İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KORDON KANINDAN ELDE EDİLEN KÖK HÜCRELERİN DİFERANSİYASYONU, MOLEKÜLER VE BİYOKİMYASAL ANALİZLERİ

İdil ÇETİN
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Programı

Danışman
Yard. Doç. Dr. Mehmet Rıfkı TOPÇUL

Haziran, 2011

İSTANBUL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KORDON KANINDAN ELDE EDİLEN KÖK HÜCRELERİN DİFERANSİYASYONU, MOLEKÜLER VE BİYOKİMYASAL ANALİZLERİ

İdil ÇETİN
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Programı

Danışman
Yard. Doç. Dr. Mehmet Rıfkı TOPÇUL

Haziran, 2011

İSTANBUL

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 8783 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Son yıllarda kök hücre araştırmaları, bu hücrelerin sayısız hastalığı tedavi edebilme potansiyellerinden dolayı çok fazla araştırmacının dikkatini çekmektedir. Ben de bilim hayatıma böyle bir konu ile başlamanın ve aynı zamanda İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi'nde ilk kez bu çalışmayı gerçekleştirebilmiş olmanın bilincini, sorumluluğunu ve gururunu taşıyorum.

Bu zorlu süreçte bilgi ve deneyimleri ile bana her konuda ışık tutan, iyi bir bilim insanı olmayı öğreten, sonsuz sabrı, ilgisi ve desteği ile her zaman yanımda olan, öğrencisi olmaktan büyük bir gurur ve mutluluk duyduğum ve hayatımda doldurulamaz bir yeri olan çok sevgili danışman hocam Sayın **Yard. Doç. Dr. Mehmet TOPÇUL**'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmam sırasında göbek kordonu kanı alınmasında yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın **Doç. Dr. Altay GEZER**'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince sevgilerini ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim anneme ve babama çok teşekkür ediyorum.

İstanbul, Haziran, 2011 **İdil ÇETİN**

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... **i**

İÇİNDEKİLER ..... **ii**

ŞEKİL LİSTESİ ..... **v**

TABLO LİSTESİ ..... **vi**

SEMBOL LİSTESİ ..... **vii**

ÖZET ..... **ix**

SUMMARY ..... **x**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL KISIMLAR **4**

2.1. KÖK HÜCRELERİN KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ **4**

2.1.1. Uzun Süre Bölünebilme ve Kendini Yenileme **5**

2.1.2. Klonlaşma **7**

2.1.3. Farklılaşma **8**

2.1.3.1.Totipotensi **8**

2.1.3.2.Pluripotensi **9**

2.1.3.3.Multipotensi **10**

2.1.3.3.Unipotensi **10**

2.2. KAYNAKLARINA GÖRE KÖK HÜCRE ÇEŞİTLERİ **11**

2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler **11**

2.2.2. Erişkin Kök Hücreler **14**

2.2.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler **15**

2.2.2.2. Hematopoietik Kök Hücreler **20**

2.2.3. Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Kök Hücrelerin Özellikleri……...23

2.2.3.1. Dokulardan Elde Edilen Kök Hücreler……..……..……. **23**

3. MALZEME VE YÖNTEM……..…….38

3.1. KULLANILAN HÜCRELERİN ELDE EDİLMESİ VE HÜCRE KÜLTÜRÜ…….…….....……. 38

3.1.1. Göbek Kordonu İçin Taşıma Ortamı Hazırlanması……. 38

3.1.2. Etik Kurul Onayı Alınması……..38

3.1.3. Göbek Kordon Kanından Mononuklear Kök Hücrelerin İzolasyonu…38

3.1.4. Hücrelerin Kültüre Alınması……...40

3.1.5. Mononuklear Hücrelerin Kültüründe Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması..... 40

3.1.5.1. RPMI-1640……..…….. **40**

3.1.5.2. DMEM……..……..... **40**

3.1.6. Mononuklear Hücrelerin Kültüründe Kullanılan Serumların Hazırlanması……... 40

3.1.7. Hücre Kültürünün Tripsinizasyonu……..……. 41

3.1.8. İzole Edilen Mononuklear Hücrelerin Tripan Mavisi ile Canlılık Testi. 41

3.1.8.1. Tripan Mavisi (TM) İle Canlı Hücrelerin Sayılması……**41**

3.1.9. İnvert ve Işık Mikroskobu İncelemeleri……. 41

3.1.10. Hücre Kinetiği Parametresi Analizi (Çoğalma Hızı)……...41

3.1.11. İstatistiksel Analiz……...42

3.1.12. İnsan Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücre Kültürünün Flow Sitometrik Analizi……...42

4. BULGULAR……...61

4.1. İNVERT VE IŞIK MİKROSKOBU İNCELEMELERİ……..44

4.2. HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRESİ ANALİZİ (ÇOĞALMA HIZI)……. 50

4.3. FLOW SİTOMETRİK ANALİZ…… 50

5. TARTIŞMA VE SONUÇ…….. 63

KAYNAKLAR……... 60

EKLER……... 73

ÖZGEÇMİŞ……... 75

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 : Kök hücrelerin genel özellikleri……..……..……..……. **5**
Şekil 2. 2 : Mezenkimal kök hücrelerin özellikleri……..…..……...…….**17**
Şekil 2. 3 : Multipotent özelliğe sahip hematopoietik kök hücrelerin farklı hücre tiplerini oluşturma şekilleri…….……..……..…….…….. **21**
Şekil 2. 4 : Kordon kanı kök hücrelerinin *in vitro* şartlarda farklılaşma özelliği.....**35**
Şekil 3. 1 : Yoğunluk farkıyla kordon kanından mononuklear hücrelerin izolasyonu……**39**
Şekil 3. 2 : İnsan kordon kanı mezenkimal kök hücre kültürünün Flow Sitometrik ölçüm için hazırlanması…….....**43**
Şekil 4. 1 : 1. donöre ait insan kordon kanı hücrelerinin RPMI-1640 + % 20 FBS ile kültüre edilmesinden sonraki 96. saatte ekilen hücrelerin sonraki 72. saatte invert faz mikroskobundaki görünümleri (x200)……..…….. **44**
Şekil 4. 2 : 1. donöre ait insan kordon kanı hücrelerinin DMEM + % 20 FBS ile kültüre edilmesinden sonraki 96. saatte ekilen hücrelerin sonraki 72. saatteki invert faz mikroskobundaki görünümleri (x200)…….**45**
Şekil 4. 3 : 2. donöre ait insan kordon kanı hücrelerinin kültüre edilmesinden sonraki 30. günde yüzeye tutunma özelliklerini kaybetmeye başlayan hücrelerin invert faz mikroskobundaki görüntüleri (x200)..…….... **46**
Şekil 4. 4 : 2. donöre ait insan kordon kanı hücrelerinin kültüre edilmesinden sonraki 33. günde tutunma özelliklerini tamamen kaybederek bozulan hücrelerin invert faz mikroskobundaki görüntüleri (x200).……..…...…….**46**
Şekil 4. 5 : 3. donöre ait insan kordon kanı hücrelerinin kültüre edilmesinden sonraki 7. günde yüzeye tutunan hücrelerin invert faz mikroskobundaki görüntüleri (x200)……..…….....**47**
Şekil 4. 6 : 4. donöre ait insan kordon kanı hücrelerinin kültüre edilmesinden sonraki 10. günde yüzeye tutunan fibroblast morfolojisindeki hücrelerin ışık mikroskobu görüntüsü (x 1000; Giemsa)..... **48**
Şekil 4. 7 : 5. donöre ait insan kordon kanı hücrelerinin kültüre edilmesinden sonraki ilk pasaj sonrası fibroblast morfolojisindeki hücrelerin ışık mikroskobu görüntüsü (x 1000; Giemsa)…….. **49**
Şekil 4. 8 : 5. donöre ait insan kordon kanı hücrelerinin kültüre edilmesinden sonraki beşinci pasaj sonrası fibroblast morfolojisindeki hücrelerin ışık mikroskobu görüntüsü (x 1000; Giemsa).…….…… **49**
Şekil 4. 9 : DMEM + % 20 FBS içeren kültür ortamında insan kordon kanı mezenkimal kök hücre oranı (Mononuklear hücre izolasyonu sonrası 7. gün)……..…..**51**

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1: İnsan kordon kanı hücrelerinin RPMI-1640+% 20 FBS ve DMEM+% 20 FBS ile kültüre edilmesinden sonraki 96. saatte ekilen hücre sayılarının zamana göre değişimi (± SD)**……...……..…… 50**

SEMBOL LİSTESİ

AB : Avrupa Birliği
ANT : Değiştirilmiş Nuklear Transfer
BMP-6 : Kemik Morfogenetik Protein 6
CE : Kirpikli Ependimal
CFU-F : Fibroblast Kolonisi Yapan Üniteler
DG : Dentat Girus
EC : Embriyonal Karsinoma
EG : Embriyonik Germ
EKH : Embriyonik Kök Hücreler
FACS : Floresan Aktif Hücre Sıralaması
G-CSF : Granülosit Koloni Stimule Edici Faktör
GFAP : Gliyal Fibriller Asidik Protein
GKK : Göbek Kordon Kanı
GM-CSF : Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
GVHD : Graft Versus Host Hastalığı
HGF : Hepatosit Büyüme Faktörü
HKH : Hematopoietik Kök Hücreler
IFNγ : Proinflamatuar Sitokin İnterferon-γ
IL : İnterlökin
INF-γ : İnterferon-γ
ISCT : Uluslararası Hücre Tedavileri Topluluğu
İHK : İç Hücre Kitlesi
iEKH : İnsan Embriyonik Kök Hücresi
iMKH : İnsan Mezenkimal Kök Hücreleri
iPSC : İndüklenen Pluripotent Kök Hücreler
Kİ : Kemik iliği
KKH : Kanser Kök Hücresi
KKKH : Kordon Kanı Kök Hücreleri
MAPC : Multipotent Erişkin Progenitör Hücreler
M-CSF : Macrophage-Colony Stimulating Factor
MIAMI : Multilineage Uyarılabilir Kök Hücre
MPH : Mezenkimal Progenitör Hücreler
MSS : Merkezi Sinir Sisitemi
MKH : Mezenkimal Kök Hücreler
NKH : Nöral Kök Hücreler
PGD : Preimplantasyon Genetik Tanı
PK : Periferik Kan
PLA : Processed Lipoaspirate (İşlenmiş Lipoaspire Hücreler)
SCNT : Somatik Hücre Nuklear Transferi
SDF-1 : Stromal Kökenli Faktör-1
SEZ : Subependimal Bölge
SG : Subgranüler Zon

SVZ : Subventriküler Zon
TNFα : Tümor Nekroz Faktör-α
VSEL : Çok Küçük Embriyonik Hücre Benzeri Kök Hücreler
WJ : Wharton Jeli

ÖZET

KORDON KANINDAN ELDE EDİLEN KÖK HÜCRELERİN DİFERANSİYASYONU, MOLEKÜLER VE BİYOKİMYASAL ANALİZLERİ

Kök hücre kavramı, bilim dünyasında özellikle farklı hastalıkların tedavisinde geniş spektrumda bir umut ışığı yaratması nedeniyle geniş yankı bulmuştur. Çeşitli hastalıkların kök hücrelerle tedavi yöntemlerinin kullanım sınırlarının belirlenmesi birçok araştırıcı gibi bizim de ilgimizi çekmiştir ve böyle bir tez konusu planlamamıza yol açmıştır.

