullanımlarını öne çıkarmaktadır. İyi Üretim Uygulamaları, ürünlerin kalite standartlarına göre üretilmesini, ürünlerdeki risklerin en aza indirgenmesini ve tespit edilmesini sağlayan bir sistemdir. Bu tez çalışması kapsamında göbek kordonu, İyi Üretim Uygulamaları laboratuvarına ulaştırılmış ve izolasyon dahil hücre üretim aşamaları bu standartlarda gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte bu çalışma, göbek kordonundan enzimatik ve eksplant olmak üzere iki farklı yöntemle izole edilen ve farklı pasaj numaralarına (P2 ve P6) getirilen MKH'lerin fenotipik özellikleri, genomik özellikleri, immun düzenleyici özelliklerini tartışmaktadır. Bu sayede hücresel tedaviler için, en çok hücreyi elde edebileceğimiz ve aynı zamanda tüm MKH özelliklerini koruyan pasaj numarası ve izolasyon yönteminin belirlenmesi hedeflenmiştir. Hücrelerin çoğalma hızları, farklılaşma kapasiteleri, spesifik yüzey belirteçleri, gen ekspresyon profilleri, yara iyileşme kapasiteleri, immün düzenleyici özellikleri karşılaştırılmıştır. Yapılan tüm çalışmaların sonuçlarına göre; 4 farklı hücrenin de tüm MKH özelliklerine sahip olduğu ve klinikte kulanılabileceği görülmüştür. Enzimatik ve eksplant izolasyonla elde edilen hücreler arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Her ne kadar erken pasaj kök hücrelerin daha iyi rejeneratif etkiye sahip olduğu bilinse de, P6'ya daha fazla hücre getirilebileceği için bir dokudan çok hücre gereksinimi duyulduğu durumlarda P6 hücrelerinin kullanılabilirliğinin de mümkün olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal Kök Hücre, İyi Üretim Uygulamaları, Göbek Kordonu, Wharton's Jelly

ABSTRACT

ERGUL YUKSEL, Zehragul. (2021). Comparison of Immunophenotypic, Genomic and Immunosuppressive Properties of Umbilical Cord Originating Early and Late Passage Mesenchymal Stem Cells Isolated by Different Techniques in Good Manufacturing Practices Standards. Istinye University, Institute of Health Science, Stem Cell and Tissue Engineering. Master Thesis. Istanbul.

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) have the ability to differentiate into cells such as bone, cartilage, muscle, fat, nerve, epithelium, etc., as well as self-renewal. The umbilical cord contains a gelatinous connective tissue called Wharton's Jelly (WJ), which is very rich in MSCs. WJ-MSCs have therapeutic properties in both autologous and allogeneic use, their ability to differentiate into three germ layers, their ability to modulate the immune response, their ability to stimulate tissue repair, and their use in regenerative medicine such as cytokine release by accumulating in damaged tissue. Good Manufacturing Practices is a system that ensures that products are produced according to quality standards, and that risks in products are minimized and detected. Within the scope of this thesis, the umbilical cord was delivered to the Good Manufacturing Practices laboratory and the cell production stages including isolation were carried out in these standards. However, this study discusses the phenotypic characteristics, genomic features, and immunomodulatory properties of MSCs isolated from the umbilical cord by two different methods, enzymatic and explant, and brought to different passage numbers (P2 and P6). In this way, it was aimed to determine the passage number and isolation method that we can obtain the most cells for cellular treatments and at the same time preserve all MSC properties. Proliferation rates, differentiation capacities, specific surface markers, gene expression profiles, wound healing capacities, immunomodulatory properties of cells were compared. According to the results of all studies carried out, it was seen that 4 different cells have all the properties of MSC and can be used in the clinic. There was no significant difference between the cells obtained by enzymatic and explant isolation. Although it is known that early passage stem cells have a better regenerative effect, it has been observed that P6 cells can be used in cases where more cells are needed than a tissue, since more cells can be brought to P6.

Key Words: Mesenchymal Stem Cell, Good Manufacturing Practices, Umbilical Cord, Wharton's Jelly

GİRİŞ

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler); mezoderm tabakasından köken alan farklılaşmamış, çoğalma kapasitesi yüksek, kendini yenileyebilme özelliğine sahip ve aynı zamanda mezodermal farklılaşma kapasitesi yüksek olan multipotent kök hücrelerdir (Ding ve ark., 2015). Kemik iliği, göbek kordonu, yağ, periferik kan ve diş kökü gibi çeşitli yetişkin dokulardan izole edilebilmektedirler (Li ve Hua, 2017) ve MKH'ler tüm bu özellikleriyle birlikte rejenerasyon sürecinin önemli bileşenlerdir (Lee ve ark., 2015). İzolasyon ve çoğaltma protokollerinde standardizasyon oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra bu hücreler tarafından farklı koşullarda salgılanan kimyasal faktörler; düzenleyici T (Treg) hücrelerini indüklemeyle birlikte, dendritik hücrelerin olgunlaşmasını ve T hücrelerinin, B hücrelerinin ve doğal öldürücü hücrelerin fonksiyonlarını baskılayarak bağışıklık sistemini de etkileyebilmektedir (Karaoz ve ark., 2017). Yapılan çalışmalarla bu özellikler, MKH'lerin başta inflamatuar ve otoimmün hastalıklar olmak üzere birçok hastalıkta potansiyel bir immünoterapötik yöntem olarak ortaya çıkmasını sağlamıştır (Li ve Hua, 2017; Yoo ve ark., 2009; Najar ve ark., 2009).

MKH'lerin klinikte kullanımı en fazla akut graft versus host hastalığında (GVHH) olmuştur. GVHH'nin steroid tedavisine cevap vermeyen hastalarda başka etkili bir tedavisi olmayışı, MKH tedavisini gündeme getirmiş ve yapılan çalışmalarla klinik uygulamaların önü açılmıştır (Lee ve ark., 2015; Karaoz ve ark., 2017; Amorin ve ark., 2014). MKH'lerin immün düzenleyici özellikleri sayesinde GVHH'de nakil sonrası hematopoezin desteklenmesinde rol aldıkları ve terapötik role sahip oldukları bilinmektedir (Wu ve ark., 2011). Yine immün düzenleyici özellikleri ve beraberinde gelen doku rejenerasyonunu geliştirme ve immün rahatsızlıkları tedavi etme potansiyelleriyle birlikte SLE, romatoid artrit, Tip 1 diyabet ve Crohn gibi hastalıklar için klinik çalışmaları devam etmektedir (Li ve Hua, 2017).

Önemli bir MKH kaynağı olan göbek kordonu, büyük ölçüde içerideki kan damarlarını çevreleyen ve koruyan mukopolisakkaritlerden oluşan ve Wharton's Jelly (WJ) olarak adlandırılan jelatinli bir bağ dokusu içermektedir. Fetüse oksijenli, besin yönünden zengin kan taşıyan bir ven ve ve deoksijenlenmiş, besini tükenen kanı uzaklaştıran iki arter içermektedir. İnsan göbek kordonu, umut verici bir MKH kaynağıdır ve ağrısız toplama prosedürüne sahip olmasıyla birlikte bu hücrelerin hem

otolog hem allojenik kullanımda terapötik özelliklere sahip olduğu konusunda yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır (Kalaszczynsk ve Ferdyn, 2015; Nagamura-Inoue ve He, 2014). Göbek kordonu kaynaklı MKH'lerin kendini yenileme potansiyelleri oldukça yüksektir. Bunun yanı sıra etik problem oluşturmamaları, üç germ katmanına farklılaşma yetenekleri, immün yanıtı modüle etme özellikleri, doku onarımını teşvik etmeleri, hasarlı dokuda birikerek sitokin salınımları gibi özellikleri rejeneratif tıpta kullanımlarını öne çıkarmaktadır (Wang ve ark., 2014).

Göbek kordonundan izole edilen MKH'ler; CD44, CD105, CD90 ve CD73 hücre yüzeyi belirteçlerini eksprese etmektedir (Wiesmann ve ark., 2006). Buna karşılık CD45, CD34, CD11b, CD19 hematopoetik belirteçleri ve HLA-DR hücre yüzey reseptörünü eksprese etmemektedir (Wagner ve ark., 2005; Javazon ve ark., 2004).

Rejeneratif özelliklere ek olarak, MKH'ler immün düzenleyici kapasiteye sahiptir ve çeşitli durumlarda immunsüpresif etkilere neden olmaktadır. *İn vitro'*da MKH'ler, T hücrelerinin, B hücrelerinin, doğal öldürücü hücrelerin (NK) ve dendritik hücrelerin (DH) hücre çoğalmasını inhibe ederek, bölünmelerini durdurduğu bilinmektedir. MKH'ler; sitokin salgılanması, T ve NK hücrelerinin sitotoksisitesi, B hücre olgunlaşması ve antikor salgılaması, DH olgunlaşması ve aktivasyonu, antijen sunumu gibi çeşitli immün hücre fonksiyonlarını durdurabilmektedir (De ve ark., 2012; Sotiropoulou ve ark., 2006; Spaggiari ve ark., 2008). Ayrıca, infüzyondan sonra, MKH'ler hemen hemen her organa, ancak tercihen yaralanan yerlere, iltihaplanma bölgelerine ve lenfoid organlara dağılmaktadır. Bütün bu özellikler, immün düzenleyici amaçlar için MKH tedavisinin değerlendirilmesine yol açmıştır (Yagi ve ark., 2010; Aggarwal ve Pittenger, 2005).

İyi Üretim Uygulamaları (GMP - Good Manufacturing Practice), ürünlerin kalite standartlarına göre üretilmesini ve sonrasında kontrol edilmesiyle ürünlerdeki risklerin en aza indirgenmesini ve tespit edilmesini sağlayan bir sistemdir. GMP; tesisi, tüm ekipmanları, tüm çalışan personelin eğitimini ve üretimin tüm basamaklarını kapsamaktadır. İnsana uygulanabilmesi için bir ürünün GMP standartlarında hazırlanması gerekmektedir. Bu tez çalışması kapsamında doku Liv Hospital Rejeneratif Tıp ve Kök Hücre Üretim Merkezi bünyesindeki GMP laboratuvarına ulaştırılmış ve izolasyon dahil hücre üretim aşamaları GMP standartlarında

gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte bu çalışma, WJ'den farklı yöntemlerle izole edilen mezenkimal kök hücrelerin fenotipik özellikleri, genomik özellikleri, immun düzenleyici özellikleri, terapötik uygulama potansiyelleri ve optimizasyonunu tartışmaktadır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. MKH'lerin Genel Özellikleri

Kök hücre kavramı, 19. yüzyılın sonunda, belirli dokuların (kan, deri vb.) kısa ömürlü hücrelerden oluşmalarına rağmen bir organizmanın ömrü boyunca kendi kendini yenileme yeteneğini açıklamak için teorik bir varsayım olarak ortaya çıkmıştır. Yıllar sonra kök hücrelerin ayrı hücresel varlıklar olarak tanımlanmasını, kök hücre adaylarının prospektif izolasyon yöntemlerinin geliştirilmesi ve in vivo transplantasyondan sonra etkilerini test etmek için biyo-deneylerin tasarımları izlemiştir. MKH ile ilgili çalışmaların örnekleri 19. yüzyıla kadar uzanırken (Goujon, 1869), Tavassoli ve Crosby'nin çalışmaları kemik iliği ile ilişkili doğal bir osteojenik potansiyelin kanıtını açıkça ortaya koymuştur (Tavassoli ve Crosby, 1968). Edinilen bilgiler ışığında MKH'ler hakkındaki çalışmalar daha ileri bir boyut kazanmıştır. Günümüzde halen kullanılmakta olan bu bilgilerin birçoğunun dayanağını oluşturan bu çalışmalar tarihe geçmiştir. Kök hücreler adına diğer büyük adımı atan Friedenstein ve arkadaşları, 1976 yılında mezenkimal kök hücreleri ve hematopoetik mikro ortamı keşfetmiştir. Fetal buzağı serumu içeren kemik iliği materyalinin ortama yayılması sonucunda, adezyon yeteneği olan, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen, kemik hücreleri ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip hücre kolonilerinin varlığını bildirmiştir. Takip eden yıllarda yapılan çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin her üç germ yaprağından köken alan hücre ve/veya dokulara farklılaşabilen hematopoetik olmayan multipotent kök hücreler oldukları anlaşılmıştır. Günümüzde bu hücreler genel olarak mezenkimal tip hücrelere farklılaşma yeteneklerinden dolayı mezenkimal kök hücre olarak adlandırılmışlardır. Friedenstein ve arkadaşlarının bu başarısı, diğer bilim insanlarına ve doktorlara, çeşitli ciddi hastalıkların tedavisi için kök hücre nakli ve diğer hücresel terapi yöntemleri geliştirmeleri için ilham vermiştir (Bianco ve ark., 2008).

Heterojen bir hücre popülasyonu olan ve multipotent mezenkimal stromal hücreler olarak da tanımlanabilen MKH'ler; kemik, kıkırdak, kas, yağ, sinir, epitel vb. hücrelere farklılaşma kapasitelerinin yanında kendini yenileme özelliğine de sahiptir (Uccelli ve ark., 2008). Kök hücre mikro çevresinde bulunan fiziksel, kimyasal ve biyolojik işaretler, *in vivo* kök hücre kaderinin yöneticileri olarak gösterilmiştir (Kilian ve ark., 2010). Bu farklılaşma kapasiteleriyle birlikte MKH'ler, rejeneratif tıpta ve doku mühendisliğinde terapötik kullanım açısından hücre ve gen tedavilerinde ilgi

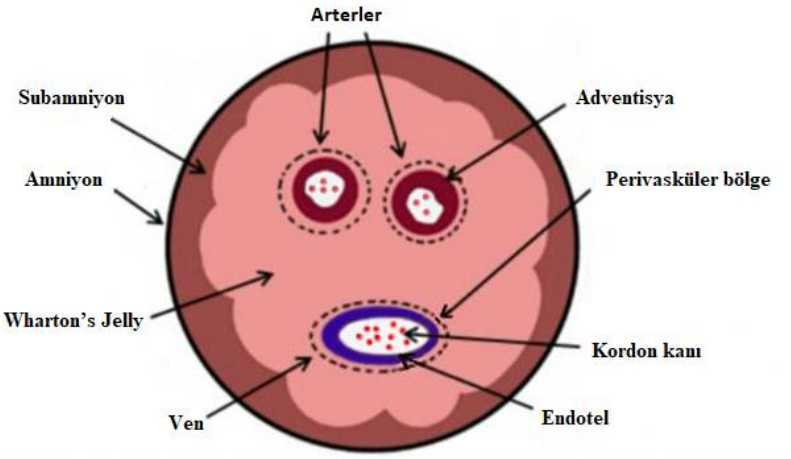
çekmektedir (Ullah ve ark., 2015). Ayrıca MKH'ler hematopoezi destekleyen stromal hücreler olarak da işlev görebilirler (Liu ve ark., 2009).

MKH'ler, *in vitro*'da adherent hücreler olarak yani bulunduğu plastik kültür kabına yapışarak ve koloniler oluşturarak çoğalmaktadır ve fibroblast benzeri morfolojiye sahiptir. Ayrıca MKH'ler başka hücrelere farklılaşma kapasitelerinin yanında; hasarlı hücre ile füzyon yeteneği olması, büyüme faktörleri, sitokin, kemokinler vb. salgılayarak hasarlı hücre/doku tamirine katkı sağlaması, migrasyon özellikleri sayesinde hasarlı dokuya ulaşabilmeleri, gen transferi kolaylığı ve dayanıklı olmaları nedeniyle gen tedavisi için uygun olmaları, immünsüpresif özellikte olmaları sayesinde son yıllarda klinik kullanımda avantajlı hücre grupları olarak gösterilmiştir ve hücresel tedavilerin önü açılmıştır (Bonab ve ark., 2006).

Tüm çalışmaların ve klinik uygulamaların sürdürülebilirliği için en önemli adım, MKH'lerin doğru yöntem ile izolasyon ve sonrasında çoğaltma işlemleridir. Klinik kullanıma uygun MKH için tüm *in vitro* işlemlerin uluslararası kabul edilmiş standartlarda iyi üretim uygulamaları (Good manufacturing practice; GMP) yapılması gerekmektedir. Bunun da ciddi bir teknoloji, alt yapı, deneyim gerektirmesi ve maliyetinin fazla olması nedeniyle en uygun koşulların belirlenmesi esastır ve bu yönde çalışmalar sürmektedir.

1.2. Göbek kordonundan WJ Kaynaklı Eksplant ve Enzimatik MKH İzolasyon Yöntemleri

Göbek kordonu, iki umbilikal arter ile bir ven ve bu damarları çevreleyen spesifik bir embriyonik mukoz dokudan oluşan Wharton's jelly içermektedir. Göbek kordonunda bulunan ve damarların çevresini saran Wharton's jelly, miyofibroblast benzeri stromal hücreler ve kollajen fibriller içeren jelatinimsi bir bağ dokusu yapısındadır. (Kim ve ark., 2013)



Şekil 1.1: İnsan göbek kordonunun kesit diyagramı, kök hücre kaynağı olan Wharton's jelly dahil anatomik bölmeleri göstermektedir. (Kim ve ark., 2013)

Göbek kordonu fetüsten türetilmiş bir dokudur ve WJ'den türetilen MKH'ler, yetişkin MKH'lerden daha yüksek proliferasyon ve daha büyük ex vivo genişleme yeteneklerine sahip olmak gibi fetal türevli MKH'lere özgü bazı özellikleri paylaşmaktadırlar (Nekanti ve ark., 2010; Batsali ve ark., 2013). Ayrıca, göbek kordonlarının WJ'den elde edilen MKH'ler, etik kaygılar olmadan, doğumdan sonra atılan bir dokudan kolayca izole edilebildiği için son yıllarda çok dikkat çekmiştir (Batsali ve ark., 2013). Yapılan ve devam eden çalışmalar, WJ'den hem enzimatik hem eksplant yöntem ile (Azandeh ve ark., 2012; Yoon ve ark., 2013; Bruyn ve ark., 2011; Montanucci ve ark., 2011) türetilen kök hücrelerin, çeşitli hastalıkların tedavisi için nakledilebilir hücreler olarak birçok potansiyel avantaja sahip olduğunu göstermektedir. Enzimatik izolasyon, kordon dokusunun sindirimi için kollajenaz gibi proteazların kullanımına dayanırken; eksplant izolasyon, MKH'lerin kordon matrisinden doku kültürü kabının plastik yüzeyine göç etme kabiliyetine dayanmaktadır.

Bu çalışmada, MKH'lerin tüm özellikleriyle birlikte avantaj ve dezavantajlarını karılaştırmak amacı ile göbek kordonundan hem eksplant hem de enzimatik yöntemle hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Göbek kordonu örnekleri sezeryan doğum sonrasında atık olarak değerlendirilen parçadan alınmıştır ve aseptik koşullar altında 100 U/mL penisilin, 0.1 mg/mL streptomisin (Gibco, USA) çeren PBS içinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Her iki yöntemde de doku mevcut atar ve toplardamarlardan tamamen arındırılmıştır. Eksplant yöntem kimyasal kullanmadan MKH bakımından zengin olan dokunun kültür kaplarına direkt temasıyla hücrelerin dökülmesi ve

çoğalmasına dayanırken; enzimatik yöntem ile dokunun enzime maruz bırakılarak hücrelerin açığa çıkması ve santrifüj ile çöktürülen hücrelerin kültür kaplarına ekilerek çoğalmaları sağlanmıştır.

1.3. Erken Pasaj ve Geç Pasaj MKH'ler

MKH'ler, *in vitro'*da adherent hücreler olarak çoğaldıkları için belirli sürede, hücreler kısıtlı yüzey alanını doldurdukları zaman pasajlama işlemi yapılması gereklidir. Hücreler kültürde yoğun duruma gelince hem besi ortamı hücreler için yetersiz hale gelir, hem de kültür kabında yer olmadığı için kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma ile hücrelerin çoğalmaları durur. Bu her bir pasajlama işleminin ardından hücreler bir pasaj numarası büyürler ve bu pasaj numarası hücrelerin özelliklerini koruyabilmeleri ve kaderleri için çok önemlidir.

İnsan MKH'lerin, erken pasaj numaralarında osteojenik ve adipojenik farklılaşma kapasitelerinin yüksek olmasına rağmen, bu farklılaşma kapasitelerinin hücre kültürünün geç fazlarında azaldığı ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Tanabe ve ark., 2008; Nekanti ve ark., 2010). Gerçekleştirilen başka bir çalışmada MKH'lerin 6. pasajda farklılaşma potansiyellerinin düştüğü, kök hücre özelliklerini kaybettiği bildirilmiştir ve hücresel tedaviler için erken pasajdaki hücrelerin daha efektif olacağı düşünülmektedir (Yang, 2018). 2018 yılında gerçekleştirilen bir çalışmanın sonucunda ise P3 ve P7'deki MKH'lerin karılaştırılmalı analizlerinin yapılması ile bu iki farklı pasajdaki MKH'lerde önemli bir fark tespit etmediklerini bildirmişlerdir (Sareen ve ark., 2018).