Canlı organizmalarda kök hücreler, embriyonik, fetal ve erişkin dokular içerisinde kendilerini yenileme ve farklılaşma yetenekleri bulunan en ilkel, özelleşmemiş hücrelerdir. Kök hücreler bu özellikleri sayesinde sayılarını sabit tutarlar ve gerekli olduğunda içinde bulundukları dokuların hücrelerine diferansiye olabilirler.

Kök hücreler, diferansiyasyon yeteneklerine göre sınıflandırılırlar. Zigot ve erken blastomerler ekstraembriyonik hücre hatlarını da içeren bütün bir organizmayı oluşturan *totipotent* hücrelerdir. *Pluripotent* bir kök hücre, üç germ tabakasına ait bütün hücreleri meydana getirebilmekte, fakat ekstraembriyonik trofoblastı oluşturamamaktadır. Daha sınırlı olan *multipotent* kök hücreler, sadece spesifik dokuların hücrelerini meydana getirebilmektedir.

Kök hücreler çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedir. Bu kaynaklardan biri de göbek kordon kanıdır. Günümüzde göbek kordon kanı (GKK) kök hücre (KH) çalışmalarına ilgi giderek artmaktadır. Bunun nedeni, GKK'nın, kemik iliği (Kİ), periferik kan (PK) ve yağ dokusu ile kıyaslandığında daha genç hücreleri içermesi, yaşayabilme yeteneklerinin yüksek olması gibi özelliklere sahip olmasıdır.

Planlanan tez çalışmasında insan göbek kordon kanından izole edilen hücrelerin, kök hücre olduğunun saptanması, bu hücrelerin *in vitro*'da farklı ortamlarında yetiştirilerek, ortam şartlarına adaptasyonlarının belirlenmesi, kültür ortamında sürekliliğinin sağlanması amaçlanmıştır.

SUMMARY

MOLECULAR AND BIOCHEMICAL ANALYSIS, DIFFERANTIATION OF STEM CELLS DERIVED FROM CORD BLOOD.

The concept of stem cell has found a wide application due to creating a glimmer of hope at wide spectrum in the scientific world especially in the treatment of various diseases. Determining of the boundaries of the treatment methods of various diseases using stem cells have attracted our attention like many other researchers and also have led to planning such a thesis thopic.

In living organisms, stem cells which have self-renewing and differentiation are the most primitive, unspecialized cells in embryonic, fetal or adult tissues. Stem cells with these properties keep their numbers constant and can differentiate in need into specific cells of the tissues where they located.

Stem cells are classified according to their differentiation potential. The zygote and early blastomeres are *totipotent* stem cells that make up a full organism including extraembryonic lineages. A *pluripotent* stem cell can generate all cells of the three germ layers, but not the extraembryonic trophoblast. The more restricted *multipotent* stem cells only give rise to cells of a specific tissues.

Stem cells can be obtained from various sources. One of these sources is also umbilical cord blood. The very promising features of cord blood stem cell studies have been attracting more and more interest nowadays. Compared to the well-known stem cell sources such as bone marrow, peripheral blood and adipose tissue, cord blood consists of younger cells with a higher survival ability.

In the planned thesis study, it is aimed to determine stem cells isolated from umbilical cord blood, to grow these cells *in vitro* in different conditions, to determine adaptation of these different conditions and ensure continity of the culture media.

1. GİRİŞ

Bilim, doğası gereği yapılan yeni araştırmalar ile var olan bilgilerin üzerine yenilerini inşa etmekte ve yeni keşifler ile de yeni gerçeklerin ve prensiplerin ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Bilim tarihinde en çok ses getiren keşiflerden biri kök hücrelerin tanımlanması ve izole edilmesidir. Çünkü kök hücreler, diğer hücreler ile karşılaştırıldığında benzersiz özelliklere sahiptir ve bu özellikleri sayesinde hem temel biyolojik hem de klinik araştırmalar için oldukça çekici modeller haline gelmiştir.

Kök hücreler bölünerek kendini yenileyebilen ve özelleşmiş fonksiyonel hücrelere farklılaşma (diferansiyasyon) yeteneği olan farklılaşmamış hücrelerdir [1]. Kök hücreler, geniş rejenerasyon potansiyeli ve fonksiyonel olarak birden çok hücre soyuna farklılaşma kapasiteleri ile doku mühendisliği, hücresel tedavi ve ilaç taraması gibi birçok uygulama için çok çekici hale gelmiştir [2].

Kök hücreler, kaynakları ne olursa olsun üç temel kritere göre tanımlanmaktadır. Bunlardan birincisi kök hücre havuzunun devam ettirilebilmesini sağlamak amacıyla gerekli olan farklı tipteki hücre bölünmeleri ile uzun süre bölünebilme ve kendini yenileme yeteneğidir. İkincisi; tek hücre seviyesinde genel olarak birden çok soyda diferansiye olmuş hücreler meydana getirebilme yeteneğidir. Üçüncü kriter ise *in vivo*'da belirli bir dokuyu fonksiyonel olarak yeniden yapılandırabilme yeteneğidir [3, 4].

Kök hücrelerin, çok hücreli organizmaların kökeni ile ilgili temel hücresel birimler olarak organ dokularının hücresel homeostasi'sinin korunmasında işlevsel olduğu görülmektedir. Kök hücrelerin, onları diğer hücrelerden ayıran karakteristik özellikleri, kök hücre araştırmalarının etkileyici konularını oluşturmaktadır. Sessizliğin korunması, kendini yenileme kapasitesi ve farklılaşma potansiyeli gibi kök hücrelerin önemli özellikleri gelişimsel biyoloji ve tıp alanındaki araştırmaların ortak bir çerçevesini oluşturmaktadır [5].

Kök hücrelerin kullanıldığı kemik iliği ve göbek kordonu kanı transplantasyonu, kemik iliği bozuklukları ve kanser gibi bir grup hastalıkta kullanılan standart tedavidir. Ayrıca yetişkin kök hücrelerin kullanıldığı devam eden bir dizi klinik çalışma diğer terapötik potansiyelleri de araştırmaktadır. Kök hücreler şu anda insanlar için ilaç olarak bir ölçüde kullanılmakta olmasına karşın, kök hücrelerin gelecekte insan hastalıklarının büyük bir kısmının tedavisinde kullanılabileceği umudu bulunmaktadır. Bu durum, özellikle spesifik bir hücre tipinin tamamen eksikliğinin veya yetersiz sayıda oluşunun neden olduğu hastalıklar için doğru olabilmektedir [6].

Kök hücreler vücudun yapı taşları oldukları ve vücudumuzu meydana getiren hücrelerden herhangi birine dönüşebilme yeteneğine sahip oldukları için kanser, diyabet, genetik hastalıklar, graft versus host hastalığı (GVHD), göz, kalp ve karaciğer hastalıkları, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar ile özellikle Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar, serebral felçler ile travmatik beyin ve omurilik yaralanmaları gibi nörolojik hastalık ve yaralanmaların dahil olduğu çok çeşitli hastalıkların tedavisi için büyük umut vaat etmektedirler. Bu nedenle kök hücre araştırmaları, vücudun fizyoloji ve patolojisinin anlaşılabilmesi ile çeşitli hastalıkların tedavisi için son derece önemlidir [7].

Kök hücre üzerine yapılan çalışmalar, hücrelerin yeterli sayıda ve saf bir şekilde elde edilmesindeki etik ve biyolojik zorluklardan dolayı geçmişte çeşitli engellerle karşılaşmıştır. Şu anda devam eden kök hücre araştırmaları tıp alanında büyük bir dönüm noktası olacak bir devrimin eşiğindedir. Kök hücre biyolojisinin ve kök hücrelerin farklı özelliklerinin biyolojik davranışlarını kontrol eden bileşenlerin anlaşılmasındaki dev adımlar rejeneratif hayat süreçlerine doğrudan müdahale edebilmeyi ve kansere karşı savaşta yeni alanların açılmasını olası hale getirmiştir [8].

Erişkin kaynaklardan kök hücre elde edilmesinde de çeşitli zorluklar bulunmaktadır. En çok kullanılan kök hücre kaynaklarından olan kemik iliğinin elde edilmesinde hasta açısından zorluklar olması, bu kök hücre kaynağının kullanımını sınırlamaktadır [9]. Bir diğer erişkin kök hücre kaynağı ise adipoz dokudur. Adipoz dokunun alınması bir dizi cerrahi işlem gerektirdiğinden, izolasyonda da çeşitli problemlere neden olmaktadır [10, 11]. Ayrıca, erişkin dokulardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin, donörün yaşı ve

sağlık durumu gibi fizyolojik şartlarının değişken olması nedeniyle, adipoz doku gibi erişkin kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin *in vitro* gelişimi ve farklılaşma potansiyelleri de değişken olmaktadır [11]. Oysa ki, bir ameliyat atığı olan kordon kanı, donöre zarar verme riski taşımayan, özellikle ülkemiz gibi genç nüfusu olan ve doğum oranı yüksek ülkelerde, elde edilmesi kolay ve çok bulunan bir kök hücre kaynağıdır. Kordon kanı, kolay elde edilmesinin yanında kemik iliği ile karşılaştırıldığında düşük viral kontaminasyon oranına sahiptir [12].

Yapılan birçok çalışmada, bir mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kordon kanından elde edilen mezenkimal kök hücrelerinin yağ, kemik, kıkırdak, sinir hatta karaciğer hücrelerine farklılaşabildikleri gösterilmiştir [13]. Ancak tüm bu avantajlarına rağmen göbek kordon kanı kök hücrelerinin izolasyonunda ve kültür ortamına adaptasyonunda halen çeşitli zorluklar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda farklı izolasyon ve kültür koşul parametreleri denenmiş olmasına rağmen, başarılı bir kordon kanı mezenkimal kök hücre kültürünün elde edilmesi ancak 1/15 (~% 6,6) oranında sağlanmıştır [14, 15]. Klinik kullanım potansiyeline sahip bir diğer kök hücre kaynağı olan periferik kan, aferezi kolay ve istenildiği zaman hastadan elde edilmesi mümkün bir kök hücre kaynağı olması nedeniyle günümüzde kemik iliğine alternatif olarak kullanımına yönelik yoğun çalışmalar başlatılmıştır. Allojenik transplantasyonlarda GVHD yanıtı ve tümör oluşturma riski nedeniyle kök hücre tedavilerinde kullanımı sınırlı olmasına rağmen, kök hücrelerin kültürü ve farklılaşma potansiyellerinin incelenmesi çalışmalarında kullanım için uygun bir kaynaktır [16]. Kordon kanından izole edilen mezenkimal kök hücrelerin sınırlı olması, ayrıca kültürünün yapılmasına ve adaptasyonuna etki eden çeşitli faktörlerin yeteri kadar bilinmemesi, kordon kanı mezenkimal kök hücre kültürünün ancak dünyanın az sayıda laboratuvarında yapılmasına neden olmuştur.