Gen ekspresyonu ve fenotip, erken pasaj ve geç pasajdaki hücre hatları arasında değişebilmektedir. Hücreler *in vitro* ortamda uzun süre çoğaltıldıktan sonra dış etkenlerle birlikte manipülasyona uğramaktadır ve sonuç olarak, geç pasajdaki hücreler artık orijinal kaynak dokusunun güvenilir modellerini temsil etmekten uzaklaşabilmektedir. Öte yandan MKH'lerin klinik kullanımında istenilen fonksiyonlarını koruyan belirli bir hücre sayısına ulaşmak gerektiği için, kültürde hücreleri pasaj ilerleterek belirli bir sayıya çoğaltmak gereklidir. Bu pasaj atlatma sırasında aynı zamanda MKH'lerin tüm özelliklerini de koruması önemlidir. Kültür şartlarında çoğaltılan MKH'lerde *in vitro* yaşlanmaya bağlı olarak oluşan modifikasyonların klinikte yetersiz sonuçlara sebep olabileceği düşünülmektedir (33). Bu sebeple bu çalışmada, klinikte kullanılan göbek kordonunun Wharton's Jelly'den

izole edilmiş insan MKH'lerinin pasaj numaralarının ilerlemesi ve daha çok hücre elde edilmesiyle oluşabilecek farklı kültür koşulları karşılaştırılmıştır ve daha uygun olan pasaj numarası ile izolasyon yöntemi saptanarak gelecek çalışmalara ve klinik uygulamalara önderlik etmesi hedeflenmiştir.

1.4. MKH'lerin Farklılaşma Kapasiteleri

MKH'ler mezoderm tabakadan köken almakla beraber özellikle mezodermal farklılaşma kapasiteleri oldukça yüksektir (Vodyanik ve ark., 2010). Her ne kadar tartışmalı olsa da, miyositlere ve kardiyomiyositlere ve hatta hepatositler, insülin üreten hücreler ve nöronlar dahil mezodermal kaynaklı olmayan hücrelere farklılaştıkları da bildirilmiştir. MKH'lerin farklı hücre tiplerine farklılaşmasını sağlayan bazı biyolojik ve kimyasal sinyaller belirlenmiştir ve *in vitroda* farklılaştırma çalışmalarında kullanılmaktadırlar. MKH'ler üzerinde düzenleyici etkileri olan büyüme faktörleri arasında; dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF-b) süper familyasının üyeleri, insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF), fibroblast büyüme faktörleri (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve Wnt olarak bilinen büyüme faktörleri ailesi bulunmaktadır (Liu ve ark., 2009). Hazır besiyerine ek olarak in vitroda osteojenik farklılaşma için deksametazon, β-gliserofosfat ve askorbik asit kimyasalları; adipojenik farklılaşma için IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), deksametazon, indometazin ve insan insülin solüsyonu; kondrojenik farklılaşma için ise ITS (Insulin- Transferrin-Selenium), sodyum piruvat, prolin, deksametazon ve askorbik asit kimyasalları ile birlikte TGF beta 1 büyüme faktörü kullanılmaktadır.

1.5. MKH'lerin İmmunofenotipik ve Genomik Özellikleri

International Society for Cellular Therapy (ISCT) derneğinin standart kriterlerine göre, spesifik hücre yüzeyi belirteçlerinin ekspresyonu MKH'lerin temel özelliklerinden biridir (Ullah ve ark., 2015). MKH'lerin ayırt edilmesinde kullanılan belirteçler, hücrelerin yansıttığı özelliklere göre belirlenmiştir. Pozitif belirteç olan CD105 (endoglin olarak da bilinir), CD73 (ekto-5′-nükleotidaz), CD44, CD90 (THY1), CD71 (transferrin reseptörü), gangliosid GD2 ve CD271'i (düşük afiniteli sinir büyüme faktörü reseptörü) ise farklı seviyelerde olsalar da ifade etmektedirler (20). Bu değişebilen ifade seviyeleri; doku türünden ve kültür şartları farklılıklarından

kaynaklanabilmektedir. Özellikle göbek bağı kaynaklı WJ-MKH'leri için asıl olarak CD44, CD105, CD90 ve CD73 belirteçleri pozitif olarak belirlenmiştir.

MKH'ler hematopoetik belirteçleri CD45, CD34 ve CD14'ü ise ifade etmemektedir. Bununla birlikte, MKH'ler için en yüksek spesifisiteye sahip en karakteristik ve ümit verici belirteçler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1.1: MKH kaynakları ve hücre yüzeyi belirteçlerinin özeti (Ullah ve ark., 2015)

Kaynak	Pozitif hücre yüzeyi belirteçleri	Negatif hücre yüzeyi belirteçleri
Kemik iliği	CD73, CD90, CD105, STRO-1	CD14, CD34, CD45, HLA-DR
Adipoz doku	CD73, CD090, CD29, CD44, CD71, CD105, CD13, CD166, STRO-1	CD14, CD31, CD34, CD45
Amniyotik sıvı ve membran	CD29, CD44, CD90, CD105, CD, SH2, SH3, HLA-DR	CD10, CD14,CD34, HLA-DR
Diş dokuları	CD29, CD44, CD90, CD105	CD14, CD34, CD45
Endometrium	CD73, CD90, CD105, CD146	CD34, CD45
Ekstremite tomurcuğu	CD13, CD29,CD90,	CD3, CD4, CD14, CD15,

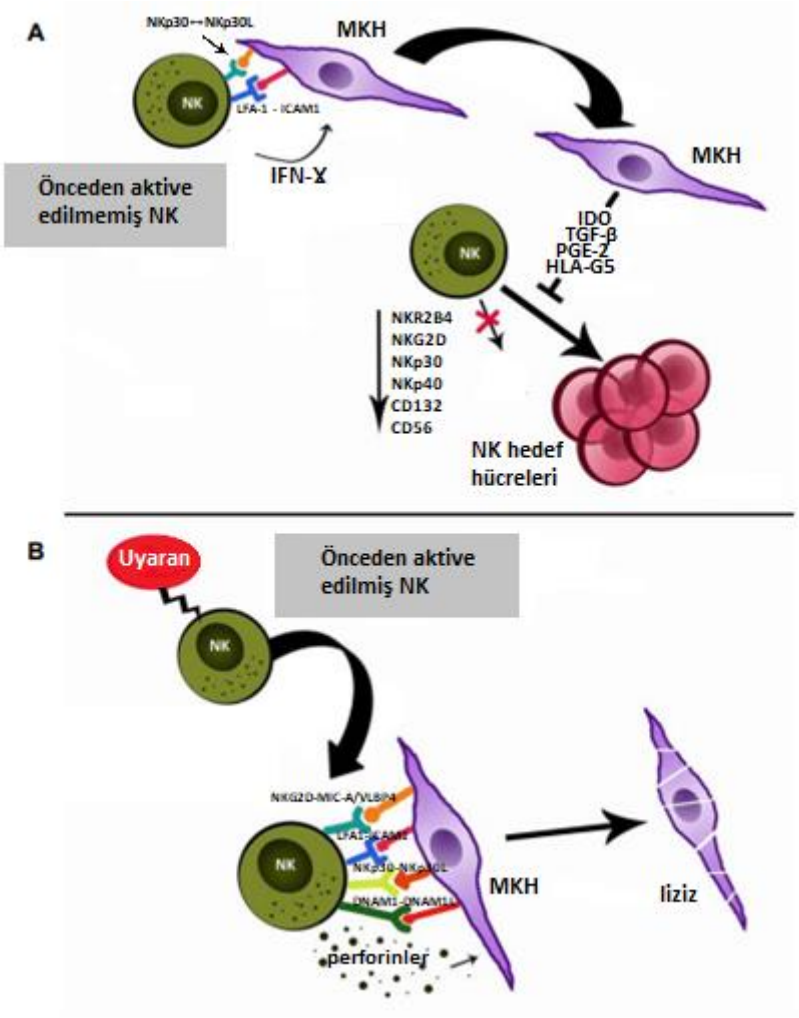
	CD105, CD106	CD34, CD45, HLA-DR
Periferik kan	CD44, CD90, CD105, HLA-ABC	CD45, CD133
Plasenta ve fetal membran	CD29, CD73, CD90, CD105	CD34, CD45
Tükürük bezi	CD13, CD29, CD44, CD90, STRO-1	CD34, CD45
Deri ve sünnet derisi	CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, SSEA-4, Vimentin	CD34, CD45, HLA-DR
Sub amniyotik göbek kordonu membranı	CD29, CD44, CD73, CD90, CD105	CD34, CD45
Sinovyal sıvı	CD44, CD90, CD105, CD147, STRO-1	CD31, CD34, CD45, CD106
Wharton's jelly	CD73, CD90, CD105	CD14, CD34, CD45, CD79, HLA-DR

1.6. MKH'lerin İmmün Baskılama Kapasiteleri

Hücresel terapiler ile ilgili klinik araştırmalar için, MKH'lerin immün düzenleyici yeteneklerini bilmek çok önemlidir. MKH'lerin immün düzenleyici etkisi, MKH'lerin T-hücresi proliferasyonunu baskıladığının tespit edilmesiyle tanımlanmıştır. MKH aracılı immün düzenleyici sistemde, çözünebilir immünsüpresif faktörler yer almaktadır. MKH'ler farklılaşma kapasiteleri ile immün düzenleyici ve anti-enflamatuar özellikleri sayesinde, hasarlı dokuların rejenerasyonu bakımından çok önemli bir klinik potansiyel taşımaktadırlar. Bu hasarlı dokuların rejenerasyonu çözünebilir immünsüpresif faktörler

aracılığı ile sağlanmaktadır (Murphy ve ark., 2013). Bu faktörler MKH'ler tarafından üretilebilirler veya hedef hücrelerle çapraz konuşmadan sonra salınabilirler (Uccelli ve ark., 2008).

İnterlökin-1 (IL-1), IL-2, IL-12, tümör nekroz faktörü-a (TNF-a) ve interferon-gama (INF g) gibi enflamatuar moleküllere yanıt olarak, MKH'ler, birçok bağışıklık hücresi türü arasında karmaşık geri besleme mekanizmaları ile bir dizi büyüme faktörü ve anti-enflamatuar protein salgılar. Anahtar immün düzenleyici sitokinler arasında prostaglandin 2, TGF-b1, HGF, SDF-1, azot oksit, indoleamin 2,3-dioksijenaz, IL-4, IL-6, IL-10, IL-1 reseptör antagonisti ve çözünür tümör nekroz faktörü-a reseptörü bulunmaktadır (Uccelli ve ark., 2008; Liu ve ark., 2009; Kilian ve ark., 2010; Murphy ve ark., 2013). MKH'ler, T hücreleri, doğal öldürücü hücreler, B hücreleri, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler dahil olmak üzere birçok enflamatuar bağışıklık hücresinin çoğalmasını ve işlevini önlerler (Corcione ve ark., 2006; Burr ve ark., 2013). MKH'ler ile NK hücreleri arasındaki etkileşim Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2: MKH-NK etkileşimi (De ve ark., 2012). (A) Daha önce aktive edilmemiş NK'ler: NK'ler, MKH'lerde immünosupresif özellikleri aktive eden IFN-y'nin erken salınımına yol açan NKp30 ve LFA1 reseptörleri vasıtasıyla MKH'lerle etkileşime girmektedir. Bu MKH'ler NK reseptörlerinin ekspresyonunu düşürmekte ve böylece NK'lerin hedef hücrelerine karşı sitokin üretimini ve sitotoksisitesini inhibe etmektedir. Bu immünosupresyon, TGF-P, PGE-2 ve HLA-G5'in MKH üretimine aracılık etmektedir. (B) Önceden aktive edilmiş NK'lar: Daha önce IL-2 veya IL-15 tarafından aktive edilen NK'lar, perforin salınımıyla allojenik ve otojenik MKH'leri öldürebilirler. Bu etkileşime NK'lerde NKG2D, LFA-1, NKP30 ve DNAM-1 ve bunların MKH'lerdeki benzerleri aracılık etmektedir.

Otolog ve allojenik MKH'lerin, mitojenlere (fitohemaglutinin (PHA), IL-2), antikorlara (anti CD3 ve CD28) ve allojenik hücrelere (PBMC'ler, Lenfosit veya DH'ler) T hücresi tepkisini etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (De ve ark., 2012).

Kronik iltihaplı ortamların bir özelliği, yardımcı T hücreleri ve makrofaj türlerinde kalıcı bir dengesizliktir. MKH'ler, INF-gamma'yı azaltarak ve IL-4 ve IL-10'u artırarak TH1'in TH2 hücrelerine geçişini dolaylı olarak teşvik etmektedir (Tollervey ve Lunyak 2011). Geri yüklenen TH1/TH2 dengesinin kıkırdak, kas ve diğer yumuşak doku yaralanmalarında doku yenilenmesini iyileştirdiği, otoimmün hastalıkların semptomlarını hafiflettiği ve anti-diyabetik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Kong ve ark., 2009; Ezquer ve ark., 2012).

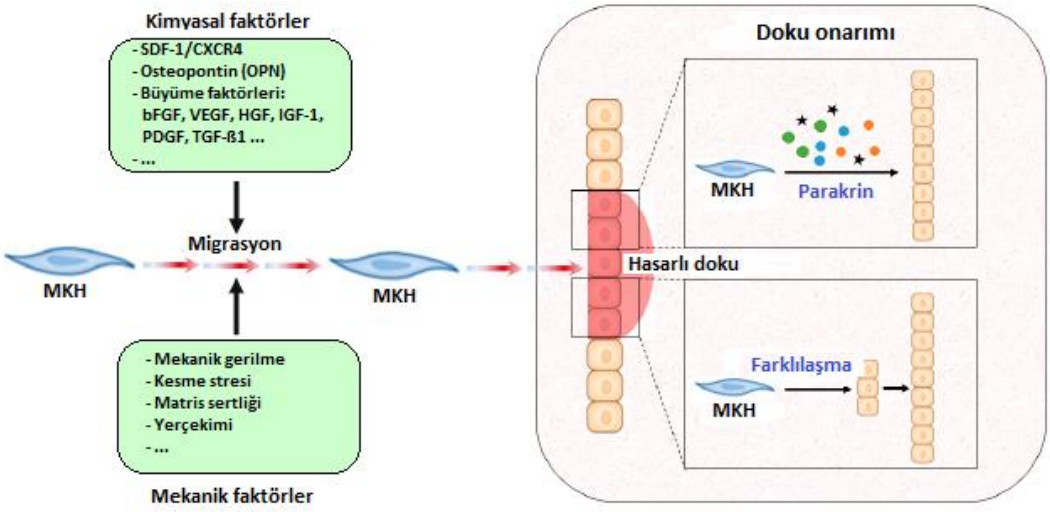
MKH'ler ayrıca, immün sistem tarafından tanınmasının önlenmesi için düşük seviyelerde insan lökosit antijeni (HLA) Sınıf I ve HLA Sınıf II eksprese etmektedir. Bu özellik verici MKH'lere, allojenik terapilerde "gizli" olarak adlandırılan ve ev sahibi bir bağışıklık sistemi tarafından algılanamayan bir yetenek vermektedir. (Siegel ve ark., 2009) Diğer özelliklerle birlikte, bu immün düzenleyici özellikler MKH'leri hücre nakli deneyleri yapmak için uygulanabilir kök hücre kaynaklarından biri yapmaktadır. MKH'ler klinikte günümüzde en çok immün düzenleyici özelliklerinden dolayı sonrasında ise rejeneratif tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

1.7. MKH'lerin Klinik Kullanımları

Son yıllarda hayatımıza girmeye başlayan 'hücresel tedavi' kavramı, günümüzde bilinen tıbbi tedavi yöntemleriyle sağaltımı sağlanamayan çeşitli hastalıkların tedavisinde rejenerasyon potansiyeli bulunan hücreleri kullanmayı kapsamaktadır. Hücresel tedavide kullanılan hücreler çeşitli insan dokularından türetilmektedir ve hasar görmüş dokuların onarılmasını ve yenilenmesini kapsayarak böylece insan vücudundaki fonksiyonların iyileştirilmesini sağlamaktadır. Bu hücrelerin klinik araştırma süreçleri çeşitli hastalıklarda devam etmektedir. Çeşitli hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahip olan kök hücreler bu tedaviler için başlıca adaydır. Kök hücrelerin kaderi hücresel sinyallerle belirlenir, ancak alttaki mekanizma hala tam olarak bilinmemektedir (Tanabe ve ark., 2008).

MKH'lerin klinikte kullanımlarının yolunu açan, çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneklerinin dışında da birçok avantajları bulunmaktadır. Bağ doku kökenli oldukları için stromal destek sağlayarak ilgili hücrelerin gelişimine ve fonksiyonuna katkı sağlamaktadırlar (Crippa ve Bernardo, 2018). Hasarlı hücreler ile füzyon yetenekleri bulunmaktadır (Freeman ve ark., 2015) ve büyüme faktörü, kemokin, sitokin gibi çeşitli

çözünebilen faktörler salgılayarak hasarlı hücre ve dokuların onarımında rol almaktadırlar (Kyurkchiev ve ark., 2014; Fu ve ark., 2019). Ayrıca, mekanik ve kimyasal faktörler tarafından düzenlenmekte olan migrasyon yetenekleri bulunann MKH'ler hasarlı hücre veya dokuya bu sayede ulaşıp yine bu hücrelerin veya dokuların onarımında rol alabilmektedirler (Şekil 1.3). Doku onarımında MKH'lerin parakrin mekanizma ve yönlendirilmiş farklılaşma olmak üzere iki kritik rolü gösterilmiştir. Yapılan bir dizi çalışmaya göre, MKH'lerin *in vivo* nakledilmesinin, hasarlı dokunun iyileşmesine faydalı olan parakrin faktörlerini salgılayarak hasarlı dokuların iyileşmesini artırabildiğini göstermiştir. Parakrin mekanizmasının yanı sıra, doku onarımında MKH'lerin bir başka anahtar mekanizması hasarlı dokuya yönlendirilmiş farklılaşmadır. Yine çok sayıda çalışma, MKH'lerin hasarlı doku bileşenlerine yönlendirilmesinin yara iyileşmesi için gerekli olduğunu doğrulamıştır (Fu ve ark., 2019). Bu migrasyon yetenekleri ile çözünebilen faktörler salgılayarak doku onarımında rol almaları klinik uygulamalar için çok kritiktir ve rejeneratif tıpta hücre tedavisi için MKH'leri çok önemli bir noktaya taşımaktadır. MKH migrasyonunu *in vitro* incelemek için yaygın olarak kullanılan yöntem yara iyileşmesi deneyidir. Biz de bu çalışmada farklı izolasyon metotlarıyla elde edilen erken ve geç pasaj MKH'lerin migrasyon yeteneklerini karşılaştırmak amacıyla yara iyileşmesi deneyi gerçekleştirdik.



Şekil 1.3: MKH migrasyonu ve doku onarımı arasındaki ilişkinin şematik diyagramı. MKH'ler hasarlı dokudan salınan yaralanma sinyalini algıladığında, yaralanan dokuya çoklu mekanik ve kimyasal faktörler tarafından düzenlenen çevresel dolaşım yoluyla göç etmektedir. Hasarlı doku bölgesine ulaştıktan sonra, MKH'ler hasarlı dokuların yara iyileşmesini iki anahtar rolle gerçekleştirebilmektedir; parakrin mekanizma veya yönlendirilmiş farklılaşma (Fu ve ark., 2019).

MKH'lerin immün düzenleyici özellikte olmaları sayesinde, klinikte özellikle graft versus host hastalığında (GVHH) hastalığının tedavisinde kullanılmakta (Batsali ve ark., 2013) ve SLE, romatoid artrit, Tip 1 diyabet ve Crohn gibi hastalıklar için klinik deneyleri gerçekleştirilmektedir (Li ve Hua, 2017). MKH'ler, *in vitro* immün sistemi uyarıcı değildir. Allojenik lenfositlerle birlikte kültüre edildiğinde lenfosit çoğalmasını uyarmazlar ve sitotoksik lenfositler veya NK hücreleri için hedef değildirler. MKH'lerin bağışıklık baskılayıcı olduğu gösterilmiştir, ayrıca sitotoksik T hücrelerinin ve NK hücrelerinin oluşumunu baskılamaktadır. Bu sonuçlara dayanarak yapılan çalışmalarla; 4. evre - tedaviye dayanıklı olan ve MKH infüzyonundan sonra hızlı iyileşme gösteren akut GVHH olguları gösterilmiştir (Ringden ve ark., 2006). Yapılan bir başka çalışmada, GVHH tanısı konulmuş iki bireye intravenöz olarak göbek kordonu kaynaklı MKH verilmiştir. 4 dozdan sonra her hastada da belirgin iyileşme görülmüş ve herhangi bir yan etki kaydedilmemiştir ve bu çalışmaya göre yine göbek kordonundan elde edilen MKH'lerin GVHH tedavisinde hem uygulanabilir hem de güvenli olduğu gösterilmiştir (Wu ve ark., 2011).