Planlanan bu tez çalışmasında insan göbek kordon kanından izole edilen hücrelerin, kök hücre olduğunun saptanması, bu hücrelerin *in vitro*'da farklı ortamlarda yetiştirilerek, ortam şartlarına adaptasyonlarının belirlenmesi, kültür ortamında sürekliliğinin sağlanması amaçlanmıştır.

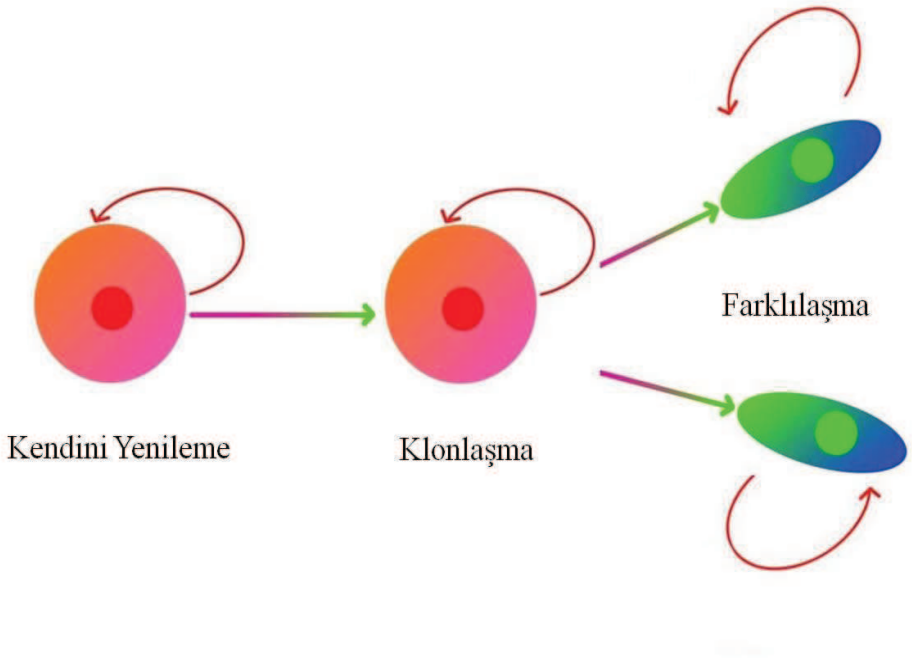
2. GENEL KISIMLAR

2.1. KÖK HÜCRELERİN KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ

Kök hücreler organizmayı oluşturan ve organizmanın yaşamı boyunca birçok hücre tipine farklılaşabilme, kendini yenileyebilme ve çoğalabilme yeteneğine sahip özel hücrelerdir [17, 18]. Uygun koşullar altında çeşitli doku ve organları oluşturan farklı hücrelere farklılaşma özelliğine sahip olan kök hücreler, bu özellikleri ile günümüzde tıbbın birçok alanında ve doku mühendisliği çalışmalarında yoğun şekilde kullanılmaktadır. Farklı hücre türlerine dönüşebilme potansiyeli olan kök hücrelere olan ilginin nedeni, ileride bu hücrelerin laboratuvar ortamında istenilen hücre türüne dönüştürülebilmesiyle, vücutta hasar görmüş doku veya organların hücresel tedavisinde uygulanabilmesinin ümit verici olmasıdır [19]. Kök hücrelerin bu özellikleri, birçok araştırmacının ilgisini çekmiş ve kemik iliği başta olmak üzere, farklı kök hücre kaynaklarını kullanarak yapılan araştırmalar ve uygulamalar sonucu, "rejeneratif tıp" kavramı gelişmiştir [20]. Kök hücrelerin eşsiz işlevlerinin sürdürülmesi için, hücrelerin gelişebileceği optimum koşulların sağlanması ve tıbbi uygulamalarda kullanılmak üzere organizmada hasar ve red oluşturmayacak koşullarda üretilmeleri gerekmektedir [21].

Elde edildikleri kaynaklara göre farklı farklılaşma potansiyellerine sahip olan kök hücreler ile yapılan çalışmalar, hücrelerin elde edildiği kaynaklar ve kullanım alanları, birçok tartışmayı da beraberinde getirmiştir [22]. En çok tartışılan kök hücre olan embriyonik kök hücreler, farklı hücre hatlarına farklılaşma potansiyeli açısından avantajlı olmalarına rağmen, etik sorunlar ve donör sağlığı açısından oluşturduğu tehlikeler sebebiyle bazı çalışmalarda tercih edilmemektedirler [23]. Göbek kordon kanından elde edilen kök hücreler ise, farklılaşma potansiyeli ve birim hacimdeki kök hücre sayısı açısından avantajlı olmalarının yanında, kemik iliği, embriyo ve yağ dokusu ile kıyaslandığında donör sağlığı, donör sayısı ve etik tartışmalara bağlı sorunlar açısından da en uygun kaynaklardan biridir [24].

Kök hücreler, kendini yenileme, klonlaşarak kendi kopyasını oluşturabilme ve farklı hücre hatlarına farklılaşabilme yeteneğine sahip özel hücrelerdir [25]. Bu üç özelliğin tümüne (kendini yenileme, klonlaşma, farklılaşma) sahip olan bir hücre, kök hücre olarak tanımlanabilmektedir (Şekil 2. 1).



Şekil 2. 1: Kök hücrelerin genel özellikleri.

2.1.1. Uzun Süre Bölünebilme ve Kendini Yenileme

Kök hücrelerin temel özelliklerinden biri olan kendini yenileme terimi, hücrenin çoğalma yeteneğini belirtmektedir. Kök hücreler bu yönden ölümsüz, sürekli ve sınırsız bölünme yeteneğine sahip hücrelerdir. Bunun yanında, Houck ve arkadaşlarının yaptığı *in vitro* çalışmalarda, kök hücrelerden farklı olarak, somatik hücrelerin en fazla 80 kez bölünebildiği ve daha sonra bu hücrelerin yaşlanması sonucunda replikasyonlarının azaldığı gösterilmiştir [26].

Kök hücrelerin uzun süre bölünebilmesini belirleyen faktörlerden birisi telomer denilen yapılardır [3]. 1930'larda Dr. Barbara McClintock, daha sonra Columbia'daki Missouri Üniversitesi ve Dr. H. J. Muller, ardından da İskoçya'daki Edinburgh Üniversitesi, birbirlerinden bağımsız olarak kromozomların uçlarında özel dengelenmiş yapılar

bulunduğunu bildirmişlerdir [27]. Telomer olarak adlandırılan bu yapılar kromozomların uçlarında bulunarak onları bozulma ve rekombinasyon aktivitelerinden koruyan ribonukleoprotein heterokromatik yapılardır. Telomerler, shelterin olarak adlandırılan 6 protein kompleksine bağlı TTAGGG ardışık dizi tekrarlarından oluşmaktadır [28]. Bu protein kompleksi kromozom uçlarını korumaktadır. TRF1, TRF2 ve POT1 olarak adlandırılan üç shelterin alt birimi doğrudan TTAGGG tekrarlarını tanımaktadır. Bunlar; TIN2, TPP1 ve Rap1 olarak adlandırılan üç ek shelterin proteini tarafından birbirlerine bağlanmaktadır. Birbirine bağlanan bu proteinler, telomerlerin DNA hasar bölgelerinden ayırt edilebilmesine izin veren bir kompleks oluşturmaktadır [29]. Shelterin, hücrelere, doğal kromozom uçlarının DNA kırıklarından ayrılmasına olanak sağlamakta, DNA tamir reaksiyonunu baskılamakta ve telomeraz temelli telomer uzunluğunun devam ettirilmesini düzenlemektedir. Shelterin'in bileşenleri spesifik olarak telomerlerde lokalize olmuştur, hücre siklusu boyunca telomerlerde bol miktarda bulunmaktadırlar. Nukleus'tan başka bir yerde işlev görmemektedirler [30]. Shelterin'in koruyucu etkisi olmaksızın telomerler, DNA hasar gözetiminden daha fazla gizlenememekte ve kromozom uçları DNA tamir yolakları tarafından uygun olmayan şekillerde işlenmektedir [29].

Telomeraz, telomerlerin devam ettirilmelerinden sorumlu olan bir enzimdir, fakat çoğu somatik hücrede bulunmamaktadır. Bu gerçek; telomeraz aktivitesinin embriyonik kök hücreler ve kanser hücreleri gibi diferansiye olmamış yüksek derecede prolifere olan hücreler ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir [31].

Telomeraz aktivitesinin düşük seviyeleri ise hematopoietik kök hücreler ile nöronal, deri, intestinal kript, meme epiteli, pankreas, adrenal korteks, böbrek ve mezenkimal kök hücreler gibi hematopoietik olmayan kök hücreleri içeren yetişkin kök hücrelerinde gösterilmiştir [32].

Kök hücreleri tanımlamak için uzun süre bölünebilme ile birlikte kullanılan kendini yenileme yeteneği; hücre bölünmesi yoluyla ana hücreye identik olan bir veya iki yavru hücre meydana getirme sürecidir. Daha doğrusu, epigenetik modifikasyonların da dahil olduğu tüm genomun kopyalanmasıdır. Gerçekte kendini yenileme davranışı, fonksiyonel olarak ana hücreye eşit olan bir veya iki yavru hücre üreten bir hücre

bölünmesidir [33]. Kök hücreler, kök hücre havuzunu arttırmak ve devam ettirmek için simetrik ve asimetrik hücre bölünmeleri geçirmektedir. Simetrik hücre bölünmesi sonucu meydana gelen yavrulardan her ikisi de kök hücre karakteristiklerini devam ettirmektedir. Simetrik hücre bölünmesi yoluyla kendini yenileme çoğunlukla vücut boyutunu arttırmak için erken embriyonik dönem süresince görülen geçici kök hücrelerde gözlenmekle birlikte [34] kök hücre havuzunda büyük bir kaybın olduğu durumlarda veya az sayıda kök hücrenin transplantasyonunun ardından tüm kök hücre populasyonunun yeniden şekillendirilebilmesi için nadiren post-natal olarak da meydana gelebilmektedir [35]. Kök hücrelerin simetrik hücre bölünmeleri ile kendilerini yenilemeleri simetrik kendini yenileme olarak adlandırılmaktadır [33]. Asimetrik hücre bölünmesi sonucunda meydana gelen yavru hücrelerden biri kök hücre karakteristiklerini korurken diğeri farklılaşma sürecine başlayacak olan progenitör hücredir [36]. Asimetrik hücre bölünmesi yoluyla kendini yenileme ise çoğunlukla belirlenmiş vücut planının homeostasi'sinin devam ettirilebilmesi için gelişimin daha sonraki aşamaları süresince embriyolarda ve yetişkinlerde görülen kalıcı kök hücrelerde gözlenmektedir [34]. Kök hücrelerin asimetrik hücre bölünmeleri ile kendilerini yenilemeleri asimetrik kendini yenileme olarak adlandırılmaktadır [33].