MKH'ler, gen transferi aracılığı ile, dayanıklı olmaları ve farklılaşma potansiyelleri sayesinde çeşitli hastalıklar için hücre tedavisinin yanında gen terapisi için de umut vermektedir (Caplan, 2000; Hamada ve ark., 2005; Ozawa ve ark., 2008). MKH'lerin bu mekanizmalarının tam olarak açıklanması, protein destekli gen terapilerini geliştirmek için optimal in vitro kültür koşullarının tasarımını kolaylaştırabilecektir. Ayrıca, ne otolog ne de allojenik MKH'lerin, transplantasyondan sonra konakçıda herhangi bir immünreaktivite indüklememesi dikkat çekicidir (Dai ve ark., 2005; Schu ve ark., 2012). Bu durum MKH'leri, gen terapisi uygulamalarında dokulara genleri iletmek için ideal bir taşıyıcı haline getirmektedir. Eksternal DNA'yı MKH'lere doku rejenerasyon terapilerinde faydalı kılmak ve tanıtmak için çeşitli yaklaşımlar incelenmiş ve kullanılmıştır. Viral transdüksiyon, özellikle adenovirüs aracılı gen transferi kullanılarak, yüksek verimlilik ve düşük hücre mortalitesi ile stabil hücre klonları üretebilirmekte, böylece gen terapisinde popüler bir seçenek haline gelmektedir. Örneğin, baskın-negatif mutant kollajen tip I geni içeren bir adenovirüs vektörü ile enfekte olan MKH'ler, kemik bozukluklarında, cam kemik hastalığı olan kişilerde kemiği onarmak için başarıyla kullanılmıştır. Bununla birlikte, viral transdüksiyon ile ilişkili güvenlik kaygıları, alternatif viral olmayan gen verme

yaklaşımlarını aranmasına neden olmuştur. Elektroporasyon gibi geleneksel transfeksiyon yöntemleri, plazmid DNA'nın primer MKH'lere verilmesinde çok az başarı göstermiştir, bu da genellikle %1'den daha az transfeksiyon verimliliği ve yüksek hücre mortalitesi ile sonuçlanmaktadır; bu nedenle, bu yöntemler gen dağıtımı ve transplantasyonu için yeterli miktarda transfekte edilmiş hücre üretmek için uygun değildir. Son zamanlarda, birincil MKH'leri, NucleofectionTM ve titreşim tabanlı transfeksiyon olan SymphonizerTM kullanarak transfekte etmek için iki yeni yöntem geliştirilmiştir. Elektroporasyon ve özel bir transfeksiyon çözeltisini birleştiren NucleofectionTM (Amaxa Biosystems) 'nin, bir GFP haberci plazmidini %80'e varan transfeksiyon verimi ve %50 hücre yaşayabilirliği ile primer MKH'lere başarılı bir şekilde soktuğu gösterilmiştir. Transfekte edilen hücrelerin yaklaşık %10'u 3 hafta sonra GFP ekspresyonunu korumakta, bu da plazmidin geçici olarak hücre çekirdeğine dahil edildiğini göstermektedir. Ayrıca, transfekte edilmiş hücreler, transfekte edilmemiş hücrelerle aynı verimlilikte kondrositlere farklılaşabildiklerinden normal hücresel fonksiyon üzerinde belirgin bir olumsuz etki görülmemiştir. Tüm sonuçlar birlikte ele alındığında bu yöntemin, hastalıklı veya hasarlı dokunun onarımını ve rejenerasyonunu teşvik etmek veya kusurlu genleri kurtarmak amacıyla, transplantasyon için kullanılan MKH'lere fonksiyonel genlerin verilmesinde kullanılması önerilmektedir (Baksh ve ark., 2004). Tüm bu çalışmaları sürdürebilmek, klinik uygulamalar için yeterli sayıda hücreye ulaşabilmek için verimli bir sayıda ve yaşlandırmadan, hala tüm özelliklerini koruyan MKH'leri elde etmek önemlidir. Bu anlamda *in vitro* teknikler için yeni stratejiler geliştirmek gereklidir.

Tüm sahip oldukları özellikleriyle birlikte MKH'ler, hem hayvan modellerinde hem de insan klinik çalışmalarında çeşitli dejeneratif hastalıklarda hasarlı dokuları onarmak için umut verici sonuçlar göstermiştir (Fu ve ark., 2019). Preklinik çalışmalar tarafından desteklenen; omurilik yaralanması, Parkinson, inme gibi merkezi sinir sistemi hastalıkları, kalp hastalığı, tip I diyabet, akut graft versus host hastalığı ve bazı otoimmün hastalıklar gibi endikasyonlar için allojenik MKH'lerin kullanıldığı birçok klinik çalışma bulunmaktadır (clinicaltrials.gov).

MKH'lerin genel olarak hastalık tedavisi için kullanımı: çok sayıda klinik çalışma ve yayınlanmış literatürün bolluğu, MKH tedavisinin mümkün olduğunu göstermektedir. Şimdiye kadar yapılan tüm yayınların ve klinik çalışmaların yanısıra,

devam eden araştırmalar ile, birçok otoimmün, enflamatuar ve dejeneratif hastalığın hastalarına iyileşme veya iyileşmeye yol açabilecek yeni umutlar getirilecektir (Wong, 2011).

1.7.1. Nörodejeneratif hastalıklar

MKH'lerin nöronlara dönüşme yeteneğine sahip oldukları tartışılmaktadır. Nörodejeneratif bozukluk için ilk MKH transplantasyonu fare modellerinde yapılmış ve MKH'lerin enjeksiyonundan sonra, hastalık anormalliklerinde bir azalma ve farenin genel hayatta kalma süresinde iyileşme görülmüştür (Mazzini ve ark., 2003). Bu deneye dayanarak, MKH transplantasyonunun, özellikle motor nöronları dejenere eden ve kas işlevselliğini bozan nörodejeneratif bir hastalık olan Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) için potansiyelini belirlemek amacıyla yeni bir çalışma tasarlanmıştır. MKH'ler hastaların kemik iliğinden izole edilmiş ve daha sonra aynı hastaların omuriliğine enjekte edilmiş, ardından MKH'ler MRI kullanılarak 3 ve 6 ayda izlenmiştir. Sonuç olarak ne omurilikte yapısal değişiklikler ne de anormal hücre proliferasyonu gözlenmemiştir. Bununla birlikte, hastalarda bulunan bacak disestezisi, interkostal ağrı gibi hafif yan etkiler, birkaç hafta içinde giderilmiştir (Ullah ve ark., 2015).

Önemli bir nörodejeneratif hastalık olan Parkinson hastalığı (PD), önemli dopaminerjik nöron kaybı ile karakterizedir. PD fareleri modelinde MKH transplantasyondan sonra tirozin hidroksilaz seviyesinin arttığı görülmüştür ve MKH'lerin PD tedavisinde kullanılabilirliğine dair araştırmalar hız kazanmıştır (Park ve ark., 2008; Ullah ve ark., 2015).

Alzheimer hastalığı (AH) en yaygın nörodejeneratif hastalıklardan biridir ve belirtileri demans, hafıza kaybı ve zihinsel güçsüzlüklerdir. Şimdiye kadar AH'nin ilerlemesini durdurmak veya yavaşlatmak için herhangi bir tedavi tam olarak oluşturulamamıştır. Son zamanlarda, araştırmacılar AH hayvan modelinde kök hücre terapisini kullanarak nöropatolojik eksiklikleri azaltmak için araştırma yapmaktadır (Ullah ve ark., 2015). Ayrıca, MKH'lerin AH'nin enflamatuar ortamını ve düzenleyici T hücrelerinin yetersizliğini ile daha sonra mikroglia aktivasyonunu modüle edebildikleri bildirilmiştir (Lee e ark., 2010).

1.7.2. Otoimmün hastalıklar

MKH'ler immün yanıtları düzenleme kapasitesine sahip oldukları için, otoimmün hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Romatoid artrit (RA), immünolojik tolerans kaybından kaynaklanan bir inflamatuar hastalıktır. Hayvan modelleri üzerine yapılan klinik öncesi çalışmalarda, MKH'lerin hastalık iyileşmesinde ve hastalık ilerlemesinin azaltılmasında yardımcı olduğu bulunmuştur (Ullah ve ark., 2015). Ek olarak, çeşitli çözünür faktörlerin salgılanması yoluyla, MKH'ler lokal doku ortamını etkileyebilir ve rejenerasyonu etkin bir şekilde uyarabilir. MKH'lerin bu fonksiyonu, RA gibi dejeneratif eklem hastalıklarında terapötik uygulamaları için kullanılabilir (Chen ve Tuan, 2008).

Tip 1 diyabet, pankreasta bulunan ve insülin üreten beta hücrelerinin otoimmün bir süreç sonunda zedelenmesi ile meydana gelmektedir. MKH'lerin insülin üreten hücrelere farklılaşabildikleri ve immün düzenleyici etkileri düzenleme kapasitesine sahip oldukları gösterilmiştir (Ullah ve ark., 2015). Bu bağlamda, MKH immün düzenleyici etkilerinin karakterizasyonunu yapılarak, diyabette MKH transplantasyonunun etkinliğinin gösterilmiş olduğu çalışmalar ile birlikte MKH uygulamaları tip 1 diyabet için umut vericidir (Abdi ve ark., 2008; Vija ve ark., 2009).

1.7.3. Kardiyovasküler hastalıklar

Miyokard onarımı için kalp hücrelerinin nakli hayvan modellerinde denenen yeni bir stratejidir. MKH'ler kardiyomiyosit farklılaşması için iyi bir kaynak olarak kabul edilir. Bununla birlikte, kardiyomiyosit farklılaşmasının in vivo oluşumu çok nadirdir ve in vitro farklılaşmanın büyüme faktörleri takviyesiyle sadece erken pasaj MKH'ler ile gerçeşebileceği bulunmuştur. Bu farklılaşan hücreler, kemirgen modellerinde, sol ventrikül hasarına bağlı miyokard enfarktüsü ve kalp yetmezliğinin tedavisinde kullanılmıştır ve kısmen tedavi ettiği görülmüştür (Hare, 2009; Gnecchi ve ark., 2012; Ullah ve ark., 2015). Son zamanlarda yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, WJ-MKH'lerin miyokard enfarktüsü hayvan modeline transplantasyonu etkili bulunmuştur. Tüm bu çalışmalar toplu olarak kalp enfarktüsünün hücresel tedavisinde MKH'lerin rolünü göstermekte ve şu anda MKH'lerin kalp hastalıkları için etkisini araştıran 70'ten fazla kayıtlı çalışma bulunmaktadır (clinicaltrials.gov) (Ko ve Kim, 2008; Ullah ve ark., 2015).

Başarılı hücre temelli tedavilerin geliştirilmesi için farklı soyları farklılaştırma eğilimlerini anlamak esastır (Nekanti ve ark., 2010). Klinik bir doza ulaşmak için yüksek mutlak sayıda kök hücre gerektiğinden, MKH'lerin kültür şartlarında çoğaltılması bir ön koşuldur. Biz bu çalışmada, göbek kordonunun Wharton'un jölesinden izole edilmiş insan MKH'lerinin kültür koşullarında uzun süreli ve kısa süreli çoğaltılması ile kök hücre özelliklerini taşıyıp taşımadığı kontrol etmekle birlikte farklı kültür koşullarını ve izolasyon metotlarını karşılaştırdık.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Göbek Kordonunun Seçilmesi ve Alınması

Bu çalışma için 35 yaşını geçmemiş sağlıklı ve sezaryen ile doğum yapan kadınlardan doğum sırasında göbek kordonunun alınması uygun görülmüştür. Doğum öncesinde seçilen bağışçıya çalışma hakkında ayrıntılı bilgi verilmiş ve gönüllü onam formu imzalatılmıştır. Göbek kordonu steril şartlarda GMP laboratuvarında hazırlanan doku nakil solüsyonu (%10 penisilin/streptomisin içeren DPBS çözeltisi) içerisine alınarak $+4^0$C'ye konulmuştur. Kordonun GMP laboratuvarına alınmasından önce bağışçıdan alınan kandan seroloji testleri (HIV, Hepatit B, HCV, VDRL) çalışılmış ve sonuçlarının uygun çıkmasının ardından doku laboratuvara kabul edilmiştir.

2.2. Göbek Kordonundan MKH İzolasyonu

Göbek kordonu doku nakil solüsyonu içerisinde, uygun koşullarda aynı gün içinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Laminar akışlı steril kabin altında aseptik koşullarda göbek kordonu steril bir tüp içerisine alınmış ve vericinin bilgileri not edilmiştir.

Göbek kordonu PBS içeren 3 steril tüpte sırayla yıkanarak kandan uzaklaştırılmıştır ve cam petriye alınmıştır. Pens ve bisturi kullanılarak damarları çıkartılmıştır ve doku yaklaşık olarak 1 cm boyutlarında olacak şekilde parçalanmıştır. Elde edilen doku parçaları ikiye ayrılarak yarısı eksplant diğer yarısı ise enzimatik izolasyon işlemleri için izole edilmiştir (Şekil 2.1).

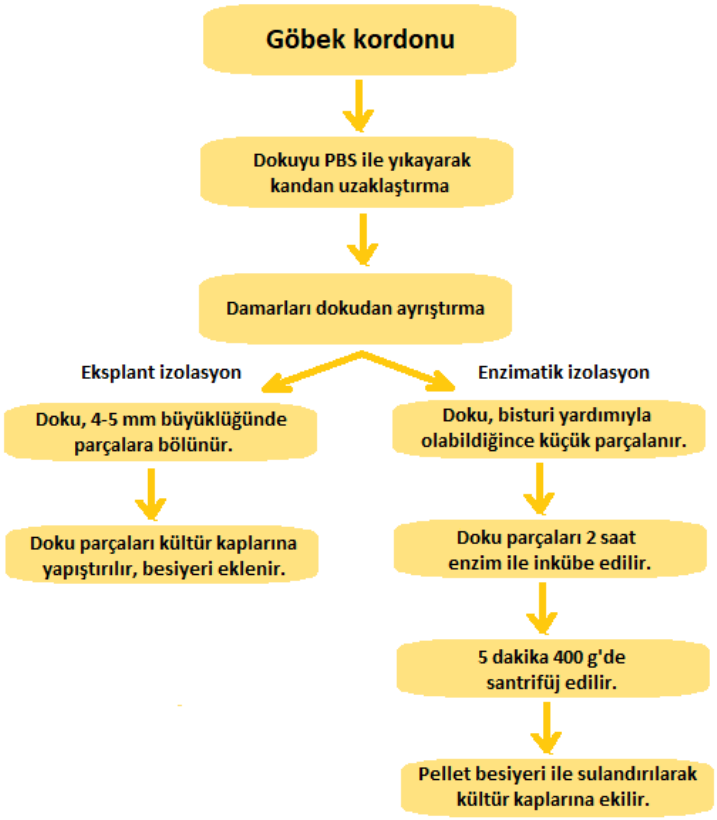
2.2.1. Eksplant İzolasyon

Küçük parçalara (4-5 mm) ayrılan doku parçalarından her plastik 100 mm hücre kültürü kabına 4-5 parça gelecek şekilde ve dokunun Wharton's Jelly ismi verilen jel kıvamındaki yüzleri petriye değecek, dokunun dış kısmı ise yukarıda kalacak şekilde pens yardımı ile petrilere yapıştırılmıştır. Kurumaları ve petriye tam olarak yapışmaları için inkübatöre kaldırılarak yaklaşık 10 dakika bekletilmiştir. Ardından petrilere yapışan doku parçalarının üzerlerine 7-12 ml aralığında dokuları ıslatacak kadar besiyeri eklenmiştir ve petriler inkübatöre kaldırılmıştır. 24 saat sonunda petrilerde 25 ml besiyeri olacak şekilde tekrar ekleme yapılmıştır.

2.2.2. Enzimatik İzolasyon

Küçük parçalara ayrılan doku parçaları enzimatik izolasyon amacıyla bisturi yardımıyla iyice parçalanmıştır. Olabildiğince küçük parçalara ayrılarak yüzey alanı genişletilen doku, 0,45 U/ml kollajenaz NB6 solüsyonu içeren steril tüpe alınmıştır ve 37^0C'deki çalkalamalı inkübatöre konularak çalkalanarak 2 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda çalkalamalı inkübatörden alınan streil tüp 400 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet besi yeri ile sulandırılmıştır ve T175 kültür kaplarına ekilmiştir.

İzolasyon işlemlerini takip eden her 4 günde bir besi yerleri değiştirilmiştir ve her gün mikroskobik gözlem yapılarak hücrelerin kültür kabı yüzeyine tutunmaları ile koloni oluşturmaları gözlenmiştir.



Şekil 2.1: Eksplant ve enzimatik izolasyon metotlarının şematik gösterimi.

2.3. Alt Kültür İşlemleri

Hücreler P0'da koloni oluşumlarını ve kolonilerin büyümelerini takiben 10-12 gün arasında pasajlanarak P1'e geçirilmiştir ve sonraki pasajlarda kültür kabının yaklaşık %70-80'ini kaplayan hücreler tekrar pasajlanarak P6'ya kadar getirilmiştir. Erken ve geç pasaj için bundan sonra yapılan tüm karakterizasyon ve immun baskılayıcı deneyler için P2 ve P6'daki kültür kaplarından kaldırılan hücreler kullanılmıştır.

Terapötik uygulamalar için, hücre proliferasyonunu destekleyen, MKH özelliklerini koruyan ve insan uygulamalarında güvenli olduğunu kanıtlayan bir besi yeri kullanılmalıdır. Bu çalışmada bu amaca hizmet eden, insan MKH'lerinin optimum büyümesi ve genişlemesi için tasarlanmış olan MSC NutriStem XF besi yeri (BI, Israel) (%2 insan serumu (human AB serum, SeraCare), %0,5 100 U/mL penisilin, 0,1 mg/mL streptomisin (Gibco, USA), %0,6 MSC NutriStem XF Supplement Mix içeren) izolasyondan itibaren tüm hücre üretim basamaklarında kullanılmıştır.

2.4. Hücre Dondurma ve Çözme İşlemleri

Her pasaj sonrası tripsin ile muamele edilerek kültür kaplarından kaldırılan hücrelerin bir kısmı -152^{0}C'de dondurularak saklanmış ve bir kısmı ise P6'ya kadar kültürde ilerletilmiştir. Dondurma işlemi için enzimle muamele edilip santrifüj edilen hücrelerin pelleti, mililitrede 3 milyon hücre olacak şekilde dimetilsülfoksit (DMSO) içeren dondurma solüsyonu (NutriFreez, BI) damlalar halinde yavaşça eklenerek homojenize edilmiş ve kriyotüplere paylaştırılarak dondurulmuştur.

Çözme işlemi için -152^{0}C'deki hücreler alınarak 37^{o}C'deki su banyosunda çözdürülmüş ve %10 oranında insan serumu (human AB serum, SeraCare) içeren steril tüplere alınarak 400 g'de 5 dk santrifüj edilerek dondurma solüsyonundan uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti besiyeri ile seyreltilerek sayım sonrasında kültür kaplarına uygun miktarlarda ekilmiştir.

Tüm bu GMP'de hücre çoğaltma ve depolama süreçleri sonunda diğer çalışmalara (karakterizasyon, farklılaştırma, immunsüpresif özelliklerin belirlenmesi ve gen ekspresyonu analizi) Ar-Ge laboratuvarlarında devam edilmiştir.

2.5. MKH'lerin Karakterizasyon Çalışmaları

Göbek kordonundan izole edilen Wharton's Jelly MKH'leri izole edildikten sonra P6'ya gelene kadar tüm aşamalarda her gün zıt faz mikroskobu ile incelenmiş ve morfolojik özellikleri gözlenmiştir. Karakterizasyon çalışmaları amacıyla bu hücrelerin akım sitometrik çalışmaları ve farklılaştırma deneyleri gerçekleştirilmiştir.

2.6. Akım Sitometri Çalışmaları

Kültür kaplarından kaldırılan P2 ve P6'daki hücreler akım sitometri analizi için CD90, CD44, CD105, CD73 ve CD34/11B/19/45/HLA-DR negatif kokteyl antikorlarıyla, her antikor için $2x10^5$ hücre olacak şekilde muamele edilmiştir. İnkübasyonun ardından her hücre tipi için kontrol, negatif ve pozitif belirteçlerle hazırlanan tüpler sırasıyla okutularak akım sitometri analizleri FACS-Canto (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, ABD) kullanılarak yapılmış ve sonuçlar BD FACSDiva yazılım programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

2.7. Yara İyileşmesi Deneyi

MKH'ler migrasyon yetenekleri sayesinde hasarlı bölgeye göç ederler. Bu sayede çözünebilen faktörler salgılayarak göç ettikleri bölgedeki doku onarımında rol alırlar. Bu da klinik uygulamalar için çok kritiktir ve rejeneratif tıpta hücre tedavisi için MKH'leri çok önemli bir noktaya taşımaktadır. (Fu ve ark., 2019). MKH migrasyonunu *in vitro* incelemek için yaygın olarak kullanılan yöntem yara iyileşmesi deneyidir. Bu bilgiler ışığında izole ettiğimiz 4 hücrenin migrasyon yeteneklerini karşılaştırmak amacıyla 4 adet 30 mm petriye eş zamanlı olarak $35x10^4$ hücre %10 FBS (fetal bovine serum) (Gibco, USA), 100 U/mL penisilin, 0.1 mg/mL streptomisin (Gibco, USA) içeren DMEM/F-12 besi yeri ile ekilmiştir. 1 gün sonra petrilerdeki hücreler steril pipet ucu ile çizilerek yara oluşturulmuş ve her gün takibi yapılacak bölge işaretlenmiştir. Yaranın oluşturulduğu zaman mikroskop altında işaretlenen bölgenin fotoğrafı çekilmiştir ve kontrol olarak keydedilmiştir. Takip eden 8, 24, 32, 48, 56, 72 ve 96. saatlerde işaretlenen bölgelerin fotoğrafı çekilerek hücrelerin çoğalma ve göç etmeleri izlenerek oluşturulan yaraların kapanması takip edilmiştir. 4 hücrenin yara iyileşme hızlarını ve oranlarını karşılaştırmak için hücrelerin arasındaki piksel her saat ve gün için ölçülerek elde edilen verilerle grafik oluşturulmuştur.

2.8. Farklılaştırma Çalışmaları

Farklılaştırma çalışması için öncelikle hücreler 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına her kuyucukta $3x10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Osteojenik farklılaştırma çalışmalarıyla eş zamanlı kontrol grupları olarak yine eşit sayıda kuyulara konulan kollajen kaplı cam lam üzerine aynı sayıda hücreler ekilerek 3 günde bir %10 FBS (fetal bovine serum) (Gibco, USA), 100 U/mL penisilin, 0.1 mg/mL streptomisin (Gibco, USA) içeren DMEM/F-12 besi yeri değiştirilerek 21 gün boyunca 37^0C'de %5 CO_2 atmosfer basıncı altında inkübe edilmiştir.

2.8.1. Osteojenik Farklılaştırma

Osteojenik farklılaştırma için 6 kuyucuklu plakalara konulan kollajen kaplı steril cam lam üzerine ekilen hücrelerin üzerine %10 FBS (Gibco, USA), 100 U/mL penisilin, 0.1 mg/mL streptomisin (Gibco, USA), 10^{-8}M Deksametazon, 10 mM β-Gliserofosfat ve 50 µg/mL Askorbik Asit içeren LDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose) (Gibco, USA) eklenmiş ve 21 gün boyunca 3 günde bir besi yeri değiştirilmiştir. 7., 14. ve 21. günün sonunda kollajen kaplı cam lamlardaki hem farklılaştırmaya alınan hücreler hem de kontrol grubu hücreleri soğuk PBS ile yıkandıktan sonra soğuk %70'lik etanolde 5 dk oda ısısında inkübe edilerek fikse edilmiştir ve cam lamlar 6 kuyucuklu plakalardan alınarak kurumaya bırakılmıştır. Boyama aşamasına geçilmeden önce Alizarin Red S hazırlamak için 0,4 g boya tartılarak 20 mL distile suda çözülerek pH 4,1-4,3 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Lamlar distile suya daldırılıp çıkarılmış ve ardından 45 saniye boyunca boyaya maruz bırakılmıştır. Ardından sırası ile asetona, %50 aseton %50 ksilen içeren çözeltiye ve en son ksilene batırılıp çıkarılmıştır. Lamlar kurutularak mounting media ile lama yapıştırıldıktan sonra zıt faz mikroskobu altında gözlenmiştir.

2.8.2. Alkalin Fosfataz Deneyi

MKH'ler Alirazin Red S boyama için yapılan osteojenik farklılaşmaya eş zamanlı olarak ayrıca Alkalin Fosfataz (ALP) tayini için yine 6 kuyucuklu plakalara her kuyuda $3x10^5$ olacak şekilde ekilmiş ve 21 gün boyunca %10 FBS (Gibco, USA), 100 U/mL penisilin, 0.1 mg/mL streptomisin (Gibco, USA), 10^{-8}M Deksametazon, 10 mM β-Gliserofosfat ve 50 µg/mL Askorbik Asit içeren LDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose) (Gibco, USA) ile inkübe edilerek 3 günde bir besi yeri

değiştirilmiştir. Farklılaşmanın 7., 14., 21. günündeki hücreler ile hiç farklılaştırma yapılmayan kontrol grubu hücreleri kültür kaplarından tripsin ile toplanarak 2300 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar atılarak pelletlere Alkaline Phosphatase Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision, USA) kullanılarak 100'er µl Assay Buffer eklenerek pipetaj yapılmıştır ve sonrasında vortekslenen örnekler 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant alınarak yeni tüplere konulmuş ve proteinler -80^{0}C'de muhafaza edilmiştir. 21. gün farklılaşmanın bitiminde tüm örnek grupları toplandıktan sonra BCA testi (Sigma-Aldrich, USA) yapılmış ve izole edilen tüm proteinlerin ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Protein örnekleri ve standartlar, 96 kuyucuklu plakaya 2 tekrarlı olarak eklenmiştir. QA, QB ve Bakır (II) sülfat ile oluşturulan karışım solüsyonu tüm proteinlere ve standartlara ilave edilmiş ve plaka karanlıkta 60°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra mikroplaka okuyucuda, 562 nm'de absorbans ölçülmüş ve değerler kaydedilmiştir.

ALP testinde standartlar oluşturmak için 0, 4, 8, 12, 16, 20 µl 1 mM pNPP solüsyonu ve arka plan kontrolü oluşturmak için herhangi bir protein örneğinden 20 µl ve her bir örneğimizden yine 20 µl 96 kuyucuklu çift tekrarlı olarak plakaya eklenmiştir. Tüm örneklere Assay Buffer eklenmiş ve arka plan kontrolümüze ALP aktivasyonunu durdurmak için Stop Solüsyonu eklenmiştir. Standartlara ALP enzimi eklenmiş ve örneklerimizle arka plan kontrollerine hızlıca 5 mM pNPP çözeltisi eklenmiştir. Plaka karanlıkta 25°C'de 60 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyondan sonra arka plan kontrolleri hariç diğer tüm kuyucuklara Stop Solüsyonu eklenmiştir. Mikroplaka okuyucusunda 405 nm'de absorbans ölçümü sonrası ALP aktivasyonunu hesaplamak için, tüm örneklerin ALP değerleri protein değerlerine bölünmüş ve ALP aktivasyonları bulunmuştur.

2.9. İmmun Baskılama Özelliklerinin Belirlenmesi

İnsan periferik kan mononükleer hücreleri (ATCC® PCS-800-011™), %10 FBS (Gibco, USA), 100 U/mL penisilin, 0.1 mg/mL streptomisin (Gibco, USA) ve %1 phytohemagglutinin içeren DMEM/F-12 besi yeri (Gibco, USA) ile T25 kültür kabına ekilmiş ve 37^{0}C'de %5 CO_2 atmosferinde inkübe edilerek phytohemagglutinin ile 3 gün boyunca hücrelerin uyarılması sağlanmştır.

Hücrelerinin phytohemagglutinin ile inkübe edilmesini takip eden 2. günde 6 kuyucuklu kültür kaplarına enzimatik P2 MKH, enzimatik P6 MKH, eksplant P2 MKH, eksplant P6 MKH'lerden 3'er kuyucuk 1. gün MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi için, 3'er kuyucuk da 4. gün MTT testi için her kuyucuğa $3x10^5$ hücre olacak şekilde %10 FBS (Gibco, USA), 100 U/mL penisilin, 0.1 mg/mL streptomisin (Gibco, USA) içeren DMEM/F-12 besiyeri (Gibco, USA) ile ekilmiştir.

MKH'lerin ekiminin 24 saat sonrasında 3 gün phytohemagglutinin ile uyarılan mononükleer hücreler T25 flasklardan toplanarak 1 gün önce ekilen kuyucuklara her bir kuyucuğa 6 kuyucuklu kültür kaplarına uyumlu 0,4 µm por büyüklüğüne sahip insert (Thermo Fisher Scientific, USA) konularak üzerlerine $3x10^5$ uyarılmış mononükleer hücre ekilmiştir. Her bir MKH-mononükleer hücresi kombinasyonu için yine 3'er kuyucuğa kontrol amaçlı sadece mononükleer hücre ekilmiştir. Ve hücre kültürü kapları inkübatörlere kaldırılmıştır. 1. gün ve 3. gün sonunda MTT ile mononükleer hücre proliferasyonunu belirlemek için kültür kaplarından mononükleer hücreleri toplanmıştır.

2.9.1. MTT Testi ile Proliferasyon Tespiti

MKH'lerin mononükleer hücreler üzerindeki immün düzenleyici etkilerini değerlendirmek için ko-kültürden sonra toplanan PHA ile uyarılmış periferik kan mononükleer hücreleri her kuyucukta 100 µl fenol red içermeyen besi yeri ile $1x10^4$ hücre olacak şekilde 3'er tekrarlı olarak 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Her kuyucuğa 10 µl MTT solüsyonu (Sigma-Aldrich, USA) ilave edilmiştir ve plakalar 37°C'de 4 saat boyunca %5 $C0_2$ içeren nemli inkübatörlerde inkübe edilmiştir. Süre sonunda her kuyucuğa 100 µl DMSO eklenmiştir ve 5 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. 5 dakika sonunda örneklerin optik yoğunluk (OD) değeri, enzim bağlı immünosorbent tahlili (ELISA) plaka okuyucusu (Versamax, ABD) ile 595 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

2.10. Hücrelerin İki Katına Çıkma Süresinin Belirlenmesi

Hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucukta $3x10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiştir ve takip eden 24. saatte hücreler tripsinizasyon ile kültür kaplarından kaldırılarak sayılmıştır. 3 tekrarlı yapılan çalışma ile 24. saatte her bir hücrenin ulaştığı sayının ortalamaları alınmış ve kaydedilmiştir. Ekildikleri sayı ve 24. saatte ulsştıkları

sayı 24 saatlik artışa göre hesaplanarak her bir hücre için iki katına çıkma süreleri belirlenmiştir.

2.11. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

2.11.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) kullanılmıştır. P2 ve P6 da dondurulan hücrelerimizden 1'er vial çözülerek 1:1 oranında PBS ile sulandırılmış ve 400 g'de 5 dakika santrifüj aşamasından sonra hücre pelletlerine 500 µl lizis solüsyonu olarak Buffer RLT eklenerek 30 saniye vorteksleme ardından 2 ml'lik iç içe geçirilen filtreli toplama tüplerine geçirilmiştir. 10000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra filtre atılmış ve tüpteki örneklere eşit miktarda (500-600 µl) %70'lik etanol eklenmiş ve yavaşça pipetaj yapılmıştır. Yeni 2 ml'lik tüpe yerleştirilmiş filtreden örnek geçirilmiştir ve 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Alttaki tüp atılmış ve filtre yeni 2 ml'lik tüpe alındıktan sonra 500 µl RPE eklenerek 10000 rpm'de 2dk santrifüj edilmiştir, filtre yeni 1,5 ml'lik tüpe yerleştirilmiş 30 µl RNeas-water su eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe dilmiştir. 10000 rpm'de 1 dk santrifüj sonrası filtre atılarak toplama tüpleri cDNA sentezi için buza alınmıştır.

2.11.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için RT^2 First Strand Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) kullanılmıştır. Her bir RNA örneği için; 8 µl RNA ve 2 µl Buffer GE kullanılarak DNA eliminasyon miksi hazırlanmıştır. Hazırlanan DNA eliminasyon miksi 5 dakika boyunca 42^0C'de sonrasında ise 1 dakika buzda inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sürecinde iken bir yandan revers-transkriptaz miksi (her bir örnek için: 4 µl 5x Buffer BC3, 1 µl Control P2, 2 µl RE3 Reverse Transkriptaz Mix, 3 µl RNase free water) hazırlanmıştır. 10 µl genomik DNA eliminasyon miksi içeren tüplere 10 µl revers-transkriptaz miksi eklenerek yavaşça pipetajlanmıştır. 15 dakika 42^0C'de inkübe edilen örnekler son olarak 95^0C'de 5 dakika inkübe edilmiş ve reaksiyon durdurulmuştur. cDNA örneklerimiz PCR protokolüne devam etmek için buzda bekletilmiştir.

2.11.3. Real-Time PCR

Her primer için, 0,5 ml'lik tüp içerisinde 12,5 µl RT^2 SYBR Green MasterMix (DNA Polimeraz, PCR Tamponu, dNTP içeren karışım), 1 µl cDNA, 1 µl Primer, 10,5 µl RNase Free Water hazırlanarak 25 µl'ye tamamlanmıştır.

Hazırlanan tüpler gerçek zamanlı PCR cihazına yerleştirilmiş ve kitin talimatlarına göre PCR döngüsü sıcaklıkları belirlenmiştir. Sabioscience Array veritabanı kullanılarak C_T değerleri hesaplanmıştır. Referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır. C_T değerleri Roche Light Cycler 480 cihazı yazılımıyla hesaplanarak sonuçlar Sabioscience PZR Array Dataanalysis V4 analiz programıyla analiz edilmiştir. Kullanılan genlerin sembolleri, tanımları ve gen isimleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Gerçek zamanlı PCR analizinde kullanılan genlerin sembolleri, gen tanımları ve gen isimleri.

GEN SEMBOLÜ	GEN TANIMI	GEN İSİMLERİ
GAPDH	Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz	G3PD; GAPD; HEL-S-162eP
VIM	Vimentin	-
VCAM1	Vasküler hücre adezyon molekülü 1	CD106; INCAM-100
RUNX2	RUNX ailesi transkripsiyon faktörü 2	CCD; AML3; CCD1; CLCD; OSF2; CBFA1; OSF-2; PEA2aA; PEBP2aA; CBF-alpha-1
THY1	Thy-1 hücre yüzeyi antijeni	CD90; CDw90
ZFP42	ZFP42 çinko parmak proteini	REX1; REX-1; ZNF754; zfp-42

CD44	CD44 molekülü (Hint kan grubu)	IN; LHR; MC56; MDU2; MDU3; MIC4; Pgp1; CDW44; CSPG8; HCELL; HUTCH-I; ECMR-III
TERT	Telomeraz ters transkriptaz	TP2; TRT; CMM9; EST2; TCS1; hTRT; DKCA2; DKCB4; hEST2; PFBMFT1
BMP2	Kemik morfogenetik protein 2	BDA2; BMP2A; SSFSC
ICAM1	Hücreler arası yapışma molekülü 1	BB2; CD54; P3.58
NES	Nestin	Nbla00170
POU5F1	POU sınıf 5 homeobox 1	OCT3; OCT4; OTF3; OTF4; OTF-3; Oct-3; Oct-4
LDHA	Laktat dehidrojenaz A	LDHM; GSD11; PIG19; HEL-S-133P
SOX2	SRY-box transkripsiyon faktörü 2	ANOP3; MCOPS3

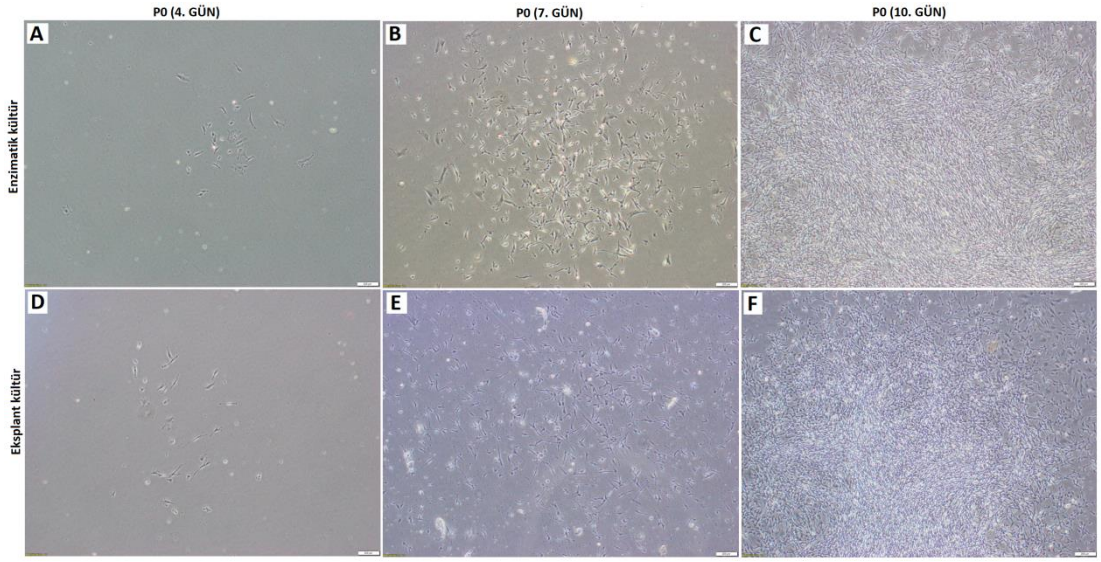
2.12. İstatiksel Analiz

Her deney 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Çalışmaların verileri, standart sapma (± SD) gözönünde bulundurularak rapor edilmiştir. Veriler, eşli *t-test* kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma ve kontrol grupları arasındaki farklar için, $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı, $p \leq 0.01$ istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olarak kabul edilmektedir.

3. BULGULAR

3.1. Morfolojik Bulgular

Gönüllü vericiden alınan göbek kordonu Wharton's Jelly'den eksplant ve enzimatik yöntem ile MKH izolasyonu gerçekleştirilmesinin ardından hücreler her gün zıt faz mikroskobu ile gözlemlenmiştir. Her iki grupta da 4. günden itibaren hücre yapışmaları ve koloniler şeklinde büyümeleri görülmeye başlanmıştır, bu hücreler fibroblast benzeri morfolojiye sahiptir (Şekil 3.1). 10. günde koloniler daha çok genişlemiştir, farklı koloniler birbirine yaklaşmıştır ve kültür kabının büyük yüzeyini kaplamışlardır.



Şekil 3.1: Enzimatik kültür MKH (A, B, C) ve eksplant kültür MKH'lerinin (D, E, F) izolasyondan sonra P0'daki 4., 7. Ve 10. günlerine ait zıt faz mikroskobisindeki morfolojik görünümleri. (Orijinal Büyütme: A, B, C, D, E, F: 4X)

Tablo 3.1: Alt kültür işlemlerinde hücrelerin pasajının geldiği gün sayısı ve pasaj atlatma sonrası elde edilen hücre sayısı / canlılıklar (Tüm hücreler pasaj 1'den itibaren T225 flasklara $1x10^6$ hücre ekilmiştir. Yalnızca izolasyon sonrası pasaj 0'da enzimatik hücreler 4 adet T175 flaska, eksplant hücreler 4 adet 100 mm petriye ekilmiştir.)