Asimetrik hücre bölünmesi sonucunda meydana gelen yavru hücrelerin fenotiplerindeki asimetri teorik olarak iki farklı mekanizma ile oluşabilmektedir. Bunlardan ilki; sitoplazma içerisinde meydana gelen yönlendirilmiş veya rastgele olaylar sonucunda sitoplazmik içeriğin asimetrik bölünmesi ve dolayısıyla farklı hücre fenotiplerinin oluşmasıdır. Buna alternatif bir mekanizma; hücre bölünmesi sırasında birbirinin aynı olan yavru hücrelerin oluşması ve daha sonra hücrelerden sadece birini farklılaşmaya yönlendiren dışsal işaretlere cevap verilmesidir. Bu durum, birbirinin aynı olan yavru hücrelerin farklı işaretler almalarını sağlayan bir mikroçevre içerisinde konumlandıklarını ve bunun sonucunda iki farklı fenotipin meydana geldiğini göstermektedir [5].

2.1.2. Klonlaşma

Klonlaşma; bir hücrenin aynı yapıya sahip birden fazla hücreyi üretme kapasitesi olarak tanımlanmaktadır. Klonlaşma özelliği hücrelere, kendi özelliklerine sahip yeni hücreler üretebilme yeteneği kazandırmakta, böylece hücrelerin homojen hücre grupları

oluşturabilmelerini sağlamaktadır. Sonuçta tamamen aynı hücresel ve genetik yapıya sahip olan hücrelerden bir hücre hattı oluşturulabilmektedir [37].

2.1.3. Farklılaşma

Kök hücreleri tanımlamak için kullanılan bir diğer kriter; özelleşmemiş kök hücrelerin, genellikle meydana gelen iki yavru hücreden birinin hücre içindeki ve dışındaki sinyallerin etkisi altında (hücrenin içsel ve dışsal faktörleri) farklılaşmaya uğradığı asimetrik bölünmeler yoluyla özelleşmiş hücreler meydana getirmesidir [38].

Kök hücreler, organizmada ihtiyaç duyulduğunda farklı hücrelere dönüşebilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Ancak, her kök hücre türü, elde edildiği kaynağa bağlı olarak farklı farklılaşma potansiyeline sahiptir. Kök hücreler, farklı sinyaller verildiğinde bu özellikleri *in vitro* koşullarda da gösterebilmektedir. Erişkin kaynaklardan elde edilen kök hücrelerle, embriyonik ve fetüs kaynaklı kök hücrelerin sahip olduğu yetenekler birbirinden farklıdır. Bu nedenle kök hücrelerin işlevlerini tanımlamada, hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir [39].

İnsan gelişimi, gelişimsel potansiyelin kademeli kaybının olduğu tek yönlü bir süreçtir [40]. Tek bir spermin oositin zona pelusidasına penetre olarak onu fertilize etmesi sonucu her iki ebeveynde de var olan genetik materyali içeren tek hücreli bir embriyo olan zigotun oluşumu ile başlamakta ve insan vücudunda bulunan yaklaşık 220 hücre tipinin meydana gelişi ile son bulmaktadır.

Elde edildikleri kaynağa bağlı olarak ve gelişimsel potansiyellerine göre kök hücreler, totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak adlandırılan 4 farklı farklılaşma potansiyeli göstermektedirler [39].

2.1.3.1. Totipotensi

Gelişimsel potansiyelin ilk seviyesi totipotensidir. Totipotensi terimi Latince kökenli olan “tam, bölünmemiş” anlamına gelen “Totus” ile “güç, potansiyel” anlamına gelen “Potentia” kelimelerinin birleşiminden meydana gelmiş olup her şeyi yapabilen anlamına gelmektedir.

Bir insanın gelişimi, zigot olarak adlandırılan tek hücreli embriyoyu oluşturmak üzere bir yumurtanın bir sperm tarafından fertilize edilmesi ile başlamaktadır. Zigot, yaşayan bir organizmayı meydana getiren tüm özelleşmiş hücrelere sahip bir embriyoya gelişim potansiyeline sahip olmakla birlikte uterus içerisinde fetüsün gelişimi için gerekli olan göbek kordonu, amniyon kesesi, Wharton jeli ve plasenta gibi ekstraembriyonik yapıları da meydana getirebilmektedir. Zigot için geçerli olan bu durum, erken embriyonik dönem olarak adlandırılan, embriyonun 5. gününe kadar ki tüm blastomerler için de geçerlidir. Totipotensi deneysel olarak preimplantasyon embriyosundan tek bir blastomerin izolasyonu ve daha sonra bu blastomerin uygun bir alıcıya transferinin ardından canlı bir doğumu destekleme yeteneği takip edilerek kanıtlanmaktadır. Zigot, çeşitli bölünmeler geçirerek fetal aşamalara gelişmeye devam ederken totipotensi özelliğini kaybedip daha sınırlı gelişimsel potansiyellere sahip olan pluripotent ve multipotent hücreleri meydana getirmektedir [8, 38, 41, 42].

2.1.3.2. Pluripotensi

Gelişimsel potansiyelin ikinci seviyesi pluripotensidir. Pluripotensi terimi Latince "çeşitli, çok" anlamına gelen "Plures" ve "güç, potansiyel" anlamına gelen "Potentia" kelimelerinin birleşiminden meydana gelmiştir.

Hücre biyolojisinde pluripotensi, üç germ tabakasına ait (endodermal, mezodermal ve ektodermal tabaka) 200+ hücre tipine farklılaşma potansiyeline sahip olan bir kök hücreyi ifade etmektedir. Yani pluripotent kök hücreler, herhangi bir fetal veya yetişkin hücre tipini meydana getirebilmektedir. Bu eşsiz farklılaşma özelliğine sahip olmalarına rağmen pluripotent hücreler, işlev gören bir organizmayı oluşturabilecek yeteneğe sahip değildirler. Pluripotent kök hücreler birçok farklı hücre türünü oluşturmalarına rağmen totipotent hücreler gibi ekstraembriyonik tabakaları oluşturamazlar. Pluripotent hücreler fertilizasyondan sonra, 4–5. günde oluşan blastosist evresindeki embriyoda bulunan hücrelerdir. Yapılan çalışmalarda erken dönem insan embriyolarından alınan hücreler ile fetüs dokusundaki gonad kökenli hücrelerin de pluripotent özelliğe sahip oldukları gösterilmiştir [38, 43, 44].

2.1.3.3. Multipotensi

Gelişimsel potansiyelin son basamağı multipotensidir. Multipotensi; bir hücrenin, belirli bir hücre soyunun tüm hücrelerini meydana getirebilme yeteneğidir [40]. Sadece spesifik dokuların hücrelerini meydana getirebilen multipotent kök hücreler çoğunlukla türevlendikleri dokudan sonra adlandırılmaktadırlar [38]. Örneğin nöral kök hücreler (NKH); nöronları, astrositleri ve oligodendrositleri meydana getirmektedir. Mezenkimal kök hücreler (MKH) ise fibroblastlara, osteoblastlara, kondroblastlara, adipositlere ve iskelet kasına farklılaşmaktadırlar [2].

Yetişkin dokulardaki kök hücrelerin çoğu multipotenttir. Kemik iliği, bağırsak ve akciğerin kök hücre populasyonuna sahip olduğu iyi bilinmektedir. "Post-mitotik" ve yeniden yapılamaz olduğu düşünülen beyin, kalp ve böbreği içeren diğer organların son zamanlarda kök hücre populasyonu içerdiği gösterilmiştir. Yetişkin kök hücreler; kemik iliği, kan ve bağırsak gibi dokuların devamlı olarak yenilenmesi için gereklidir ve yaraların iyileşmesinde önemli bir rol oynamaktadır [38].

Bu hücreler sınırlı farklılaşma kapasitesine sahip olmalarına rağmen yine de çok sayıda hücre türüne farklılaşabilmektedirler. Multipotent hücreler, kemik iliğinde yüksek miktarda olmak üzere kordon kanı ve yağ dokusunda da bulunmaktadırlar [45, 46, 47].

2.1.3.3. Unipotensi

Latince "tek, bir" anlamına gelen "Unus" kelimesinden türetilmiştir. Multipotensiden daha sınırlı bir gelişimsel potansiyeli ifade eden unipotensi, bir hücrenin sadece tek bir hücre tipini sürdürme kapasitesidir. Spermatogonyal, korneal ve endoteliyal kök hücreler sadece tek bir özelleşmiş hücre tipine farklılaşabilen kök hücrelerdir [4, 38].

Bu hücreler, erişkin organizmada, tek bir seri boyunca farklılaşmaktadırlar. Ayrıca, doku yenilenmesinde de rol oynamaktadırlar. Ancak, daha geniş doku hasarlarında, hasarlı bölgenin tamiri için pluripotent kök hücreler devreye girmektedir [48, 49].

2.2. KAYNAKLARINA GÖRE KÖK HÜCRE ÇEŞİTLERİ

Embriyonik kök hücre kaynakları olan, erken embriyo dönemindeki blastosist, embriyonel yapraklar ve fetal dokular dışında kök hücreler, kemik iliği, kas dokusu, spongiyoz kemik, nöral krista, dermis, yağ dokusu, periost, perisit, sinoviyal zar, kan, amniyon sıvısı, Wharton jeli, göbek kordon kanı, göbek kordon stroması, diş pulpası gibi birçok farklı erişkin dokudan da izole edilebilmektedir.

Sınıflandırmada birçok farklı görüş olmasına karşın kök hücreler temelde, kendini yenileme ve farklılaşma yeteneklerine göre iki gruba ayrılmaktadırlar. Bunlardan ilki embriyonik diğeri ise erişkin kök hücredir [50].

2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler (EKH), preimplantasyon embriyolarının iç hücre kitlesinden (İHK) elde edilmektedir. Bu hücrelerin temel özellikleri pluripotensi ve kendini yenileme kapasitesidir [51]. Kendini yenileme, EKH'lerin sınırsız sayıda identik hücre meydana getirme yeteneklerini tanımlarken pluripotensi, EKH'lerini *in vitro* ve *in vivo*'da birden çok somatik hücre hattı ve germline meydana getirmek için çeşitli gelişimsel işaretlere cevap verme kapasitesini ifade etmektedir [52]. Bu nedenle EKH'ler, doku rejenerasyonu ve hücre replasman tedavileri için bir hücre kaynağı olmasının yanı sıra gelişimsel biyoloji araştırmalarının çeşitli yönlerden çalışılması için de iyi bir aday olarak kabul edilmektedir [53].

Normal somatik hücreler ve onların benzerlerinin aksine EKH'ler kültürde pluripotensilerinden ödün vermeksizin çoğalabilmektedir. Çoğalma süresince kendini yenileme kapasitelerini devam ettirirken yaşlanma sürecine girmedikleri görülmektedir. EKH'lerin senesensten kaçma fenomeni; sitogenetik, genomik, mitokondriyal ve epigenomik değişikliklerin yokluğunun yanı sıra yüksek telomeraz aktivitesi, hücre siklusu regülasyonu ve DNA tamir mekanizmalarından dolayı mümkün görülmektedir [54].

İlk kez 1981 yılında birbirinden bağımsız olarak çalışan iki araştırma grubu (Evans ve Kaufman, Martin) tarafından 3.5 günlük fare blastosistlerinin iç hücre kitlesinden

embriyonik kök hücreler izole edilmiş ve kültürde farklılaşma sürecine girmeksizin çoğaltılabilmişlerdir. 1998 yılında ise Thomson ve arkadaşları tarafından insan embriyonik kök hücre (iEKH) hatları elde edilmiştir [55]. Daha sonra dünyadaki değişik laboratuarlar aynı teknolojiyi uygulayarak iEKH hatları geliştirmişlerdir ve bu gün 100'den fazla iyi karakterize edilmiş hücre hattı araştırma için kullanılmaktadır [6].

iEKH'leri *in vitro*'da immortal pluripotent hücreler olarak kalabilmelerine karşın birçok farklılaşmayı indükleyici sinyal yolaklarına duyarlı kalmaktadırlar [56]. İEKH'leri için orijinal kültür protokolünde belirleyici bir parametre besleyici hücrelerin varlığıdır ve çok yakın bir zamana kadar İEKH'leri farklılaşmamış durumunu korumak için fare fibroblast besleyici hücreleri ile kültürde tutulmaktaydı. Ne yazık ki böyle kültür koşulları, böyle kültürlerden elde edilen hücre hatları, fare orijinli retrovirüs içerebileceği için gelecek klinik uygulamalar için yasaklanmıştır. Bu problem alternatif kültürleme koşulları için kapsamlı araştırmalar vasıtasıyla çözülmüştür. Böylece bir takım laboratuarlar, herhangi bir ksenojenik ürün ile temas olmaksızın stabil İEKH hatlarını başarılı bir şekilde geliştirmiştir [6].

Fare ve insan blastosistlerinden elde edilen EKH hatları ilginç bir biçimde koloni morfolojisinde, proliferasyon oranında, büyüme faktörü gereksinimlerinde ve epigenetik durumlarında önemli farklılıklar sergilemektedirler [57].

Genel olarak blastosistten elde edilen embriyonik kök hücreler ile birlikte embriyonik olarak tanımlanan bir hücre tipi daha bulunmaktadır. Bu hücreler, embriyonik germ (EG) hücreleri olarak adlandırılan primordiyal germ hücreleridir. Embriyonal karsinoma (EC) hücreleri ise tümörlerden elde edilen hücrelerdir, ancak *in vitro* ve *in vivo*'da spesifik hücre yüzey markerlarının ve geniş farklılaşma kapasitesinin karakteristik özelliklerini taşımaktadırlar [58].

EKH'lerin fonksiyonel ve fenotipik özellikleri incelendiğinde hem insan hem de farede yüksek alkalen fosfataz aktivitesi, yüksek telomeraz aktivitesi ve yüksek nuklear-sitoplazmik oran görülmektedir [59]. Genellikle yüzey antijenlerinin, tek bir hücre üzerinde kolayca tespit edilebilen ve değerlendirilebilen, hücre tiplerinin değerli bir belirteci olduğu kanıtlanmıştır. Bunlar; özellikle farklılaşma kasıtlı olarak indüklendiği

zaman tipik olarak ECH ve EKH kültürlerinde tipik olarak bulunan heterojen karışımlardan hücrelerin alt kümelerini izole edebilmek için özellikle Floresan Aktif Hücre Sıralama (FACS) gibi çeşitli immünolojik teknikler kullanılabilmektedir [60]. İnsan embriyosundan elde edilen İHK'nin antijen fenotipi SSEA3 (+), SSEA4 (+), TRA-1-60 (+), SSEA1 (-) şeklindedir [61].

Son zamanlarda, EKH'lerde etkin olan transkripsiyonel ağların aydınlatılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Gen ekspresyon profillemelerindeki teknik gelişmeler, EKH'lerdeki ve onların diferansiye türevlerinde eksprese edilen genlerin kapsamlı olarak tanımlanabilmesini mümkün hale getirmiştir [62, 63]. Geniş çaplı genom araştırmalarından elde edilen sonuçlar, benzersiz olarak pluripotent durumda eksprese edilen ve diferansiyasyon üzerine aşağı regüle edilen birkaç transkripsiyon faktörünü ortaya çıkarmıştır [64, 65].

Transkripsiyonel regülasyon, hücresel kimliğin sağlandığı ve bir hücre içerisindeki biyolojik aktivitelerin modüle edildiği esas süreçtir. EKH'lerde transkripsiyon faktörleri ve onların genomik kalıpları arasındaki karmaşık etkileşim, kendini yenileme ve pluripotensiyi kontrol eden transkripsiyonel ağlar için yapı taşları olarak görev yapmaktadır. Bu karmaşık ağın kalbi; EKH transkripsiyonel çekirdeğini oluşturan üçlü transkripsiyon faktörü Oct4, Sox2 ve Nanog'dur [66]. Bu ağ, kök hücrelerin sağ kalımı ve proliferasyonu için gerekli olan genlerin aktif durumlarını devam ettirirken diferansiyasyon için gerekli olan genleri baskılamaktadır [67].

Oct4, Sox2 ve Nanog transkripsiyon faktörleri, gelişim süresince diğer genlerin ekspresyonlarını regüle etmektedirler ve iç hücre kitlesinin pluripotent hücrelerinde yüksek seviyelerde bulunmuşlardır. Bu üç transkripsiyon faktörünün aşağı regülasyonu; pluripotensi ve kendini yenilemenin kaybı ile daha sonraki diferansiyasyon basamakları ile ilişkilendirilmiştir [68].

Epigenetik regülasyon, DNA molekülünün nukleotid dizisindeki değişiklikler olmadan gen ekspresyon paternini değiştiren mekanizmaları ifade etmektedir [66]. Pluripotent EKH'lerde kromatin, diferansiye hücrelerle karşılaştırıldığında ayırt edici özellikler sergilemektedir. EKH'lerde kromatin yapısal proteinleri, kromatin ile hiperdinamik bir

etkileşim göstermektedir ve genel transkripsiyonel aktivite de diferansiye hücrelerle karşılaştırıldığında hiperaktiftir. EKH'ler aynı zamanda açık kromatin yapısını devam ettirmekten sorumlu olan kromatin yeniden modelleyici faktörleri yüksek seviyelerde eksprese etmektedirler [69].

İnsan ve fare embriyonik kök hücreleri, hücre biyolojisinin birçok temel ve uygulamalı yönleri için güçlü araçları temsil etmektedir. İnsan embriyonik kök hücrelerinin *in vitro* ortamda özgün hücre serilerine farklılaşmasına dayanan gözlemler bu hücrelerin; erken dönem embriyo/doku gelişimi (gelişim biyolojisi/genetik), yeni ilaçların tasarımı ve testi (farmakoloji), yeni toksik maddelerin tanımlanması (toksikiloji) ve hücre esaslı tedavide kullanılmak üzere hücre ve dokuların üretilmesi (terapi) için kullanılabileceğini göstermektedir.

EKH'lerin kullanımını önlemek için yetişkin kök hücreler, rejeneratif tıp için alternatif hücre kaynağı olarak öne sürülmektedir. Ancak yetişkin kök hücrelerin kültürünün uzun süre yapılması zordur ve çeşitli doku spesifik hücrelere diferansiyasyon için sadece sınırlı bir yeteneğe sahip olduğu görülmektedir. Bu nedenle yetişkin kök hücreler, EKH'lerinin pluripotent doğasını güçlükle aşabildiği için bilimsel ve klinik olarak kullanışlı hücre tiplerinin türetilmesi, iyi karakterize edilmiş EKH hatlarının kullanılabilirliliğine dayandırılabilmektedir. Hemen hemen tüm var olan EKH hatları, sağlıklı blastosist aşamasındaki embriyoların İHK'nden elde edilmiştir. İnsan EKH'lerinin kullanımındaki etik itirazlardan dolayı birçok araştırmacı ve yasama organı; etik, bilimsel ve terapötik olarak kabul edilen pluripotent kök hücreler üretmek için altenatif yollar incelemektedirler [70].

2.2.2. Erişkin Kök Hücreler

Erişkin ya da somatik kök hücreler, erişkin vücudunda bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Bunlar, hasar gören dokuları tamir etmede kullanılan hücreleri oluşturan ve/veya ölen hücrelerin yerini alan hücrelerdir ve üretildikleri farklı organlardaki özel yerlerde bulunmaktadırlar [71]. Erişkin kök hücreler, 1950'li yıllarda kemik iliğinden alınan kök hücreler kullanılarak kök hücre nakli yapılmasından bu yana klinikte kullanılmaktadır. O tarihten bu yana, alternatif doku onarım olasılıkları sunan ve kordon

kanı, yağ, cilt, goblet hücreleri ve periferik kan (PK) gibi elde edilmesi daha kolay hücre kaynaklarından elde edilen diğer kök hücre türleri tanımlanmıştır. Erişkin kök hücreler farklılaştıkları dokular temel alınarak mezenkimal ve hematopoietik kök hücreler olarak iki gruba ayrılmaktadır [22].

2.2.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Kök hücreler, biyolojik özellikleri ve sınırsız kullanım alanları nedeniyle uzun zamandan beri büyük bir ilgi konusu haline gelmiştir [72]. Mezenkimal kök hücreler (MKH), birçok yetişkin dokunun stromal fraksiyonunda mevcut olan multipotent öncüllerin bir çeşit alt kümesidir ve birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir. MKH'ler işlevsel olarak *in vitro* olarak çoğalmalarının ardından osteoblastlara, adipositlere ve kondrositlere farklılaşma yetenekleri ile tanımlanmaktadırlar. Bunnla birlikte *in vivo*'da tanımlanmaları, heterojeniteleri, anatomik yerleşimleri ve yetişkin dokulardaki homeostazileri tam olarak açıklanamamıştır [73].

Mezenkimal kök hücreler hızla kendini çoğaltmakta, prolifere olmakta ve mezenkimal dokulara farklılaşmaktadır [74]. Kendini yenileme, kök hücrelerin simetrik olarak bölünebilmesi ve iki yavru kök hücre meydana getirmesi veya asimetrik olarak bölünmesi ve bir kök hücre ile bir olgun hücre meydana getirmesi yoluyla meydana gelen bir süreçtir. İkinci bir senaryoya göre ise kök hücre sayısı, kararlı durum koşullarında kalındığında korunmaktadır [75].

Göbek kordonu, tedavi için kök hücrelerin tükenmeyen, tartışmasız bir kaynağını içermektedir [76]. İnsan göbek kordonu kanı (iGKK) hematopoietik kök hücrelere (HKH) ek olarak HKH'lerden farklı olarak farklılaşmamış ve multipotent kök hücrelerin nadir bir populasyonunu oluşturan MKH'lerin bir populasyonunu içermektedir [77, 78]. MKH'ler, hematopoiezi destekleme ve üç (osteojenik, adipojenik ve kondrojenik) veya daha fazla (diğerleri arasında miyojenik, kardiyomiyojenik) hücre soyuna farklılaşma yeteneğine sahiptir. Bu yeteneğinden dolayı *in vitro* deneyler veya *in vivo* çalışmaların sonuçları ile desteklenerek MKH'lerin doku mühendisliği ve hücre tabanlı tedavi bağlamında çekici bir araç olduğu görülmektedir [79, 80].