	Kaldırıldığı flask ve sayısı	Kaçıncı gün pasajı geldi	Hücre sayısı	Canlılık
Eksplant P0 MKH	100 mm petri / 4 adet	9	$15x10^6$	%83,5
Enzimatik P0 MKH	T175 flask / 4 adet	13	$29x10^6$	%93,8
Eksplant P1 MKH	T225 flask / 1 adet	6	$24x10^6$	%96,4
Enzimatik P1 MKH	T225 flask / 1 adet	3	$10x10^6$	%94,8
Eksplant P2 MKH	T225 flask / 1 adet	3	$11x10^6$	%93,8
Enzimatik P2 MKH	T225 flask / 1 adet	3	$24x10^6$	%97,9
Eksplant P3 MKH	T225 flask / 1 adet	3	$8,7x10^6$	%94,8
Enzimatik P3 MKH	T225 flask / 1 adet	3	$16x10^6$	%93,7
Eksplant P4 MKH	T225 flask / 1 adet	4	$30x10^6$	%99,5
Enzimatik P4 MKH	T225 flask / 1 adet	3	$8,6x10^6$	%96,1
Eksplant P5 MKH	T225 flask / 1 adet	4	$12x10^6$	%93,6
Enzimatik P5 MKH	T225 flask / 1 adet	4	$25x10^6$	%99,2
Eksplant P6 MKH	T225 flask / 1 adet	5	$8x10^6$	%96,9
Enzimatik P6 MKH	T225 flask / 1 adet	4	$8,6x10^6$	%94,4

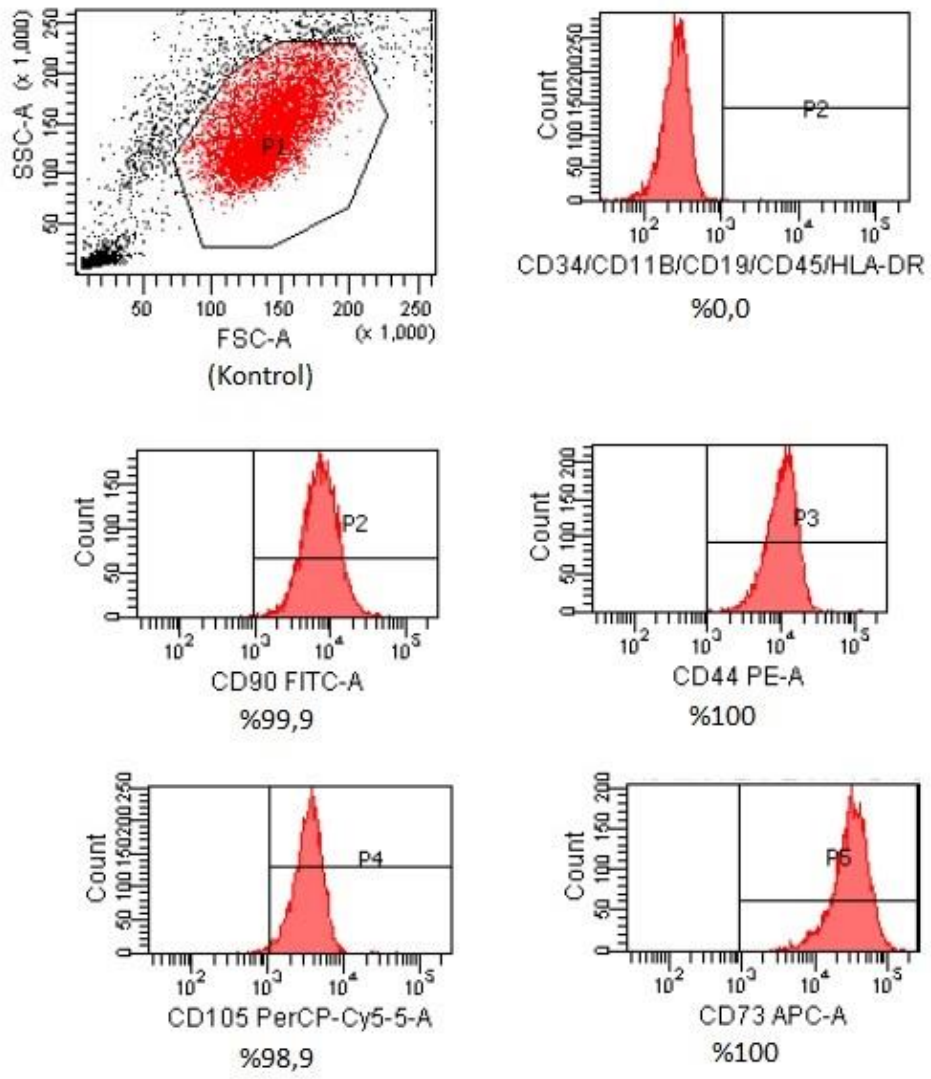
Elde edilen sonuçlara göre, her flasktan elde edilen hücre sayıları her iki yöntemle izole edilen hücreler için de benzerdir. Elde edilen hücre sayısı bakımından iki izolasyon yöntemini karşılaştırmak doğru olmayacaktır, ancak her iyi yöntemle izole edilen hücrelerin veriminin P5'ten sonra azaldığını söylemek mümkündür. P6'da her iki hücreden de elde edilen hücre sayısı genel hatlarıyla diğer pasaj numaralarına göre düşük kalmıştır. P0'daki hücre sayısı ve pasaj gelme gününü değerlendirecek olursak; eksplantta daha büyük doku parçalarını hücre kültür kaplarına yapıştırıp onlardan hücre dökülmesini beklediğimizi enzimatikte ise dokuyu çok daha küçük parçalara ayırarak enzim ile hücrelerin çıkışını ve o şekilde ekimini yaptığımızı düşünürsek, enzimatik kültürde doku ve hücreler kültür kaplarına daha çok yayılmış durumdadır. Bu şekilde daha fazla koloni elde edebiliriz ve koloniler kültür kaplarının hemen hemen tüm yüzeyini kaplayabilirler. Eksplantta ise her kültür kabında belirli sayıda doku parçası olduğu için her doku parçasından sadece dokuların altında ve kenarlarında koloni elde edeceğimizden, eksplantta daha az ama daha büyük koloniler elde ederiz. Enzimatikte ise çok daha fazla sayıda küçük küçük koloniler elde ederiz ve kolonilerin büyümesini daha fazla bekleriz, bunun sonucu olarak kültürde daha fazla tuttuğumuz kültür kaplarından, hücrelerin daha fazla çoğalmasına izin verebildiğimiz için, daha fazla sayıda hücre elde ederiz. Eksplantta ise koloniler daha az ve daha yoğundur, daha erken pasajlamamız gereklidir. Bu durum bize P0'da elde ettiğimiz hücre sayıları arasındaki farkı açıklamaktadır.

Hücrelerin %70 yoğunluğa ulaştığında pasajı geldiği tespit edilerek pasaj atlatıldığını düşündüğümüzde ise veriler bize şunu göstermektedir: Eksplant izole hücrelerin P1'den P3'e kadar pasajı 3 günde gelirken sonraki pasajlarda aynı sayıda hücre ekilmesine rağmen hücrelerin büyümesi yavaşlamış, pasaj günü 4 güne çıkmıştır hatta P6'daki hücrelerin %70 yoğunluğa ulaşması 5 gün sürmüştür. Enzimatik hücreler ise benzer çoğalma hızı gösterse de, P1'den P4'e kadar aynı hızda, eksplantlara göre biraz daha iyi çoğalma profili göstermişlerdir. P6'ya kadar %70 yoğunluğa ulaşmasının, eksplantlara göre yine 1 gün daha kısa sürdüğünü söylememiz mümkündür.

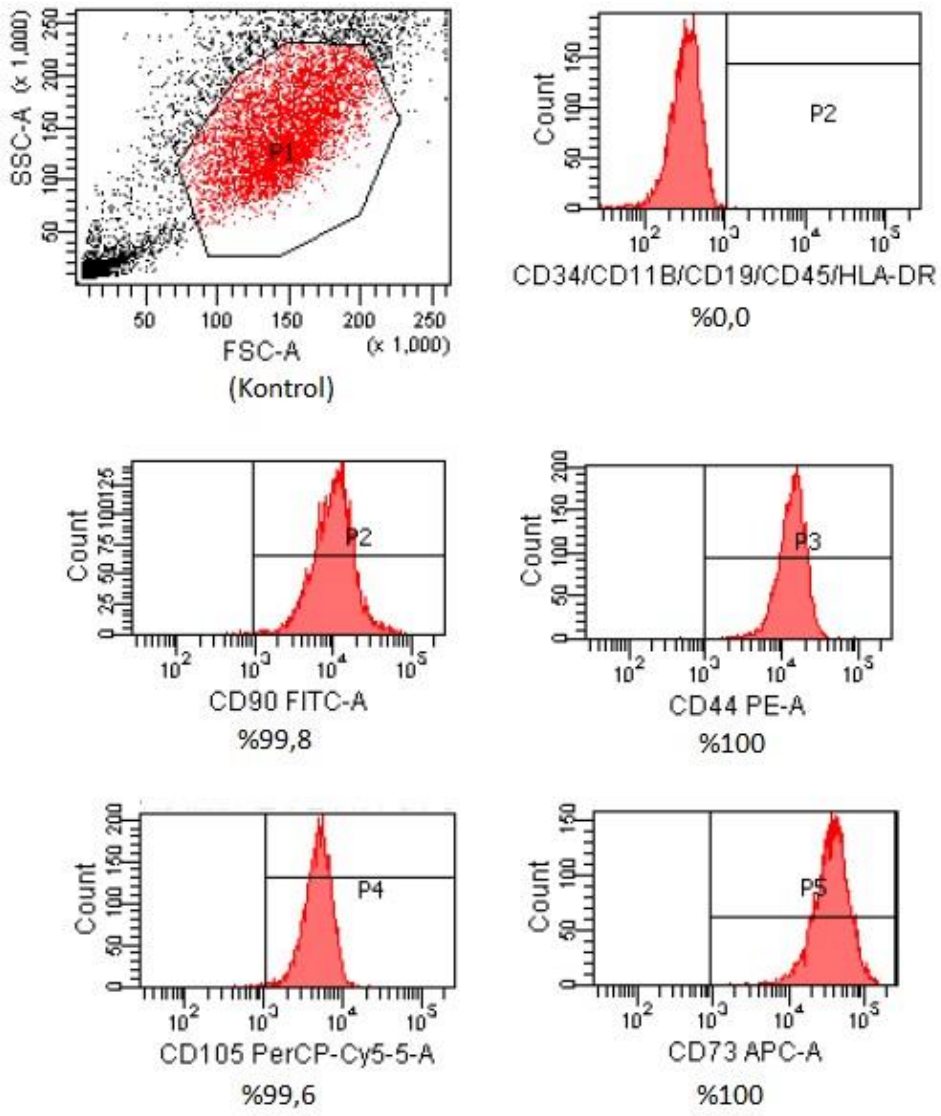
Hücrelerin canlılıklar her iki izolasyon yöntemi için de, P1'den itibaren her pasajda %93,6'nın üzerindedir. Klinik uygulamalar için hücre canlılığının % 90 ve üzeri olmasının öngörüldüğünü düşündüğümüzde, hücrelerin canlılıklarının doğru kalite kontrol standartlarını sağladığını söyleyebiliriz.

3.2. İmmunofenotipik Bulgular

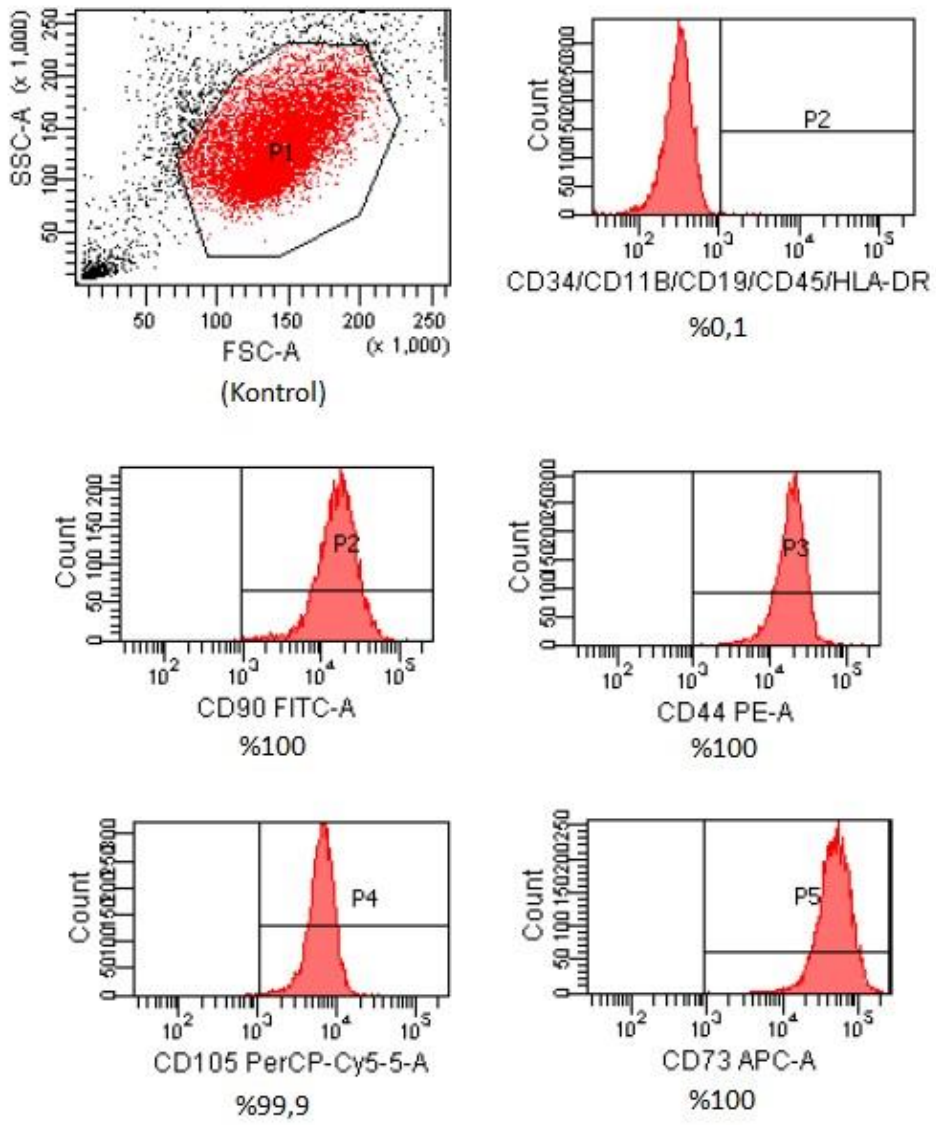
Her iki izolasyon metotu ile elde edilen MKH'lerin P2 ve P6'da gerçekleştirilen akım sitometrik analizlerleri Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5'de ve sonuç tablosu Tablo 3.1'de görülmektedir. Yapılan çalışma sonrası tüm hücrelerin MKH'ler için pozitif kabul edilen CD90, CD44, CD105 ve CD73 belirteçlerini ifade etmektedir ve ifade düzeyleri %98'in üzerindedir. MKH'ler için negatif belirteç olan CD34, CD11B, CD19, CD45 ve HLA-DR için hazır bir negatif kokteyl kullanılmıştır ve sonuçlara göre hücreler bu belirteçleri ifade etmemektedir, ekspreyson düzeyleri %0,1 ve altındadır.



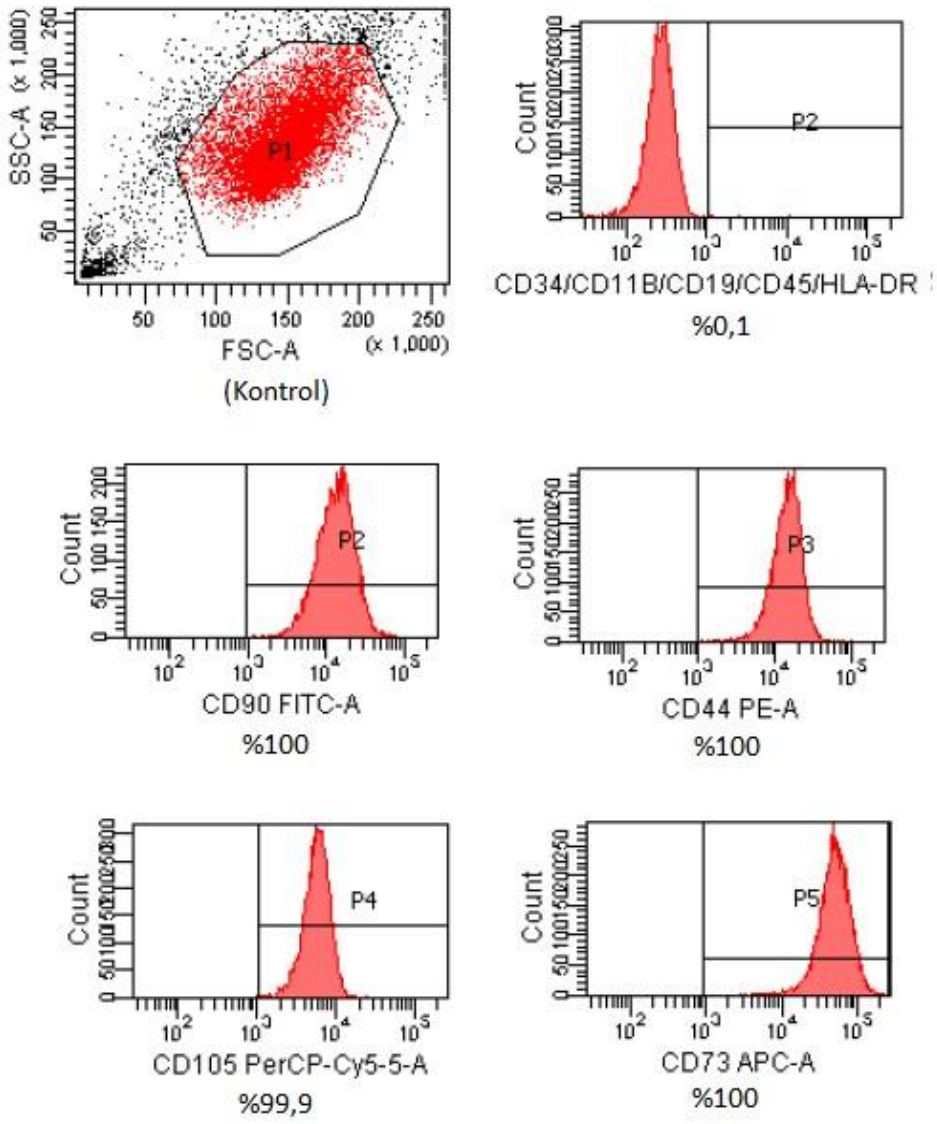
Şekil 3.2: Eksplant izolasyon MKH P2'nin akım sitometrik verileri.



Şekil 3.3: Eksplant izolasyon MKH P6'nın akım sitometrik verileri.



Şekil 3.4: Enzimatik izolasyon MKH P2'nin akım sitometrik verileri.

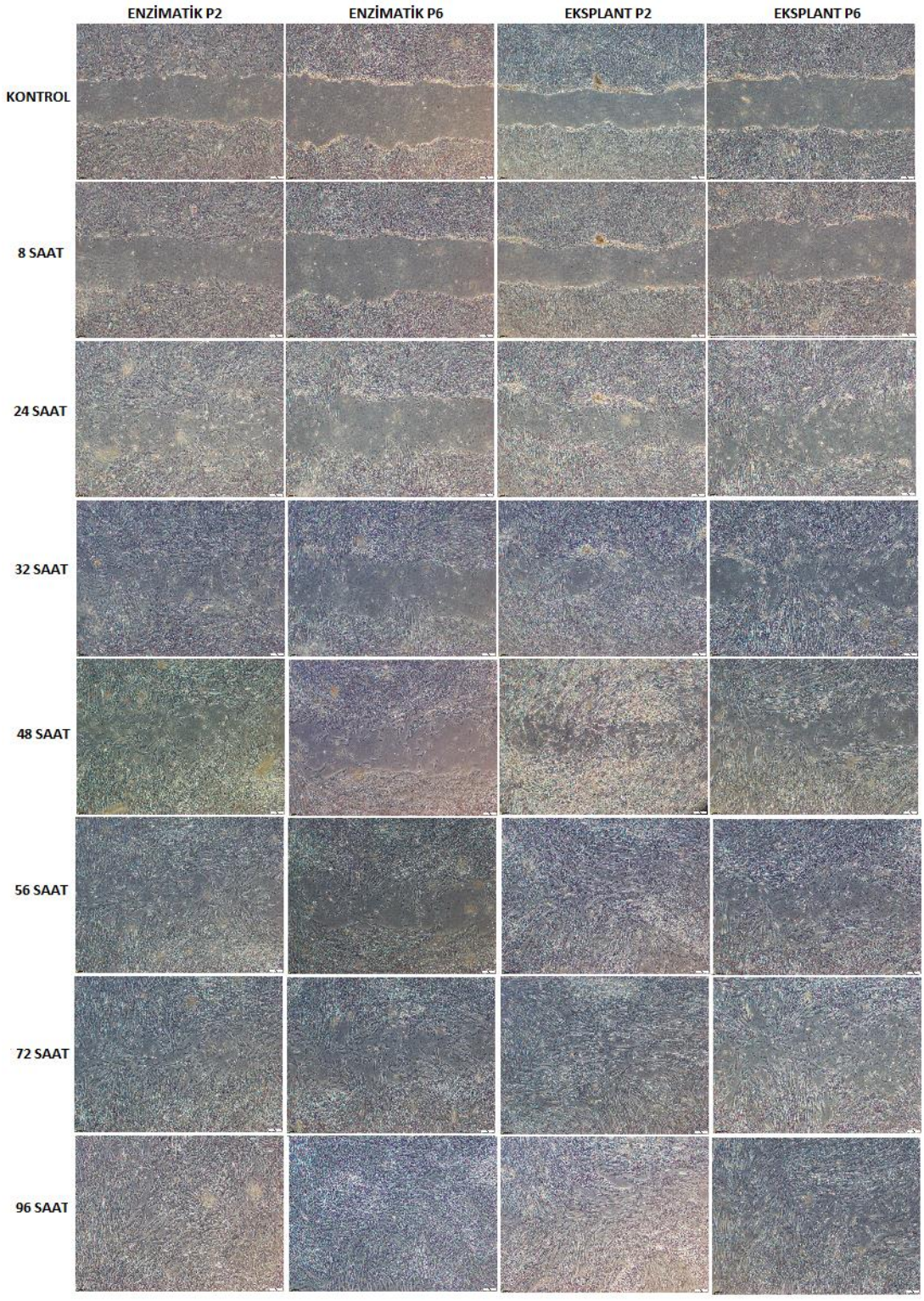


Şekil 3.5: Enzimatik izolasyon MKH P6'nın akım sitometrik verileri.