Günümüzde kemik iliği, hem deneysel hem de klinik çalışmalar için MKH'lerin temel kaynağını oluşturmaktadır [79]. MKH'ler, kemik iliği (Kİ) mikroçevresindeki önemli bir hücre populasyonudur ve bu hücrelerin Kİ stomasına farklılaşması nedeniyle hemotopoiezin desteklenmesinde ağırlıklı olarak görev yaptığı kabul edilmektedir [81]. Bununla birlikte GKK'nda izole edilebilen ve kültürü yapılabilen MKH'leri içermektedir [80] ve GKK kaynaklı MKH'ler Kİ kaynaklı MKH'lere çok benzemektedir [82]. İnsan GKK'ndan elde edilen multipotent mezenkimal hücreler, hücresel tedavide gelecek stratejilerin geliştirilmesi için umut verici adayları temsil etmektedir [83]. Bu nedenle göbek kordonu/plasenta stroması, deneysel ve klinik ihtiyaçlar için MKH'lerin alternatif bir kaynağı olarak kabul edilmektedir [79].

Mezenkimal kök hücreler, sistemik veya intraperitonal injeksiyonu takiben çeşitli dokulara dağılmaktadır. Farklı hayvan modellerini içeren birçok rapor MKH'lerin doku tamirine katkıda bulunduğunu ve bu hücrelerin nöronal progenitör ve kas hücrelerinin yanı sıra yağ, kemik ve kartilajı meydana getirme yeteneği olması nedeniyle kemik, kartilaj, iskelet, kas ve miyokardiyumun rejenerasyonunda kullanılabileceğini göstermektedir [84, 85]. Bu hücreler, gen modifikasyonu [86, 87] ve immunsupresif yeteneği kolaylaştırmaktadır, bu nedenle doku mühendisliği, gen tedavisi ve immunoterapi için umut vaat etmektedir [87].

In vitro'da plastisite ve yüksek proliferasyon yeteneklerinden dolayı [82, 86, 88] insan MSC'leri rejeneratif tıp ve doku mühendisliğindeki potansiyel kullanımları nedeniyle büyük bir ilgi yaratmıştır [88, 89] ve onların terapötik değerini gösteren hem preklinik hem de klinik çalışmalardan elde edilen bazı çarpıcı örnekler bulunmaktadır [89].

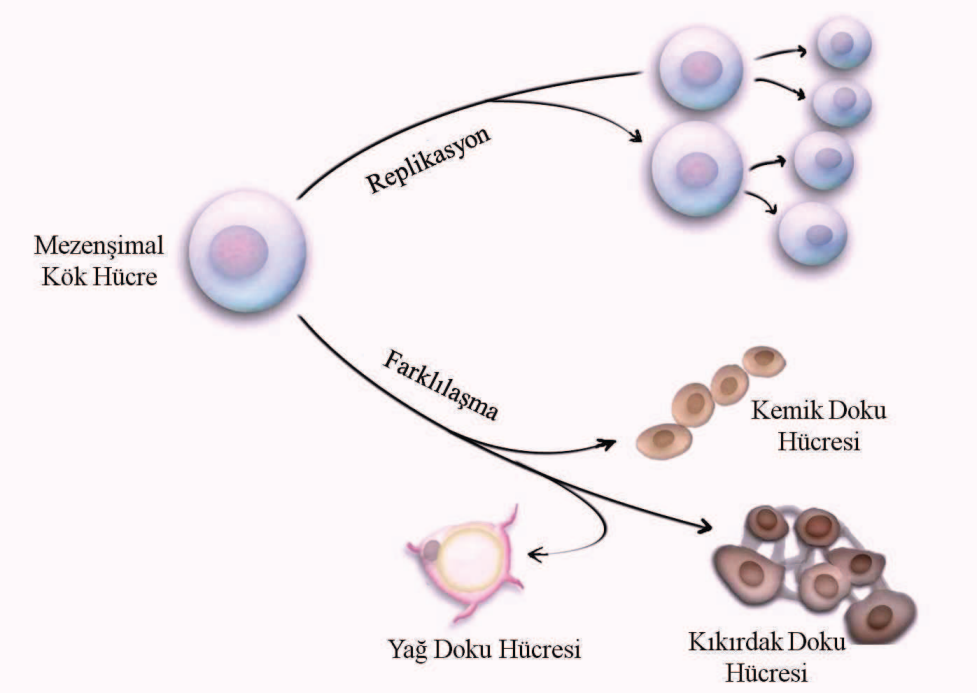
Mezenkimal Kök Hücrelerin Genel Özellikleri:

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

1. MKH'ler standart kültür ortamında plastik yüzeye tutunabilen hücrelerdir,

2. MKH'ler yüzeylerinde CD105 (SH2), CD73 (SH3/4) ve CD90 gibi hematopoietik olmayan hücre yüzey belirteçlerini eksprese etmelerine rağmen, CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 veya CD19 ve HLA-DR gibi tipik hematopoietik belirteçleri göstermemektedirler,

3. *İn vitro* koşullarda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmektedirler (Şekil 2.2) [88, 89, 90, 91].



Şekil 2. 2: Mezenkimal kök hücrelerin özellikleri.

Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi:

Mezenkimal kök hücreler kemik iliği dışında adipoz doku, göbek kordon kanı, plasenta, amniyotik sıvı ve amniyotik membran gibi çeşitli fetal dokulardan izole edilebilmektedir. Son yıllarda yapılan pek çok çalışma, insan göbek kordonundaki Wharton jelinin, primitif MKH'ler bakımından zengin bir kaynak olduğunu göstermiştir [92]. Klinik uygulamalarda kullanılmak üzere izole edilecek olan hematopoietik veya mezenkimal kök hücreler için kullanılan hücre kaynakları; kemik iliği, kordon kanı, periferik kan ve yağ dokusudur. Kemik iliği ve kordon kanından hematopoietik veya mezenkimal kök hücreleri elde etmek için herhangi bir uyarıcı faktör kullanılmasına gerek yoktur. Ancak periferik kandan kök hücrelerin elde edilebilmesi için kan alımından önce G-CSF (Granülosit- Koloni Stimüle Edici Faktör) ile indükleme yapılması gerekmektedir [93, 94, 95, 96, 97, 98, 99]. Kaynaklarına bakılmaksızın, farklılaşmamış MKH'ler, fibroblast benzeri morfolojiye ve kendi kendilerini kopyalama kabiliyetine sahip hücrelerdir. Dolayısıyla potansiyel olarak, doku ve organ

rejenerasyonu için yeterli sayılara ulaşmak üzere çoğaltılabilmektedirler [92]. Mezenkimal kök hücreler, ya MHK'nin özelliklerine dayanan doğrudan plakalama, ya da hücre yüzey belirteçlerinin kullanımı ile elde edilmektedir. Her iki metodoloji de belirli sınırlamalar içermektedir.

Kültür plastisitesine dayalı olarak elde edilen saflaştırılmış populasyonun homojenliği, hücrelerin yalnızca yüzde 10 ila 20'sinin multipotent farklılaşma kabiliyetine sahip olması nedeniyle yüksek değildir. MKH'lerin kültürü, doku kültüründe telomeraz faaliyetinin kaybı ile telomerin kısalmasının bir sonucu olarak izole hücrelerin populasyonun 40 kez iki katına çıkması -yaşlı donörler için 25 kez- sınırlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, klinik uygulamalar için, kültürdeki hücreler, bu uzatılmış genişleme yöntemi kullanılırken 250 kez iki katına çıktıktan sonra önemli şekilde genetik instabilite göstermişlerdir ve bu da, uzatılmış *ex vivo* kültür süresi olmaksızın yeterli sayıda hedef hücrenin geliştirilebilmesi için verimli büyütme yöntemleri ve etkin farklılaştırma protokolleri gereğine işaret etmektedir [100].

Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Özellikleri:

Kültür ortamındaki mezenkimal kök hücrelerin morfolojileri, ışık veya faz kontrast mikroskobu ile incelendiğinde fusiform şekilli, iğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücre toplulukları olarak görülmektedir. Morfolojik özellikleri fibroblastlara benzemekle birlikte en önemli farkları nukleus yerleşiminin fibroblastlarda asimetrik olmasına karşın bu hücrelerde simetrik olmasıdır [101].

Mezenkimal Kök Hücrelerin Fenotipik Özellikleri:

Mezenkimal kök hücreler, monoklonal antikorların kullanımı yoluyla flow sitometri ile tanımlanabilmektedir. Fenotipik olarak bu hematopoietik olmayan hücreler, CD34 ve CD45 gibi hematopoietik hücre markerları bakımından negatif olmaları ve MHC sınıf I'i ekprese etmeleri fakat MHC sınıf II'i eksprese etmemeleri ile karakterize edilmektedir. Çeşitli monoklonal antikorlar, karakterizasyonları için markerların bir panelini sağlayarak MSC'lere karşı yükseltilmiştir.

MSC'ler tarafından IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, LIF, SCF, FLT-3 ligand, GM-CSF, G-CSF ve M-CSF gibi sayısız protein salgılanmaktadır. MSC'ler aynı zamanda bazı sitokinler ve büyüme faktörleri için IL-1 R (CD121a), IL-3 R (CD123),

IL-4 R (CDw124), IL-6 R (CD126), IL-7 R (CD127), LIFR, SCFR, G-CSFR, VCAM-1 (CD106), ALCAM-1 (CD166), LFA-3 (CD58), TGF(1R, TGF(2R, IFN(R (CDw119), TNF1R (CD120a), TNF2R (CD120b), bFGFR, PDGFR (CD140A), EGFR ve CXCR-4 reseptörleri de eksprese etmektedir [102].

Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşması:

Erişkin kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler değişik dizilere farklılaşabilmektedir (adiposit, miyofibroblast, osteoblast, endoteliyal hücre, kondrosit, nöral hücre, kalp kası, karaciğer hücresi, iskelet kası, böbrek tubül hücresi, tenosit). Farklılaşmalarda rol oynayan genlerin bir kısmı yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Bu farklılaşmış hücreler CD29, CD44, CD105 ve CD166 için pozitiftir ve yaklaşık iki günlük bir iki katına çıkma ömrü bulunmakta, altı kata kadar kültürde genişleyebilmekte ve biyolojik işlevleri yaşlanma ile azalmamaktadır. MKH'lerin basit bir kemik iliği aspiratından 10 hafta içinde yaklaşık 50 kez ikiye katlanarak çoğaltılması mümkündür. Bu özellikleri ile ilk ve ikinci trimesterde fetal kan, karaciğer ve kemikten, amniyotik sıvı ve kordon kanından ve erişkin periferal kandan, yassı kemikler ve adipoz dokudan alınan hücrelere benzemektedirler. Ayrıca, herhangi bir telomer kısalması ya da karyotipik anomali olmaksızın belirli koşullar altında yüzden fazla kez çoğaltılabilen bu hücrelerin CD133 pozitif bir alt populasyonunun, yalnızca mezenkimal hücre türlerine değil (osteoblastlar, kondrositler, adipositler, miyositler) aynı zamanda endotel ve nöroektodermal fenotip ve işleve sahip hücrelere de farklılaşma yeteneği de kanıtlanmıştır. İnsan MKH'lerinin (iMKH) fare iskelet miyositler ile kültüre edildiğinde kas hücrelerine farklılaşması ve sınırlı miyojenik potansiyel göstermesi ile MKH'lerin daha geniş bir farklılaşma kabiliyeti olduğu da öne sürülmüştür. Kardiyomiyosit farklılaşma da, uygun morfoloji, fizyolojik kardiyomiyojenik yanıt ve uygun adrenerjik ve muskarinik yüzey reseptörlerinin ifadesi ile gösterilmiştir [100]. Daha önce, erişkin kemik iliğinden alınan kök hücrelerin, embriyonik hücrelerin totipotent olması karşısında benzer bir hücre türünü ürettiği düşünülmekteydi. Bu multipotent erişkin kök hücrelerin keşfi ile kalıtsal ya da dejeneratif hastalıkların tedavisi ve kıkırdak, kemik ve miyokardiyum gibi dokuların onarımı için gelecek vaat eden ve daha bol bir potansiyel kaynak sunulmuştur [103].

Mezenkimal Kök Hücrelerin Avantajları:

İnsan mezenkimal kök hücrelerinin hücresel tedaviler için temel olarak kabul edilmesinin nedenleri; hastadan kolayca izole edilmeleri, *in vitro* koşullarda hızla çoğaltılabilmeleri, genetik mühendisliğine bağlı olarak ilgili genler ile tedavi yapılmasına uygun olmaları, tümörijenik olmamaları kültür ortamında stres koşulları olmaksızın geniş yayılma gösterebilmeleri ve çeşitli mekanizmalarla doku hasarlarını onarabilmeleridir. Bu onarım mekanizmaları şunlardır; (a) dokuya özgü fenotipe farklılaşma, (b) hasarlı hücrelerin onarımı ve hücrelerin çoğalmasını sağlayan kemokinlerin salgılanmasının sağlanması ve (c) muhtemelen mitokondri veya mitokondrial DNA'nın transfer edilmesi [104].

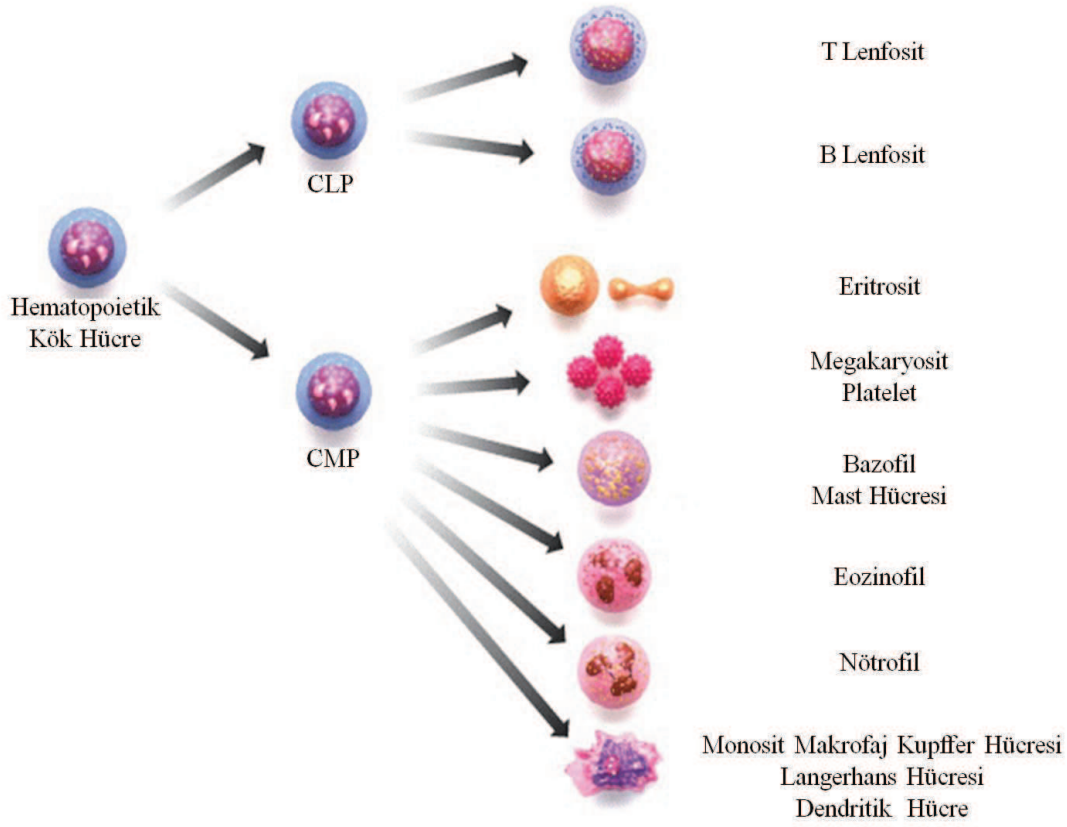
Kemik iliği, her 10.000 çekirdekli hücreye karşın 1 mezenkimal kök hücre içermektedir (Bu oran kordon kanında $1/10^8$'e kadar düşebilmektedir) [105]. Çocuklarda 29 CFU/1 milyon tek çekirdekli hücre oranı bulunurken, ileri yaşlarda bu oran 3.2 CFU/1 milyon tek çekirdekli hücre oranına kadar düşmektedir [106]. Yapılan araştırmalar fetal MKH'lerin sadece sayısal açıdan değil erişkin kök hücrelerden doku gelişiminde, hücre bölünmesinde ve immünolojik antijen sunumunda rol oynayan genler açısından da önemli farklılıklar taşıdığını göstermektedir [107, 108]. Ancak MKH'lerin laboratuvarda farklılaştırılması ve üretilmesi ile bu farklılıklar ortadan kaldırılabilmektedir.

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

2.2.2.2. Hematopoietik Kök Hücreler

Hematopoietik kök hücreler (HKH), kendini yenileme kabiliyetine ve özelleşmiş kan hücrelerine, (eritrositler, trombositler ve lökositlere) farklılaşma kabiliyetine sahip, farklılaşmamış hücrelerdir (Şekil 2.3). Günümüzde 4 farklı kaynaktan (kemik iliği,

kordon kanı, periferik kan ve plasenta) elde edilen hematopoietik kök hücreler, miyeloablatif, miyeloablatif benzeri ya da miyeloablatif olmayan işlemlerden sonra lenfohematopoietik işlevin geri kazanımı için kullanılmaktadır. E. D. Thomas tarafından 1963'te tanımlanan, kemik iliğinden elde edilen kök hücreler, klasik kök hücre kaynağı olarak kabul edilmektedir.



Şekil 2.3: Multipotent özelliğe sahip hematopoietik kök hücrelerin farklı hücre tiplerini oluşturma şekilleri.

Bir hematopoietik kök hücre kaynağı olarak periferal kan 1981'de kanıtlanmıştır ve kordon kanı bir kaynak olarak 1988'de tanımlanmıştır. Farklı kök hücre kaynakları, hücrelerin sayı ve özelliklerine göre farklı rekonstrüktif ve immünojenik özelliklere sahiptir [96].

Ciddi kayıplar sonrasında bile, kan hücrelerinin yüksek rejeneratif potansiyeli ve kendini yenileme yeteneği ve lenfositlerin döngüsü, hematopoietik kök hücrelerin rejeneratif potansiyelinin göstergesidir. Alman patolog Julius Cohnheim 1867'de,

kemik iliğinin inflamatuvar yara iyileşme süreçlerinin içinde bulunan fibroblastlar da dahil olmak üzere, sirkülasyonda olan hücreleri ürettiğini göstermiştir. Bununla birlikte, kan hücresi türlerinin klonojenitesi ve kök hücre teorisi kavramı ancak 1961'de kanıtlanmıştır. Bu nadir kemik iliği hücrelerinin kimliği konusunda oldukça fazla bilgi birikimi olmasına karşın, bu hücrelerin tam kimliği halen tartışmalıdır ve bu hücreyi doğru bir şekilde tanımlamak için tek bir belirteç bulunmamaktadır. Bazı laboratuvarlar tarafından, belirli pozitif belirteçlerin gösterilmesini ve farklılaşma ya da dizi belirteçlerinin yokluğunu gerektiren HKH'ler bakımından zengin hücre populasyonları tanımlanmıştır. Bununla birlikte tek bir hücrenin hematopoietik kök hücre faaliyeti, öldürücü dozda radyasyona maruz bırakılmış bir farenin ilgili hücre ile başarılı tedavisi sonucu elde edilebilmektedir. Hematopoietik kök hücreler, kolay erişilebilirlikleri, çeşitli yüzey belirteç antikorlarına sahip olmaları ve klinik uygulamalardaki geniş kullanımları da dahil olmak üzere fare modellerinin bulunabilmesi nedeniyle, vücuttaki en iyi anlaşılan kök hücrelerdir. Bununla birlikte 1990'ların sonunda, bazı laboratuvarlar, farklılaşma ve dizilere ayrılmanın geri çevrilemezliği konusunda uzun süredir devam eden dogmaları sorgulayan HKH'lerin daha önceden bilinmeyen ve şaşırtıcı özelliklerini keşfetmişlerdir. Böylece, kemik iliği kaynaklı hücrelerin yalnızca doğal dizilerine ayrılmadığı, kas ve karaciğer hücrelerine dönüştükleri de rapor edilmiştir [88].

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

2.2.3. Elde Edildikleri Kaynaklara Kök Hücrelerin Özellikleri

2.2.3.1. Dokulardan Elde Edilen Kök Hücreler

Embriyonik kök hücrelerin aksine, dokulardan elde edilen MKH'ler, kanserli yapı oluşturmayan, etik sorunlara yol açmadan bireylerden kolaylıkla elde edilebilen kök hücre kaynaklarıdır. Son yıllarda dokulardan elde edilen kök hücrelerin araştırmalarda ve klinikte kullanımı giderek artmaktadır. Ayrıca, klinikte Osteogenezis İmperfekta, hematopoietik iyileşme ve kemik dokusu onarımına yönelik hücresel tedavi uygulamalarında başarılı sonuçlar gösterilmiştir. Ancak tüm bu avantajlarına rağmen dokulardan elde edilen kök hücrelerin etkin bir şekilde saflaştırılmalarında ve tanımlanmalarında zorluklar olmasının yanında tedavilerde alıcıda yüksek oranda bağışıklık yanıtı ortaya çıkma riski de taşımaktadır. Ayrıca erişkin dokulardan elde edilen kök hücrelerin sahip oldukları sınırlı büyüme kapasiteleri nedeniyle kültür ortamında uzun süreler çoğaltılmaları mümkün olmamaktadır [109, 110, 111].