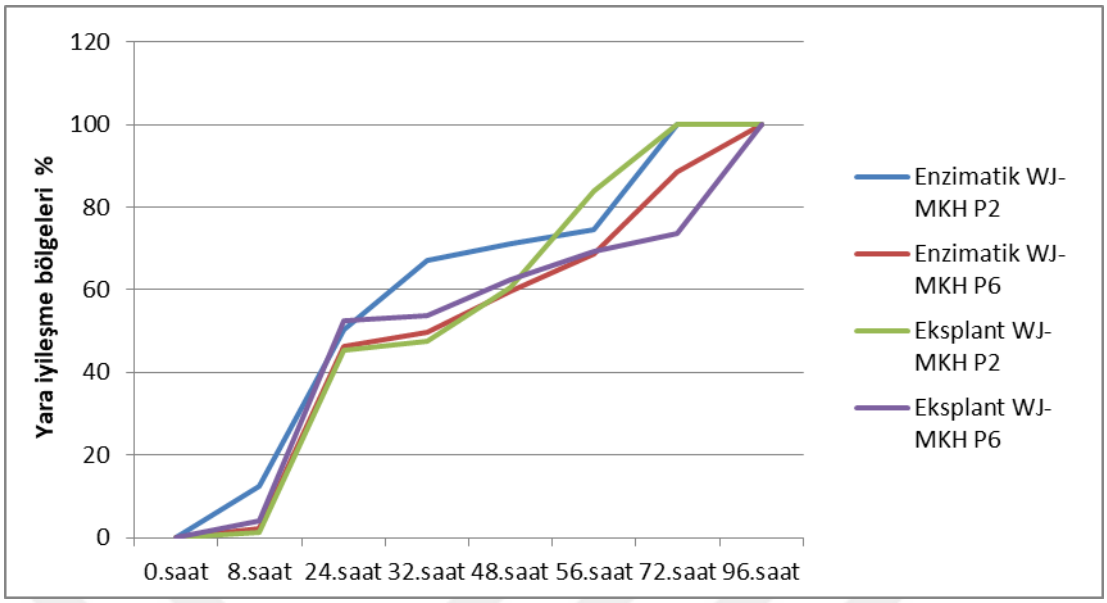
Tablo 3.2: MKH'lerin akım sitometri analizi sonuçları.

Antikor	Eksplant izolasyon MKH		Enzimatik izolasyon MKH	
	P2	P6	P2	P6
CD34/CD11B/CD19/CD45/HLA-DR	%0,0	%0,0	%0,1±0,05	%0,1±0,05
CD90	%99,9±0,05	%99,8±0,1	%100	%100
CD44	%100	%100	%100	%100
CD105	%98,9±0,63	%99,6±0,1	%99,9±0,05	%99,9±0,05
CD73	%100	%100	%100	%100

3.3. Yara İyileşmesi Deney Bulguları



Şekil 3.6: Enzimatik ve eksplant kültür MKH'lerin yara oluşturulmasını takip eden kontrol (0. Saat) ile 8, 24, 32, 48, 56, 72, 96 saatlerine ait zıt faz mikroskobisindeki morfolojik görünümleri. (Orijinal Büyütme: 4X)

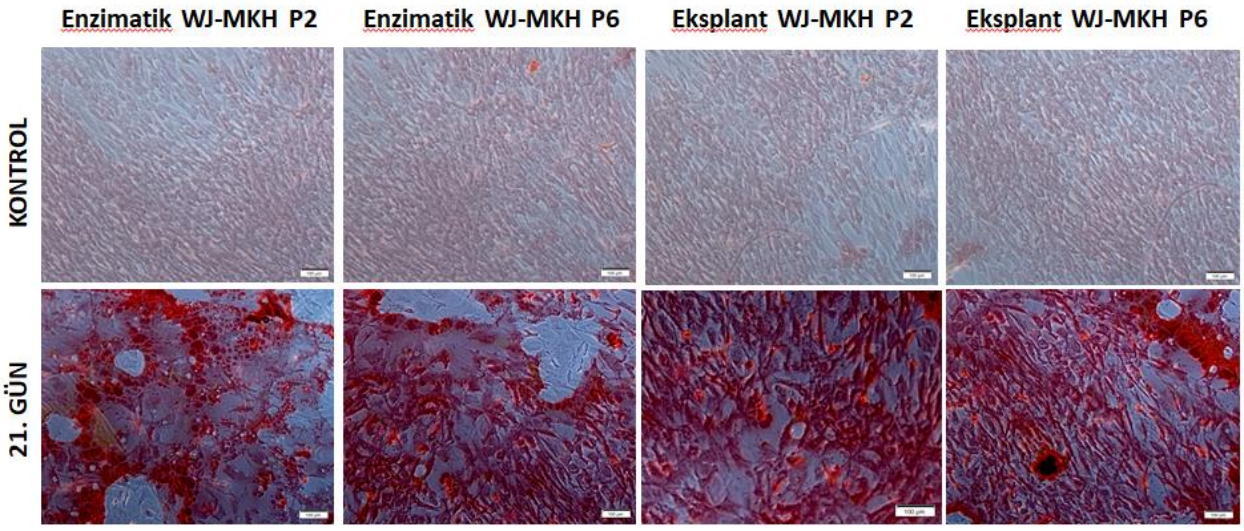


Şekil 3.7: MKH'lerin yara iyileşme bölgeleri %'si grafiği.

Yara iyileşme deneyi için tüm hücreler kültür kaplarına ekilmiş ve yara oluşturulmuştur. Oluşturulan yaraların belirli bölgeleri her kültür kabında işaretlenmiştir ve 4 gün boyunca belli aralıklarla aynı bölgeler takip edilerek yaraların kapanmaları izlenmiştir. Elde edilen verilere göre her bir görselde rast gele seçilen 5 bölgedeki hücreler arası mesafe ölçülerek ortalamaları alınmış ve yaraların kapanma oranları yüzde cinsinden belirlenmiştir. Tüm oluşturulan yaralar 4. günde %100 kapanmıştır ve verilerle yara iyileşme bölgeleri %'si grafiği oluşturulmuştur.

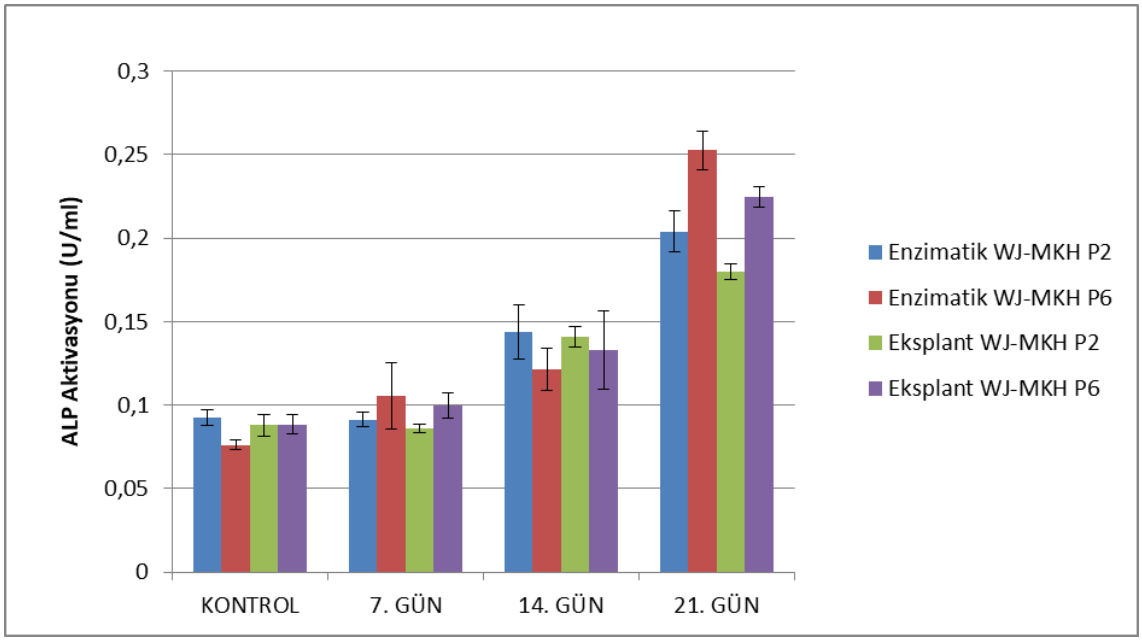
Veriler incelendiğinde tüm hücre tiplerinde 8. saatte yara iyileşmesinde küçük bir artış görülse de özellikle 24 saatlik sürede bu artış çok hızlı bir şekilde %50'leri bulmuştur. Sonrasında yine yavaşlayarak artan yara iyileşmesi enzimatik MKH P2 ve eksplant MKH P2'de daha yüksek seyretmektedir. P2 hücrelerinin 3. günün sonunda yaraları %100 kapanmıştır. P6'daki hücrelerde ise %100 iyileşme 4. günde gözlenmiştir. Tüm hücrelerin çoğalma ve yara iyileşme oranları arasında çok büyük bir fark olmasa da P2'deki hücrelerin P6'daki hücrelere göre yara iyileşmelerini 1 gün önce tamamladıkları bulgusuna ulaşılmıştır.

3.4. MKH'lerin Farklılaşma Bulguları



Şekil 3.8: 21 gün boyunca osteojenik farklılaşmaları indüklenen ve kontrol MKH'lerin Alizarin Red S boyamaları.

Kültür ortamında normal besi yeri ile çoğaltılan kontrol hücrelerinde görülmeyen kalsiyum nodülleri, 21 gün farklılaştırılan hücrelerde görülmüştür. Alizarin Red S ile boyanan tüm MKH'ler kırmızı mineralli tortular göstermiştir.

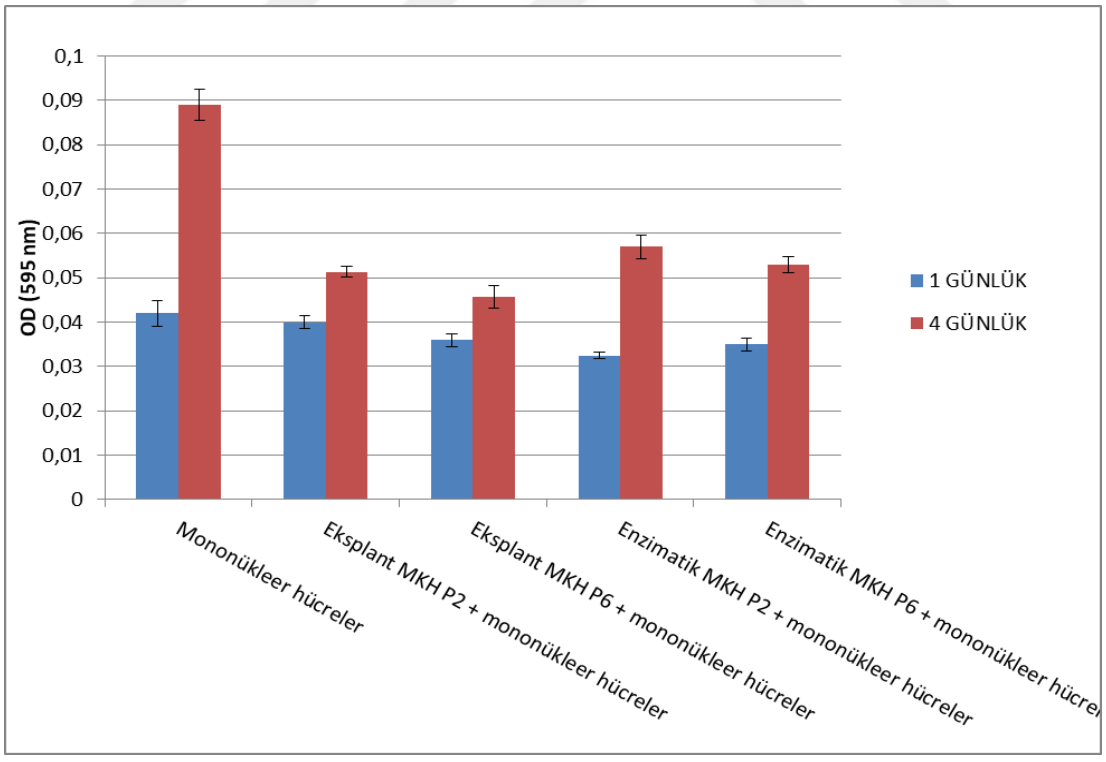


Şekil 3.9: Osteojenik farklılaşmaları indüklenen MKH'lerin ALP aktivasyonu bulguları.

Alkalin fosfataz aktivitesi, osteoblast hücrelerinin varlığını göstermektedir. ALP osteoblast aktivitesinin bir yan ürünü olduğundan, ALP seviyesindeki bir artış aktif kemik oluşumunu göstermektedir. Osteojenik indüksiyonla osteojenik farklılaşmaya yönlendirilen hücrelerin ALP düzeylerinin artması beklenmetedir. Bu çalışma ile 7, 14 ve 21 gün farklılaştırılan MKH'lerin osteojenik farklılaşması, ALP aktivasyonları izlenerek ölçülmüştür.

Hücrelerin ALP aktivitesinin kontrole göre özellikle 14. günden sonra arttığı görülmüştür. Hücre içi ALP'nin 21. günde zirve yaptığı ve daha fazla kalsiyum birikimi olduğu bulunmuştur. Kendi içinde hücrelerin farklılaşma ve ALP avtivasyonlarını karşılaştırdığımızda 21. Günde çok az bir farkla enzimatik WJ-MKH P2'nin eksplant WJ-MKH P2'ye göre; enzimatik WJ-MKH P6'nın eksplant WJ-MKH P6'ya göre biraz daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz. Birlikte ele alındığında bu veriler, 21. günde hücrelerin osteojenik farklılaşmalarının indüklendiğini ortaya koymuştur. Alizarin Red S boyaması ie sonuçlar doğrulanmıştır.

3.5. İmmun Baskılama Özellik Analizi Bulguları



Şekil 3.10: 1 ve 4 gün boyunca MKH'lerle ko-kültür yapılan periferik kan mononükleer hücrelerin proliferasyon bulguları**.**

Hücrelerin ko-kültüründen 1 gün sonra toplanan mononükleer hücrelerin birbirleriyle ve MKH'lerle ko-kültür yapılmamış kültürde 1 gün bekletilmiş mononükleer hücreleriyle proliferasyonlarında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

4 gün ko-kültür sonrası toplanan mononükleer hücrelerin proliferasyon oranlarında ise ko-kültür yapılmamış kültürde 4 gün bekletilmiş mononükleer hücrelere göre büyük bir düşüş belirlenmiştir. MKH'lerle birlikte 4 gün ko-kültür yapılan mononükleer hücrelerin çoğalma hızı, yalnız mononükleer hücrelerin çoğalma hızına oranla hemen hemen yarıya düşmüştür. MKH'ler arasında ise anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bu sonuçlara baktığımızda immun baskılayıcı özelliğe sahip olduğunu bildiğimiz MKH'lerin, 4 MKH için de mononükleer hücrelerin çoğalmalarını baskıladığını söyleyebiliriz.

3.6. Hücrelerin İki Katına Çıkma Süresinin Belirlenmesi

Tablo 3.3: Hücrelerin iki katına çıkma süreleri.

	Enzimatik WJ-MKH P2	Enzimatik WJ-MKH P6	Eksplant WJ-MKH P2	Eksplant WJ-MKH P6
Hücrelerin İki Katına Çıkma Süresi	30,43 saat±0,66	41,56 saat±0,51	33,13 saat±0,40	38,08 saat±1,07

In vitro olarak çoağltıldığında en hızlı hücre büyüme oranına sahip olan ve böylece klinik için de en verimli olan hücreyi bulmak için hücrelerin iki katına çıkma süreleri belirlenmiştir. Kültür kaplarına ekilen ve takip eden 24. saatte kaldırılan hücreler tripsin ile kaldırılarak sayılmış ve elde edilen değerlere göre hücrelerin iki katına çıkma süreleri belirlenmiştir.

Elde edilen bulgulara göre tüm hücrelerin iki katına çıkma süreleri 1-2 gün aralığındadır. En hızlı büyüme oranına enzimatik P2 hücreler sahiptir. Her iki izolasyon yöntemi için de hücrelerin büyüme hızı, P2'den P6'ya ilerledikçe bir miktar azalmış olsa da hücreler benzer büyüme oranına sahiptir. Çok fazla sayılarda hücre çoğaltıldığı

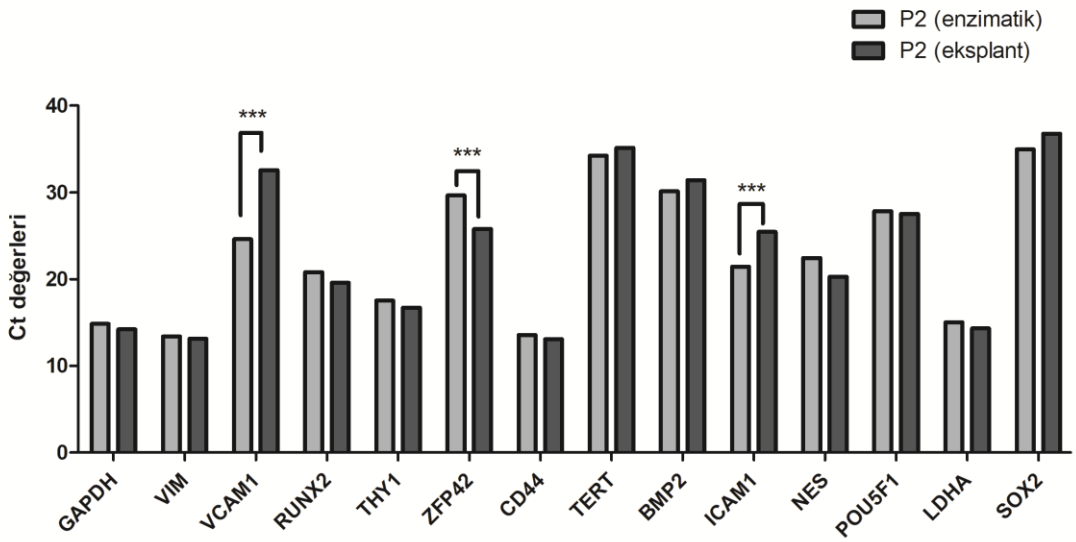
büyük üretimlerin yapıldığı durumlarda, hücre sayısı bakımından enzimatik hücrelerin kullanılması küçük bir miktar avantaj sağlayabilmektedir.

3.7. Gen Ekspresyon Düzeyi Analizi Bulguları

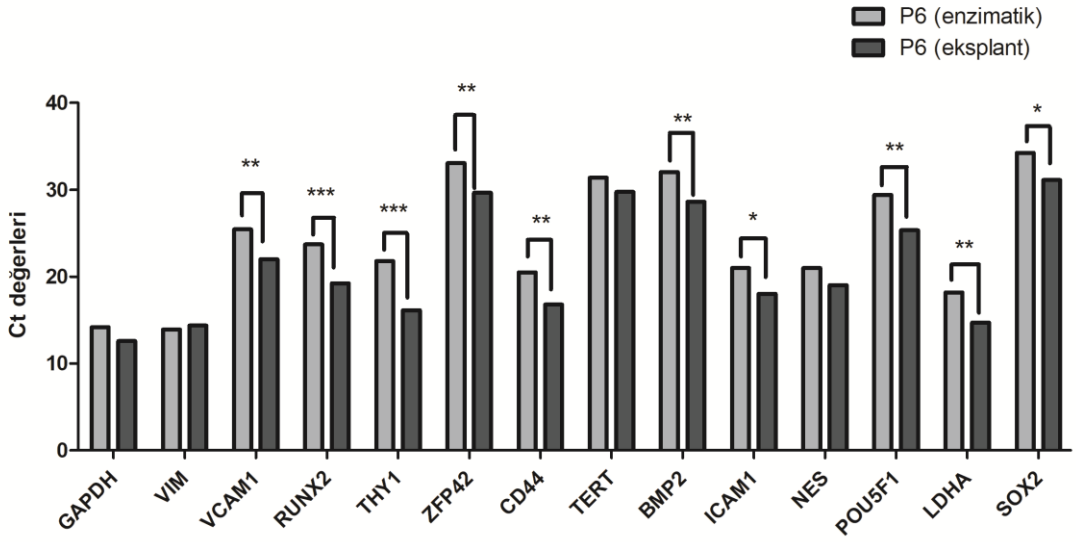
Telomeraz adı verilen bir enzimin bir bileşenini yapmak için talimatlar sağlayan TERT, embriyonik ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler için protein kodlama geni olan ZFP42, embriyonik gelişim sırasında birçok farklı doku ve organın oluşumunda kritik bir rol oynayan bir protein yapmak için talimatlar sağlayan SOX2 WJ-MKH'lerin pluripotensi berliteçleri olarak kullanılmıştır. Yine WJ-MKH belirteci olarak kullanılan diğer genlerden VCAM1, tip I membran proteini, lökosit-endotel hücre yapışmasına ve sinyal transdüksiyonuna aracılık etmektedir. Ara filamentler, mikrotübüller ve aktin mikrofilamentleri ile birlikte hücre iskeletini oluşturan VIM geni, hücre şeklini ve sitoplazmanın bütünlüğünü korumaktan sorumludur. Runx2, multipotent mezenkimal hücrelerin olgunlaşmamış osteoblastlara farklılaşmasını sağlamaktan sorumludur. THY1, çok sayıda hücre tipinde, ancak özellikle bağışıklık ve sinir sistemi hücrelerinde hücre yapışması ve hücre iletişiminde rol oynamaktadır. CD44'ün bilinen işlevleri, hücresel adezyon (agregasyon ve göç), anjiyogenez ve sitokinlerin salınmasıdır. BMP2, proteinlerin TGF-beta süper ailesinin salgılanan bir ligandını kodlar. ICAM-1, hücre-hücre etkileşimlerinin stabilize edilmesindeki önemi ile uzun süredir bilinen bir endotelyal ve lökosit ilişkili transmembran proteindir. NES, progenitör hücre bölünmesi sırasında hücresel faktörlerin yavru hücrelere trafiğinde ve dağıtımında rol oynayabilir. POU5F1, embriyonik gelişim ve kök hücre pluripotansında anahtar rol oynayan bir POU homeodomain içeren bir transkripsiyon faktörünü kodlar, LDHA geni ise, laktat dehidrojenaz enziminin tek parçası (alt birimi) olan laktat dehidrojenaz-A adı verilen bir protein yapmak için talimatlar sağlamaktadır.

Tablo 3.4: Eksplant ve enzimatik WJ-MKH'ler için genlerin C_T değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları.

GEN ADI	Eksplant WJ-MKH P2	Eksplant WJ-MKH P6	Enzimatik WJ-MKH P2	Enzimatik WJ-MKH P6
	C_T DEĞERİ ve STANDART SAPMA	C_T DEĞERİ ve STANDART SAPMA	C_T DEĞERİ ve STANDART SAPMA	C_T DEĞERİ ve STANDART SAPMA
GAPDH	14,20±0,59	12,58±0,53	14,83±0,38	14,19±0,39
VIM	13,13±0,17	14,36±1,26	13,38±0,76	13,93±0,63
VCAM1	32,57±0,48	22±0,09	24,59±0,25	25,44±0,94
RUNX2	19,58±1,38	19,23±1,5	20,8±0,68	23,82±0,49
THY1	16,72±1,48	16,13±0,55	17,54±0,24	21,78±1,12
ZFP42	25,78±1,38	29,65±1,6	29,66±2,36	33,07±1,55
CD44	13,19±0,41	16,8±1,1	13,56±0,02	20,49±2,02
TERT	35,15±1,61	29,75±0,67	34,22±0,22	31,4±2,34
BMP2	31,41±0,83	28,63±0,7	30,13±0,12	32,05±2,6
ICAM1	25,45±0,83	18,02±0,03	21,43±2,15	20,99±1,53
NES	20,3±0,11	19,2±0,46	22,44±0,47	21±1,56
POU5F1	27,52±0,09	25,34±0,74	27,83±1,34	29,4±0,88
LDHA	14,32±2,59	14,71±0,54	15,03±2,88	18,19±1,07
SOX2	36,78±0,89	31,13±0,48	34,97±1,8	34,26±2,8



Şekil 3.11: Eksplant ve enzimatik P2 MKH'lerin gen ekspresyonu bulguları.



Şekil 3.12: Eksplant ve enzimatik P6 MKH'lerin gen ekspresyonu bulguları.

P2 hücreler karşılaştırıldığında; VCAM1 ve ICAM1 genlerinin ekspresyon seviyeleri ekpslant izolasyon metodunda anlamlı bir şekilde artmıştır (***p<0.001). ZFP42 gen ekspresyon seviyesi eksplant izolasyon metodunda anlamlı bir şekilde azalmıştır. P6 hücreler karşılaştırıldığında ise; VCAM1, RUNX2, THY1, ZFP42, CD44, BMP-2, ICAM1, POU5F1, LDHA, SOX2 genlerinin ekspresyon seviyeleri enzimatik izolasyon metodunda anlamlı bir şekilde artmıştır (***p<0.001 çok yüksek düzeyde

anlamlı, 0.001<**p<0.01 yüksek düzeyde anlamlı, 0.01<*p<0.05 sınırda anlamlı). Her iki izolasyon metodunda elde edilen hücrelerin Ct döngü sayılarının uygun seviyede olmasından dolayı mezenkimal kök hücre karakteristik özelliklerini taşıdığı gösterilmiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğumdan sonra atılan göbek kordonu, rejeneratif tıpta önemli bir kök hücre kaynağı sunmaktadır. Göbek kordonu içindeki WJ, zengin bir MKH kaynağı içermektedir. Farklılaşma, yüksek proliferasyon oranları ve immün düzenleyici gibi önemli özelliklere sahiptir. Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin aksine, daha yüksek proliferasyon oranlarına sahiptir ve izolasyonu invazif veya ağrılı prosedürler içermemektedir. Bu nedenle, WJ potansiyel bir MKH kaynağı olarak değerlendirilir ve rejeneratif tıpta hücre tabanlı tedavilerde kemik iliği ve kordon kanı kaynaklı MKH'lere iyi bir alternatif olarak gösterilmektedir (Venugopal ve ark., 2011). Bu nedenle göbek kordonundan en etkili hücre izolasyon yöntemini saptayarak standardize etmek, hücreleri en uygun *in vitro* şartlarda en verimli pasaj numarasına getirmek ve hücrelerin naklinden önce tüm önemli testler ile MKH'lerin sahip olması gereken özellikleri iyi bir şekilde belirlemek gereklidir. Biz bu çalışma ile, 2 farklı izolasyon yöntemi kullanılan ve P2 ve P6'ya getirilen WJ-MKH'lerin, çoğalma kinetiğini, migrasyon yeteneğini, yüzey antijen fenotipini, *in vitro* farklılaşma potansiyelini, immün baskılayıcı özelliğini ve gen ekspresyonunu karşılaştırdık. Bu şekilde, klinik kullanım için en etkili MKH'leri elde etmede kullanılabilecek yöntem standartlaştırılabilecek ve tüm sahip olması gereken özellikler ile birlikte en etkili pasaj numarasını belirlenebilecektir.

MKH'ler kendini yenileme, başta mezodermal kaynaklı hücreler olmak üzere başka hücrelere farklılaşma kapasitesine ve immun baskılayıcı özelliklere sahip olan ve çeşitli dokulardan *in vitro* ortamda izole edilebilen fibroblastik hücrelerdir. MKH'ler ayrıca; migrasyon özellikleri sayesinde hasarlı dokuya ulaşabildikleri gibi, büyüme faktörleri, sitokin, kemokinler vb. salgılayarak hasarlı hücre/doku tamirine katkı sağlayabilmektedirler. MKH'lerin sahip olduğu tüm bu özellikler sayesinde, bu hücreler çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. *In vitro* çoğaltılmış MKH'ler, morfoloji ve çoğalma oranları açısından çeşitlilik göstermektedir. Hala klinik deneme aşamasında olan MKH'lerin kullanıldığı bu tedavilerin temellerinin anlaşılabilmesi ve geliştirilebilmesi için birçok klinik araştırma devam etmektedir.

Hücresel tedavilerde başarı oranı; doğru hasta seçimi, uygulama yolu, hastalık, hastanın yaşı gibi etkenlere bağlı olmakla beraber büyük oranda tedavide kullanılan hücrelerin kalitesine de bağlıdır. Bu nedenle istenilen dokudan hücreleri başarılı ve verimli bir şekilde izole etmek, aynı zamanda doğru pasaja getirilen hücrelerin hala tüm

özelliklerini koruyor olması hücresel tedaviler için oldukça önemlidir. Çünkü MKH'lerin ileri pasajlarda kök hücre özelliklerini kaybetmeye başladığı, bu nedenle ideal olarak klinik uygulamalar için *in vitro* kültürün erken aşamalarında kullanılmasının daha doğru olduğu bilinmektedir (Venugopal ve ark., 2011). MKH'lerin klinikte kullanımları için tüm bu *in vitro* işlemlerin uluslararası kabul edilmiş standartlarda GMP laboratuvarlarında yapılması gerekmektedir. Göbek kordonu kaynaklı MKH'ler klinik uygulamalar için en uygun aday olarak görülmektedir. Göbek kordonu kaynaklı MKH'ler yaşamın erken bir aşamasında türetilir ve transplante edildiklerinde daha düşük immünojenikliğe sahiptir. Terapötik etkinlikleri de çeşitli preklinik ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir (Huang ve ark., 2019). Göbek kordonu, iki arter ile bir ven ve onları saran MHK'lerin bolca bulunduğu jelatinli bir bağ dokusu olan WJ içermektedir. WJ'den hem enzimatik hem eksplant yöntem ile türetilen MKH'ler, diğer yetişkin dokulardan izole edilen MKH'lerden daha yüksek proliferasyona sahip olduğu için hücresel tedaviler için potansiyel hücre grubudur ve bu bilgiler ışığında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımları söz konusudur. (Nekanti ve ark., 2010). Ayrıca gönüllü vericiye ekstra bir müdahale olmadan alınabilmesi, zaten doğum sırasında ayrılan bir doku olması da kullanımı açısından bir kolaylık sağlamaktadır. Bu çalışmada enzimatik ve eksplant yöntemlerin avantaj ve dezavantajları ile ileri pasajdaki farklılıkları karşılaştırılmış bu şekilde klinik kullanım için tüm yönleri ile hangi hücrelerin daha avantajlı olabileceği tartışılmıştır.

Hücresel tedavilerde bir diğer kritik nokta hücrelerin pasaj numarasıdır. Doğru yöntem ile elde ettiğimiz hücreleri klinikte kullanabilmek için belirli bir sayıya ulaştırmamız gereklidir. En fazla hücreyi elde edebildiğimiz aynı zamanda tüm MKH özelliklerinin korunduğu pasaj numarasını tespit edebilmek ileri çalışmalar ve klinik uygulamalar için çok önemlidir. Erken pasaj MKH'lerin, farklılaşma yeteneklerinin yüksek olması ve tüm kök hücre özelliklerini korumasıyla birlikte kullanım açısından avantajlı olduğu bilinmektedir. Ancak primer kültüde olası tüm diğer hücrelerden arınmış doğru bir MKH popülasyonu elde etmek, tüm MKH testlerini gerçekleştirmek ve tüm bu süreçlerin sonunda klinik kullanım için yeterli hücre sayısına ulaşmak için çeşitli pasaj numarasındaki hücrelerin karşılaştırılması önemlidir. Bu amaçla bu çalışmada, iki farklı izolasyon yöntemi ile elde ettiğimiz hücreler P2 ve P6'ya getirilerek tüm yönleri ile karşılaştırılmıştır. WJ-MKH'ler için tanımlanan pozitif ve

negatif yüzey belirteçleri sayesinde, akım sitometri çalışmasıyla birlikte bu belirteçleri eksprese etme seviyeleri tespit edilebilmektedir. Karakterizasyon çalışmalarının başında gelen bu yöntem ile tanımlanan yüzey belirteçleri sayesinde MKH özellikleri belirlenebilmektedir.

MKH'ler immün düzenleyici özellikleri sayesinde, hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sistemlerinde bağışıklık hücreleri ile etkileşime girme yeteneğine sahiptir. MKH aracılı immün baskılama; kemokinlerin, enflamatuar sitokinlerin ve MKH'ler tarafından salgılanan efektör faktörlerin kombine reaksiyonuna, enflamatuar uyaranın mikroçevresine ve gücüne bağlıdır. Son birkaç yılda elde edilen veriler MKH'lerin, doku onarımı ile enflamatuar hastalıkların ve bağışıklık bozukluklarının tedavisi için immüno düzenleyici etkilere sahip olduğunu göstermiştir. MKH'ler, bağışıklık bozukluğu hastalıklarının tedavisinde önemli gelişmeler ve avantajlar sağlamıştır (Wang ve ark., 2018). MKH tabanlı moleküler mekanizmaların araştırıldığı çalışmaların gerçekleştirilmesi, MKH immün düzenleyiciliğini daha fazla aydınlatacak ve MKH tedavisini kullanan klinik uygulamaların geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

MKH'lerin klinikte etkili kullanımlarının en önemli noktalarından biri, homojen hücre populasyonuna sahip tüm MKH özelliklerini sağlayan bir hücre üretim yöntemine sahip olmaktır. Bununla birlikte, *in vitro* ortamda çoğaltılan MKH'lerin hücresel heterojenliği ve farklılaşma kapasiteleri pasaj numarası ilerledikçe değişebilmektedir. Bu çalışma ile belirlenen amaçlardan biri de, farklı pasaj numarasındaki hücrelerin MKH'lere spesifik özellikleri eşit oranda taşıyıp taşımadığını belirlemektir.

Geçtiğimiz yıllarda, doku rejenerasyonunda MKH'ler üzerine yapılan araştırmalar; MKH'lerin immüno düzenleyici yetenekleri sayesinde, kontrol edilemeyen inflamatuar hastalıkların tedavisinde etkileyici başarılar elde edildiğini göstermiştir. MKH'lerin enflamatuar hastalıkların tedavisinde şaşırtıcı etkinliği ilk olarak steroid ve siklosporine dirençli GVHH'den muzdarip 9 yaşında bir hastada bulunmuştur (Huang ve ark., 2019). Ancak başarılı sonuçlar her zaman elde edilememektedir ve bu yüzden tedaviye yönelik çalışmaların, özellikle klinikte kullanılan MKH'lerin kalitesinin iyi bir şekilde irdelenmesi gerekmektedir.

Yaptığımız çalışmada gönüllü vericiden aldığımız dokudan hem enzimatik hem eksplant yol ile eş zamanlı olarak gerçekleştirdiğimiz izolasyon sonrası takip eden

günlerde başarılı bir şekilde hücre kolonilerimizi gözlemledik. Hem hücrelerin pasaj atlama sırasındaki çoğalma hızları hem de sonrasında yapılan hücrelern iki katına çıkma sürelerinin belirlenmesi deneyi sonuçlarına göre; hücrelerin kültürdeki çoğalma hızları birbirine yakın olsa da enzimatik izolasyonla elde edilen hücrelerin erken pasajının diğer hücrelere göre daha yüksek çoğalma hızına sahip olduğu görülmüştür.

MKH'lerin hastalıkların tedavisinde etkili bir şekilde uygulanması, nispeten homojen hücre popülasyonunun üretimine dayanmaktadır. Göbek kordonu kaynaklı MKH'ler için tanımlanan pozitif ve negatif yüzey belirteçleri bulunmaktadır. Akım sitometri bulgularında hem negatif hem pozitif belirteçler göz önüne alındığı zaman tüm hücrelerin MKH karakterizasyonuna sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuca göre her iki izolasyon yönteminin de efektif olduğunu gördük. Ancak kontrol diyagramları incelendiği zaman eksplant P6'daki hücrelerin eksplant P2 hücrelerine göre daha dağınık bir popülasyona sahip olduğu ve hücre boyutlarının birbirinden farklı olduğu görülmektedir. Enzimatik hem P2 hem P6 hücrelerindeki popülasyonların ise iyi olduğu ve büyük oranda birbirine benzediği görülmektedir.

Mezenkimal kök hücreler, rejenerasyon ve iltihaplanmayı düzenleyerek doku onarımını destekleme konusunda üstün bir yeteneğe sahip bir multipotent hücre popülasyonudur. Son dönemlerde hücresel tedavilerde ve doku mühendisliğinde kullanılan MKH'ler, iyileşme sürecinde yaralı dokulara göç ederler. MKH'lerin göçü, bu süreçte mekanik ve kimyasal faktörlerle düzenlenmektedir (Fu ve ark., 2019). MKH'lerin içinde yaşadığı mikro çevre, göçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Kemokinler, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi kimyasal faktörlerin yanı sıra, MKH'lerin göçü, mekanik gerinim, kayma gerilmesi, matris sertliği ve mikro yerçekimi gibi mekanik faktörlerden de etkilenmektedir. Yaralı dokulara göçten sonra, MKH'ler hasarlı dokuların yara iyileşmesini desteklemektedirler. Çalışmalar, bu onarım işlemi sırasında, MKH'lerin parakrin olarak bilinen ve doku onarımını, rejenerasyonunu veya yaralı dokuda farklılaşmayı teşvik etmek için gerekli olan kemokinler, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi kimyasal faktörleri salgıladığını göstermiştir (Francois ve ark., 2013). Bu çalışma için farklı yöntemlerle izole edilen farklı pasajlardaki hücrelerin migrasyon yeteneklerini karşılaştırmak amacıyla yara iyileşmesi deneyi yapılmıştır. Yara oluşturulmasını takip eden 8, 24, 32, 48, 60, 72 ve 96. saatlerde hücre göçleriyle yaraların kapanmaları takip edilmiştir. Hem eksplant hem enzimatik yönetemle izole

edilen P2’deki hücrelerde oluşturulan yaralar 3. gün sonunda tamamen kapanırken, P6’daki hücrelerde oluşturulan yaraların tam kapanmaları 4. günü bulmuştur. Enzimatik WJ-MKH P2 biraz daha hızlı ilerlese de enzimatik ve eksplant hücreler arasında tam olarak bir fark saptanmamıştır. Ancak P2’deki hücrelerin, P6 hücrelere göre migrasyon ve yara iyileşmesi konusunda daha başarılı olduğu bulunmuştur.

MKH'ler bulundukları ortamda çevredeki hücrelerden biyokimyasal uyarı alırlar. Bu uyaranlar, MKH'lerin diğer hücrelerin öncüleri olmak için nasıl farklılaştıklarını etkilemektedir. Kemikteki kök hücre nişinin doğal ortamında bulunan MKH'lerin osteojenik farklılaşmaya gitmesi beklenmektedir. MKH'lerin osteojenik farklılaşma yetenekleri *in vitro* olarak da iyi bilinmektedir (Birmingham ve ark., 2012). MKH'lerin en belirgin özelliklerinden olan osteojenik farklılaşmaları 2 farklı yöntemle izole edilen erken ve geç pasaj hücreler için; alkalin fosfataz aktivitesi ölçümüyle karşılaştırılmıştır. Tüm hücreler için hücre içi ALP'nin 21 gün farklılaştırmanın sonunda zirve yaptığı görülmüştür. Bu çalışma, her iki yöntemle izole edilen hem P2 hem P6'daki hücrelerin osteojenik farklılaşmaya *in vitro* ortamda 21 günde götürülebileceğini göstermektedir.

MKH’ler klinikte en çok, immün düzenleyici özellikleri sayesinde çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. MKH’ler, PHA ile uyarılan eşit sayıda ekilen primer periferik kan mononükleer hücreleriyle 1 ve 4 gün boyunca ko-kültür yapılmıştır. Ko-kültür sonucu toplanan mononükleer hücrelerin çoğalma miktarları karşılaştırılmış bu sayede 4 farklı MKH’nin immün baskılama seviyelerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. 1 günlük ko-kültür sonrası yapılan MTT testi sonuçlarına göre; 4 farklı MKH ve kontrol grubu için mononükleer hücrelerin proliferasyon oranlarında bir fark gözlenmemiştir. 4 gün sonuda ise MKH’lerle ko-kültür yapılan mononükleer hücrelerin, sadece mononükleer hücrelere göre proliferasyonlarında %45 oranında azalma belirlenmiştir. Kendi içinde MKH’ler için ise anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Gen ekspresyonu çalışmaları için göbek kordonundan 2 farklı yöntemle izole edilen MKH'ler P2 ve P6'ya kadar kültürlenmiş, ardından toplam RNA WJ-MKH'lerden izole edilmiştir. RNA daha sonra cDNA'ya ters transkripsiyona tabi tutulmuştur ve PCR amplifikasyonu, standart prosedürler izlenerek gerçekleştirilmiştir.

Göbek kordonu kaynaklı MKH'lerle ilişkili genlerin ekspresyon profili analiz edilmiş ve 4 hücre için bu profiller karşılaştırılmıştır. İzolasyon yönetemleri ve pasaj numaralarının ekspresyon seviyelerini büyük oranda değiştirmemiş olması ile hücreler için gen ekspresyon bulguları hücrelerin gen ekspresyonu düzeyinde tüm MKH olma özelliklerini sağladığını göstermektedir.

Elde ettiğimiz sonuçlar, 2021 senesinde Rizal ve ark. yaptığı eksplant izolasyonla elde edilmiş P5 ve P8 hücrelerin; karakterizasyon, proliferasyon ve farklılaşma kapasiteleri açısından karşılaştıldığı çalışma ile uyumlu görülmüştür. Bu çalışmada her iki pasaj numarasındaki hücrelerin sonuçları çok benzer çıkmıştır. Yine 2019 yılında Widowati ve ark. yaptığı çalışmada enzimatik ve eksplant yöntemle izole edilmiş P3 ve P8 hücrelerin tümü; yüzey belirteçleri ve farklılaşma kapasiteleri bakımından efektif bulunmuştur. Eksplant izolasyon ile biraz daha yüksek saflık oranında MKH'lerin elde edildiği bildirilmiştir.

Çalışmalarımız, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek olan MKH'lerin standardizasyonu için bilgi sağlamıştır. Sonuç olarak, hem enzimatik hem eksplant izolasyon yöntemleri göbek kordonunundan WJ kaynaklı MKH izolasyonu için başarıyla kullanılabilmektedir. P2 her ne kadar daha erken pasaj olduğu için klinik için daha potansiyel gibi görülse *de in vitroda* yapılan çalışmalarda P2 ve P6 hücrelerin çok benzer özellikler taşıdığı ve aynı potansiyele sahip oldukları gösterilmiştir. Rejenetaif tıpta daha verimli olacağı, çok daha fazla sayıda hücreye ulaşılacağı, daha homojen hücre populasyonuna ulaşılacağı, MKH karakteristikleri anlamlı oranda değişmediği, kollajenazın pahalı olduğu ve temininin zor olduğu için hücreleri ekstra bir enzimle manipülasyona uğratmak istemediğimiz durumlar göz önüne alındığında eksplant P6 hücrelerin kullanımının daha avantajlı olacağı görülmektedir.

KAYNAKÇA

Abdi R., Fiorina P., Adra C.N., Atkinson M. and Sayegh M.H. (2008) Immunomodulation by mesenchymal stem cells: A potential therapeutic strategy for Type 1 Diabetes. Diabetes, 57(7):1759-1767. doi: 10.2337/db08-0180

Aggarwal S. and Pittenger M.F. (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood, 105(4):1815-1822. doi: 10.1182/blood-2004-04-1559

Amorin B., Alegretti A.P., Valim V., Pezzi A., Laureano A.M., Lima da Silva M.A., Wieck A. and Silla L. (2014) Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. Human Cell, 27:137–150. doi: 10.1007/s13577-014-0095-x

Azandeh S., Orazizadeh M., Hashemitabar M., Khodadadi A., Shayesteh A.A., Nejad D.B., Gharravi A.M. and Allahbakhshi E. (2012) Mixed enzymatic-explant protocol for isolation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly and encapsulation in 3D culture system. J. Biomedical Science and Engineering, 5:580-586. doi:10.4236/jbise.2012.510071

Baksh D., Song L. and Tuan R.S. (2004) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J. Cell. Mol. Med., 8(3):301-316. doi: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x.

Batsali A.K., Kastrinaki1 M.C., Papadaki1 H.A. and Pontikoglou C. (2013) Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of the umbilical cord: Biological properties and emerging clinical applications. Current Stem Cell Research & Therapy, 8(2):144-155. doi: 10.2174/1574888x11308020005

Bianco P., Robey P.G. and Simmons P.J. (2008) Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays. Cell Stem Cell, 2(4):313–319. doi: 10.1016/j.stem.2008.03.002

Birmingham E., Niebur G.L., McHugh P.E., Shaw G., Barry F.P. and McNamara L.M. (2012) Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. Eur. Cell Mater., 23:13-27. doi: 10.22203/ecm.v023a02

Bruyn C.D., Najar M., Raicevic G., Meuleman N., Pieters K., Stamatopoulos B., Delforge A., Bron D. and Lagneaux L. (2011) A rapid, simple, and reproducible method

for the isolation of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly without enzymatic treatment. Stem Cells and Development, 20(3):547-557. doi: 10.1089/scd.2010.0260

Bonab M.M., Alimoghaddam K., Talebian F., Ghaffari S.H., Ghavamzadeh A. and Nikbin B. (2006) Aging of mesenchymal stem cell in vitro. BMC Cell Biology, 7:14. DOI: 10.1186/1471-2121-7-14

Burr S.P., Dazzi F. and Garden O.A. (2013) Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance? Immunol Cell Biol, 91(1):12-18. doi: 10.1038/icb.2012.60

Caplan A.I. (2000) Mesenchymal stem cells and gene therapy. Clin. Orthop. Relat. Res., 379:67-70.

Chen F.H. and Tuan R.S. (2008) Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. Arthritis Research & Therapy, 10(5):223. doi: 10.1186/ar2514

Crippa S. and Bernardo M.E. (2018) Mesenchymal stromal cells: Role in the BM niche and in the support of hematopoietic stem cell transplantation. Hemasphere, 2(6):e151. doi: 10.1097/HS9.0000000000000151

Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G.L., Pistoia V. and Uccelli A. (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. Blood, 107(1):367-72. doiI: 10.1182/blood-2005-07-2657

Dai W., Hale S.L., Martin B.J., Kuang J.Q., Dow J.S., Wold L.E. and Kloner R.A. (2005) Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: Short- and long-term effects. Circulation, 112(2):214-223. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.527937

De Miguel M.P., Fuentes-Julián S., Blázquez-Martínez A., Pascual C.Y., Aller M.A., Arias J. And Arnalich-Montiel F. (2012) Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: Advances and applications. Current Molecular Medicine, 12:574-591. doi: 10.2174/156652412800619950

Ding D.C., Chang Y.H., Shyu W.C. and Lin S.Z. (2015) Human umbilical cord mesenchymal stem cells: A new era for stem cell therapy. Cell Transplantation, 24:339–347. doi: 10.3727/096368915X686841

Ezquer F., Ezquer M., Contador D., Ricca M., Simon V. and Conget P. (2012) The antidiabetic effect of mesenchymal stem cells is unrelated to their transdifferentiation potential but to their capability to restore Th1/Th2 balance and to

modify the pancreatic microenvironment. Stem Cells, 30:1664–1674. doi: 10.1002/stem.1132

Francois S., Mouiseddine M., Allenet-Lepage B., Voswinkel J., Douay L., Benderitter M. And Chapel A. (2013) Human mesenchymal stem cells provide protection against radiation-induced liver injury by antioxidative process, vasculature protection, hepatocyte differentiation, and trophic effects. BioMed Research International, 2013:151679. doi: 10.1155/2013/151679

Freeman B.T., Kouris N.A. and Ogle B.M. (2015) Tracking fusion of human mesenchymal stem cells after transplantation to the heart. Stem cells translational medicine, 4(6):685–694. doi: 10.5966/sctm.2014-0198

Fu X., Liu G., Halim A., Ju Y., Luo Q. and Song G. (2019) Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. Cells, 8(8):784. doi: 10.3390/cells8080784

Gnecchi M., Danieli P. and Cervio E. (2012) Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. Vascul. Pharmacol., 57(1):48-55. doi: 10.1016/j.vph.2012.04.002

Hamada H., Kobune M., Nakamura K., Kawano Y., Kato K., Honmou O., Houkin K., Matsunaga T. and Niitsu Y. (2005) Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. Cancer Science, 96(3):149-156. doi: 10.1111/j.1349-7006.2005.00032.x.

Hare J.M. (2009) Translational development of mesenchymal stem cell therapy for cardiovascular diseases. Tex. Heart Inst. J., 36(2):145–147.

Huang Y., Li Q., Zhang K., Hu M., Wang Y., Du L., Lin L., Li S., Sorokin L., Melino G., Shi Y. and Wang Y. (2019) Single cell transcriptomic analysis of human mesenchymal stem cells reveals limited heterogeneity. Cell Death and Disease, 10:368. doi:10.1038/s41419-019-1583-4

Javazon E.H., Beggs K.J. and Flake A.W. (2004) Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging. Experimental Hematology, 32:414–425. doi: 10.1016/j.exphem.2004.02.004

Kalaszczynsk H. and Ferdyn K. (2015) Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells: Future of regenerative medicine? Recent findings and clinical significance. Biomed. Res. Int., 2015:430847. doi: 10.1155/2015/430847

Karaoz E., Demircan P.C., Erman G., Gungorurler E. and Sariboyaci A.E. (2017) Comparative analyses of immunosuppressive characteristics of bone-marrow,

wharton's jelly, and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells. Turk. J. Hematol., 34:213-225. doi: 10.4274/tjh.2016.0171

Kilian K.A., Bugarija B., Lahn B.T. and Mrksich M. (2010) Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. P.N.A.S., 107(11):4872-4877. doi: 10.1073/pnas.0903269107

Kim D.W., Staples M., Shinozuka K., Pantcheva P., Kang S.D. and Borlongan C.V. (2013) Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: Phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. Int. J. Mol. Sci., 14:11692-11712. doi: 10.3390/ijms140611692

Ko I.K. and Kim B.S. (2008) Mesenchymal stem cells for treatment of myocardial infarction. Int. J. Stem Cells, 1(1):49–54. doi: 10.15283/ijsc.2008.1.1.49

Kong Q.F., Sun B., Bai S.S., Zhai D.X., Wang G.Y., Liu Y.M., Zhang S.J., Li R., Zhao W., Sun Y.Y., Li N., Wang Q., Peng H.S., Jin L.H. and Li H.L. (2009) Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF-b. J. Neuroimmunol, 207:83–91. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.12.005

Kyurkchiev D., Bochev I., Ivanova-Todorova E., Mourdjeva M., Oreshkova T., Belemezova K. and Kyurkchiev S. (2014) Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymaltem cells. World J Stem Cells, 6(5):552–570. doi: 10.4252/wjsc.v6.i5.552

Lee H.J., Lee J.K., Lee H., Shin J., Carter J.E., Sakamoto T., Jin H.K. and Bae J. (2010) The therapeutic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease. Neuroscience Letters, 481:30–35. doi: 10.1016/j.neulet.2010.06.045

Lee M.W., Ryu S., Kim D.S., Sung K.W., Koo H.H. and Yoo K.H. (2015) Strategies to improve the immunosuppressive properties of human mesenchymal stem cells Stem Cell Research & Therapy, 6:179-189. doi: 10.1186/s13287-015-0178-y

Li N. and Hua J. (2017) Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. Cell. Mol. Life Sci., 74:2345–2360. doi: 10.1007/s00018-017-2473-5

Liau L.L., Ruszymah B.H.I., Ng M.H. and Law J.X. (2020) Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells. Current Research in Translational Medicine, 68:5-16. doi: 10.1016/j.retram.2019.09.001

Liu Z.J., Zhuge Y. and Velazquez O.C. (2009) Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. J Cell Biochem**,** 106(6):984-991. doi: 10.1002/jcb.22091

Mazzini L., Fagioli F., Boccaletti R., Mareschi K., Oliveri G., Olivieri C., Pastore I., Marasso R. and Madon E. (2003) Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: A methodological approach in humans. Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord., 4(3):158-161. doi: 10.1080/14660820310014653

Montanucci P., Basta G., Pescara T., Pennoni I., Di Giovanni F. and Calafiore R. (2011) New simple and rapid method for purification of mesenchymal stem cells from the human umbilical cord Wharton jelly. Tissue Eng Part A., 17(21-22):2651-61. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0587

Murphy M.B., Moncivais K. and Caplan A.I. (2013) Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. Exp Mol Med., 45:e54. doi: 10.1038/emm.2013.94

Najar M., Rouas R., Raicevic G., Boufker H.I., Lewalle P., Meuleman N., Bron D., Toungouz M., Martiat P. and Lagneaux L. (2009) Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6. Cytotherapy, 11(5):570–583. doi: 10.1080/14653240903079377

Nagamura-Inoue T. and He H. (2014) Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. World J. Stem Cells, 6(2):195–202. doi: 10.4252/wjsc.v6.i2.195

Nekanti U., Rao V.B., Bahirvani A.G., Jan M., Totey S. and Ta M. (2010) Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells And Development, 19(1):117-130. doi: 10.1089/scd.2009.0177

Ozawa K., Sato K., Oh I., Ozaki K., Uchibori R., Obara Y., Kikuchi Y., Ito T., Okada T., Urabe M., Mizukami H. and Kume A. (2008) Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). Journal of Autoimmunity, 30(3):121-127. doi: 10.1016/j.jaut.2007.12.008

Park H.J., Lee P.H., Bang O.Y., Lee G. and Ahn Y.H. (2008) Mesenchymal stem cells therapy exerts neuroprotection in a progressive animal model of Parkinson's disease. J. Neurochem., 107(1):141-151. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05589.x

Ringden O., Uzunel M., Rasmusson I., Remberger M., Sundberg B., Lönnies H., Marschall H.U., Dlugosz A., Szakos A., Hassan Z., Omazic B., Aschan J., Barkholt L. and Blanc K.L. (2006) Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. Transplantation, 81(10):1390-1397. doi: 10.1097/01.tp.0000214462.63943.14

Rizal, Syaidah R., Aqsha Z.M., Josephin A. and Pakpahan V.M. (2021) Characterization, differentiation, and population doubling time of Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) in passage 5 and 8. AIP Conference Proceedings, 2344: 040002. doi: 10.1063/5.0047340

Sareen N., Sequiera G.L., Chaudhary R., Abu-El-Rub E., Chowdhury S.R., Sharma V., Surendran A., Moudgil M., Fernyhough P., Ravandi A. and Dhingra S. (2018) Early passaging of mesenchymal stem cells does not instigate significant modifications in their immunological behavior. Stem Cell Res Ther., 9(1):121. doi: 10.1186/s13287-018-0867-4

Schu S., Nosov M., O'Flynn L., Shaw G., Treacy O., Barry F., Murphy M., O'Brien T. and Ritter T. (2012) Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. J. Cell Mol. Med., 16(9):2094-2103. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01509.x

Siegel G., Schafer R. and Dazzi F. (2009) The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. Transplantation, 87:45-49. doi: 10.1097/TP.0b013e3181a285b0

Sotiropoulou P.A., Perez S.A., Gritzapis A.D., Baxevanis C.N. and Papamichail M. (2006) Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. Stem Cells, 24(1):74-85. doi: 10.1634/stemcells.2004-0359

Spaggiari G.M., Capobianco A., Abdelrazik H., Becchetti F., Mingari M.C. and Moretta L. (2008) Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. Blood, 111(3):1327-1333. doi: 10.1182/blood-2007-02-074997

Tanabe S., Sato Y., Suzuki T., Suzuki K., Nagao T. and Yamaguchi T. (2008) Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for ıdentification of novel markers in early- and late-stage cell culture. J. Biochem., 144:399–408. DOI: 10.1093/jb/mvn082

Tollervey J.R. and Lunyak V.V. (2011) Adult stem cells: simply a tool for regenerative medicine or an additional piece in the puzzle of human aging? Cell Cycle, 10:4173–4176. doi: 10.4161/cc.10.24.18832

Uccelli A., Moretta L. and Pistoia V. (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. Nature Reviews Immunology, 8:726–736. doi: 10.1038/nri2395

Ullah I., Subbarao R.B. and Rho G.J. (2015) Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. Biosci Rep., 35(2):e00191. doi: 10.1042/BSR20150025

Venugopal P., Balasubramanian S., Majumdar A.S. and Ta M. (2011) Isolation, characterization, and gene expression analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions. Stem Cells Cloning, 4: 39–50. doi: 10.2147/SCCAA.S17548

Vija L., Farge D., Gautier J.F., Vexiau P., Dumitrache C., Bourgarit A., Verrecchia F. and Larghero J. (2009) Mesenchymal stem cells: Stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes. Diabetes & Metabolism, 35(2):85–93. doi: 10.1016/j.diabet.2008.10.003

Vodyanik M.A., Yu J., Zhang X., Tian S., Stewart R., Thomson J.A. and Slukvin I.I. (2010) A mesoderm-derived precursor for mesenchymal stem and endothelial cells. Cell Stem Cell, 7(6):718-729. doi: 10.1016/j.stem.2010.11.011

Wagner W., Wein F., Seckinger A., Frankhauser M., Wirkner U., Krause U., Blake J., Schwager C., Eckstein V., Ansorge W. and Ho A.D. (2005) Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. Exp Hematol., 33(11):1402-1416. doi: 10.1016/j.exphem.2005.07.003

Wang H.S., Hung S.C., Peng S.T., Huang C.C., Wei H.M., Guo Y.J., Fu Y.S., Lai M.C. and Chen C.C. (2014) Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells, 22(7):1330-1337. doi: 10.1634/stemcells.2004-0013

Wang M., Yuan Q. and Xie L. (2018) Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: Properties and clinical application. Stem Cells International, 2018:3057624. doi: 10.1155/2018/3057624

Widowati W., Gunanegara R.F., Rizal R., Widodo W.S., Amalia A., Wibowo S.H.B., Handono K., Marlina M., Lister I.N.E. and Chiuman L. (2019) Comparative

analysis of Wharton's jelly mesenchymal stem cell (WJ-MSCs) isolated using explant and enzymatic methods. Journal of Physics: Conference Series, 1374: 012024. doi:10.1088/1742-6596/1374/1/012024

Wiesmann A., Bühring H.J., Mentrup C. and Wiesmann H.P. (2006) Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. Head & Face Medicine, 2:8. doi: 10.1186/1746-160X-2-8

Wong R.S.Y. (2011) Mesenchymal stem cells: Angels or demons? J. Biomed. Biotechnol., 2011:459510. doi: 10.1155/2011/459510

Wu K.H., Chan C.K., Tsai C., Chang Y.H., Sieber M., Chiu T.H., Ho M., Peng C.T., Wu H.P. and Huang J.L. (2011) Effective treatment of severe steroid-resistant acute graft-versus-host disease with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. Transplantation, 91(12):1412-1416. doi: 10.1097/TP.0b013e31821aba18

Wu P.K., Wang J.Y., Chen C.F., Chao K.Y., Chang M.C., Chen W.M. and Hung S.C. (2017) Early passage mesenchymal stem cells display decreased radiosensitivity and increased DNA repair activity. Stem Cells Transl Med., 6(6):1504-1514. doi: 10.1002/sctm.15-0394

Yagi H., Soto-Gutierrez A., Parekkadan B., Kitagawa Y., Tompkins R.G., Kobayashi N. and Yarmush M.L. (2010) Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. Cell Transplantation, 19:667–679. doi: 10.3727/096368910X508762

Yang Y.H.K. (2018) A ging of mesenchymal stem cells: Implication in regenerative medicine. Regen Ther., 9:120–122. doi: 10.1016/j.reth.2018.09.002

Yoo K.H., Jang I.K., Lee M.W., Kim H.E., Yang M.S., Eom Y., Lee J.E., Kim Y.J., Yang S.K., Jung H.L., Sung K.W., Kim C.W. and Koo HH. (2009) Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. Cellular Immunology, 259:150–156. doi: 10.1016/j.cellimm.2009.06.010

Yoon J.H., Roh E.Y., Shin S., Jung N.H., Song E.Y., Chang J.Y., Kim B.J. and Jeon H.W. (2013) Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from Wharton's jelly. BioMed Research International, 2013:428726. doi: 10.1155/2013/428726

ETİK KURUL ONAYI

İSÜ İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ İSTANBUL

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
(2017-KAEK-120)

İSÜ İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ İSTANBUL

Sayı : (2017-KAEK-120) / 2/2021.G-19 **Tarih : 08.02.2021**
Konu : Etik Kurul Kararı hk.

Sayın Prof. Dr. Erdal KARAÖZ,
İstinye Üniversitesi - Kök Hücre Merkezi

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz **"İyi Üretim Uygulamaları Standartlarında Farklı Tekniklerle İzole Edilen Göbek Kordonu Kaynaklı Erken ve Geç Pasaj Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmunofenotipik, Genomik ve İmmunsüpresif Özelliklerinin Karşılaştırılması"** başlıklı araştırma başvurunuz araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak 06.09.2014 tarihli ve 29111 sayılı Resmî Gazete 'de yayımlanan Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği gereğince incelenmiş olup, Klinik Araştırmaları Etik Kurulu'nun 03.02.2021 tarihli toplantısında incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda, çalışmanın yapılması etik ve bilimsel açıdan uygun bulunmuş ve onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.

Araştırmanın Adı	İyi Üretim Uygulamaları Standartlarında Farklı Tekniklerle İzole Edilen Göbek Kordonu Kaynaklı Erken ve Geç Pasaj Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmunofenotipik, Genomik ve İmmunsüpresif Özelliklerinin Karşılaştırılması
Sorumlu Araştırmacı	Prof. Dr. Erdal KARAÖZ
Yardımcı Araştırmacı	Zehragül ERGÜL YÜKSEL
Etik Kurul Karar No	2/2021.K-05

Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof. Dr. Yusuf SARIOĞLU
İstinye Üniversitesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul
Başkanı

İSÜ İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
(2017-KAEK-120)

İSÜ İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ

Bu kapsamda yukarıda ayrıntıları verilen çalışma ile ilgili olarak;

- Gönüllülerden alınan ve ülke dışına çıkarılacak olan numuneler için biyolojik materyal transfer formunda belirtilen şartların yerine getirilmesi,

- Araştırmanın başlamaması, iptali veya sonlandırılması halinde tarafımıza bilgi verilmesi,

- Araştırma süresince ortaya çıkan advers olayların/etkilerin tarafımıza bildirilmesi,

- Araştırmanın Helsinki Bildirgesi'nin son metni, İyi Klinik Uygulamalar İlkeleri ve ilgili mevzuata uygun olarak yürütülmesi,

- Araştırmada kullanılan her türlü araştırma ürününün ve ürünlerin kullanılmasına mahsus her türlü malzeme ile muayene, tetkik, tahlil ve tedavilerin bedeli için gönüllüden herhangi bir ücret talep edilmemesi,

- Araştırmaya ait yıllık bildirim formunun düzenli olarak Etik Kurulumuza gönderilmesi,

- Destekleyicinin yasal temsilcisi olarak yazımızın bir örneğinin destekleyiciye, koordinatör merkez ve ilgili etik kurula iletilmesi hususlarında bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Yusuf SARIOĞLU
İstinye Üniversitesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul
Başkanı

İNTİHAL RAPORU

Zehra Tez 1

ORİJİNALLİK RAPORU

%9	%8	%3	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.istinye.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
2	dergipark.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
3	ikee.lib.auth.gr İnternet Kaynağı	%1
4	www.thd.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	saglikbilimleri.istinye.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	S. Sharif, M. H. Ghahremani, M. Soleimani. "Delivery of Exogenous miR-124 to Glioblastoma Multiform Cells by Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Decreases Cell Proliferation and Migration, and Confers Chemosensitivity", Stem Cell Reviews and Reports, 2017 Yayın	<%1
7	espace.library.uq.edu.au İnternet Kaynağı	<%1