Periferik Kan Kök Hücreleri:

Hayvan modelleri üzerinde yapılan ilk çalışmalar, uyarılmış periferik kanda, kemik iliğinden daha fazla tek çekirdekli hücre olduğunu göstermiştir. Periferik kan kök hücrelerinin hematopoietik nakil için kaynak olarak kullanılması, büyük sayıda afereze ihtiyaç duyulması (genellikle 7 ya da daha fazla) sebebiyle oldukça zordur. Kısa süre önce, kemoterapi kullanımı ve/veya hematopoietik büyüme faktörleri ile uyarılma sonucunda periferik kandaki CD34+ hücreleri olan hematopoietik progenitör sayısında önemli bir artışa yol açtığı bildirilmiştir. Bu sebepten, periferik kan kök hücrelerinin kemik iliğine alternatif olarak kullanımına yönelik yoğun çalışmalar başlatılmıştır. Otolog kullanım için, granülosit koloni uyarıcı faktör (GCSF) ya da granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ile tedavi gerekmektedir. Nakil sonrasında iyileşme için mobilize periferik kan kök hücrelerinin kullanılması kemik iliği kullanımı sonrası iyileşmeden önemli ölçüde daha hızlıdır. Periferik kan hücrelerinin otolog nakiller için kullanımıyla ilgili endişeler, otolog kemik iliğine oranla tümör hücreleriyle kontaminasyon ihtimalinin daha yüksek olmasından dolayı sakıncalıdır. Allojenik nakil için T-hücre miktarının kemik iliğine göre daha yüksek olması da endişe vericidir. Ancak, periferik kan kök hücreleri kullanımının hızlı ve güvenilir olması verici için cerrahi işlemlerin olmaması göz önünde bulundurulduğunda periferik kan kök hücrelerin kemik iliğinin yerine geçmesi olasıdır [94].

Nöral Kök Hücreler:

Kısa süre öncesine kadar sinir sistemi hücrelerinin kendilerini yenileyemedikleri düşünülmekteydi. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalarda insan beyninde nöral hücrelerin öncülü olan kök hücrelerin bulunduğu anlaşılmıştır. Bu kök hücrelerin, fetüsün beyin ve sinir sistemini oluşturan ve nöron, astrosit ve oligodendrositleri oluşturan kök hücrelere benzediği belirlenmiştir. Bu gelişmelerin ardından araştırmacılar hayvan deneylerinde kök hücreleri kullanarak bu sinirleri tamir etmeyi başarmıştır [112].

Nöral kök hücreler (NKH), sinir sisteminin oluşumuna katılan, kendini yenileyebilen multipotent hücrelerdir. Memelilerde, nöronal hücrelerin üretiminin çoğunlukla gelişimin prenatal (doğum öncesi) dönemi ile sınırlı olduğuna, yetişkin beyninin kök hücrelerden yoksun olduğuna ve bu nedenle de yaralanmalardan sonra yeni sinir hücresi yapma ve rejenerasyon yeteneği bulunmadığına inanılmıştır [113].

Nöral kök hücreler (NKH), sinir sisteminin temel fenotiplerini, nöronları, astrositleri ve oligodendrositleri, meydana getiren kendini yenileyebilen multipotent hücrelerdir. Bu hücreler, Alzheimer ve Parkinson Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklardan retinal hastalıklar, serebral felçler ve omurilik yaralanmalarına kadar çok çeşitli nörolojik hastalık ve yaralanmaları tedavi etme potansiyeline sahiptir. Yetişkin memelilerden insanları da içeren çeşitli türlerin beyninde nörojenez temel olarak hipokampüsün dentat girusu (DG) ve subventriküler zon (SVZ) olmak üzere iki bölgede gerçekleşmektedir. Yetişkin beynindeki yeni doğan nöronal hücrelerin kök hücrelerden kaynaklandığı hipotezi öne sürülmüştür. Bu iddiaya destek olarak nöral progenitör ve kök hücreler, yetişkin merkezi sinir sisteminin (MSS) çeşitli bölgelerinden izole edilip *in vitro*'da karakterize edilmiştir. Yetişkin memeli beyninde nörojenezin meydana geldiğinin ve yetişkin memeli MSS'inde bulunan NKH'lerin onaylanmasının gelişimsel biyoloji ve tedavi hakkındaki anlayışımız için çok büyük sonuçları bulunmaktadır. Yetişkin beyni onarım için potansiyele sahip olabilir ve bunun için uygun olabilir. Terapötik girişimler; endojen nöronal progenitör veya kök hücrelerin uyarılmasını ve yetişkin kaynaklı nöral progenitör ve kök hücrelerin transplantasyonunu içermektedir [7].

Karaciğer Kök Hücreleri:

Karaciğerin çok yüksek bir rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir. Aslında insanları da içeren memeliler, toplam karaciğer kitlesinin %75'inin cerrahi olarak uzaklaştırılması ile hayatta kalabilmektedirler. 1 hafta içerisinde orijinal hücre sayısı eski haline gelmekte ve 2-3 hafta içerisinde de orijinal doku kitlesi onarılabilmektedir. Karaciğer boyutu aynı zamanda organın aşırı büyümesinin önlenmesi ile de kontrol edilmektedir. Hepatik aşırı büyüme, hepatosit büyüme faktörü (HGF) veya peroksizom proliferatörleri gibi çeşitli bileşikler ile teşvik edilebilmekte, ancak büyüme uyaranlarının uzaklaştırılmasının ardından karaciğer boyutu çok hızlı bir şekilde eski haline geri dönebilmektedir. Karaciğer kök hücrelerinin rejenerasyondaki rolü tartışmalıdır, ancak bu hücrelerin karaciğer hasarının belirli tiplerini tamir etmek için önemli oldukları kabul edilmektedir. Genel olarak hücre tipleri ve karaciğer tamirinden sorumlu mekanizmalar karaciğer hasarının tipine göre belirlenmektedir. Buna ek olarak endojen hücreler ile doku replasmanı (yani rejenerasyon), transplante edilen donör hücreler ile rekonstitüsyondan (yani populasyonun yenilenmesi) ayırt edilmelidir. Bu nedenle karaciğer kök hücrelerinin tanımı normal doku turn-overından sorumlu olan hücreleri, parsiyel hepatektomiden sonra rejenerasyona yol açan hücreleri, progenitör bağımlı rejenerasyondan sorumlu olan hücreleri, transplante edilebilen karaciğer populasyonunu yenileyen hücreleri ve *in vitro*'da hepatosit ve safra kanalı epitelial fenotiplerini oluşturan hücreleri kapsamaktadır [34].

Kemik İliği Kök Hücreleri:

Kemik iliği (Kİ) uzun yıllar boyunca öncelikle HKH kaynağı olarak görülmüştür. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda kemik iliğinde embriyonun epiblastında bulunan çok küçük embriyonik benzeri bir kök hücre populasyonunun olduğu da tespit edilmiştir [137]. Böylece yeni tanımlamaya göre kemik iliğinin içerdiği hücreler temelde iki ana kategoriye ayrılmıştır; HKH ve MKH [88].

Kİ multipotent erişkin progenitör hücreleri (MAPC'ler) adı verilen nispeten az bulunan adherent bir kök hücre populasyonu, birkaç ay boyunca belli büyüme faktörleri içeren (örn., epidermal büyüme faktörü ve platelet kökenli büyüme faktörü) büyüme ortamında kemik iliği hücrelerinin *in vitro* büyümesiyle izole edilebilirken, nispeten düşük hücre yoğunluğu 0.5-1.5 $\times$ 10^3 hücre/cm^2 muhafaza edilebilmektedir. MAPC'ler, klasik

endodermal, mezodermal ve ektodermal olarak elde edilen hücre türleri olan hepatosit, endotelyal hücreler ve nöronları *in vitro* olarak oluşturma özelliğine sahiptir. MAPC'lerin pluripotansileri *in vivo* olarak da doğrulanmıştır; MAPC'ler, MAPC'lerin erken blastosistlere enjeksiyonundan elde edilen birçok fare dokusuna katkıda bulunabilmektedir (bunlara beyin, retina, akciğer, miyokard, iskelet, kas, bağırsak, böbrek, dalak, Kİ, kan ve cilt dahildir). Aynı zamanda MAPC'ler subletal olarak ışınlanmış erişkin obez olmayan diyabet/şiddetli bileşik immunohasarlı (NOD/SCID) farelere intravenöz olarak verildiğinde hematopoietik dokular (kan, kemik iliği ve dalak) ile akciğer, karaciğer ve bağırsakların epitelyal hücrelerini aşılayabilmektedir. Hematopoietik hücrelerden farklı olarak, farklılaştırılmamış MAPC'ler CD45, c-Kit, veya Sca1 ifade etmemektedirler. Bu hücreler MKH 'lerin ender bir alt populasyonunu temsil etmekte, ya da saflaştırılmaları için kullanılan uzun süreli *in vitro* kültür şartlarının bir yan ürünü olabilmektedirler [114]. Erişkin kemik iliğinden alınan hematopoietik kök hücreler iyi özelliklidir ve uzun süredir terapötik olarak kullanılmaktadır. 70 kg ağırlığındaki bir erişkinin yaklaşık 1.75 L işlevsel hematopoietik ilik hacmi vardır ve enfeksiyon ya da hemoraj gibi artan talepler halinde altı katına çıkabilmektedir. Otolog olduklarından veya rıza gösteren bir vericiden alındıklarından dolayı, bu hücrelerin kullanımıyla ilgili ahlaki bir tartışma da bulunmamaktadır. Erişkin kemik iliği hücrelerinin potansiyel kullanımları mezenkimal kök hücre ile ilgili keşiflerle birlikte hız kazanmıştır.

Hematopoietik kök hücreler (HKH) kemik iliği (Kİ) içerisinde spesifik nişlere yerleşmiştir ve kemik iliği mikroçevresinden sağlanan sinyallere bağlı olarak ya daha fazla kök hücre ya da olgunlaşma sürecine giren hematopoietik soylar meydana getirmektedir. Bu mikroçevre; sitokin olarak adlandırılan çözünebilir bileşenlerin yanı sıra hücresel bileşenlerden oluşmaktadır. Terapötik ajanlar, bir kök veya progenitör hücrenin kemik iliği mikroçevresindeki matriks moleküllerine ve stromal hücrelere bağlılığını bozabilmektedir. SCF veya CXCR4-stromal kaynaklı faktör-1 gibi sitokin reseptörü ekseni kesildiği zaman kök ve progenitör hücreler stromal hücreler ile bağlantılarını kesmektedirler. Dolaşımdaki periferal kan HKH'lerinin sayısı, ilaç ve kemokinler ile tedaviye cevap olarak artabilmektedir. Bir kök hücre, bağlantısını kaybeder kaybetmez bazal membran ve bir kan sinüsünün endotelial astarının açılışı ile transmural membran migrasyonuna uğramakta ve dolaşıma geçmektedir. Kİ-HKH'leri

çok uzun zamandan beri klinik transplantasyonun ana kaynağı olarak kullanılmaktadır, ancak günümüzde periferal kök hücrelerin ve kordon kanının mobilizasyonu ve toplanmasındaki gelişmeler ile uygulaması gitgide azalmaktadır [8].

Mezenkimal kök hücreler (MKH), bağ dokuların devamına ve rejenerasyonuna katılan hematopoietik olmayan kök hücrelerdir. MKH'ler, Friedenstein'in tekniğini takiben adherent kemik iliği hücre kültüründen izole edilmiş ve osteositler, kondrositleri, adipositleri, miyositleri, astrositleri, nöronları, endotelial hücrleri ve akciğer epitelial hücrelerini içeren çeşitli hücre soylarına farklılaşmaları indüklenebilmiştir [8]. MKH'ler, genel olarak mezenkimal hücre soylarına (adipositler, kondrositler ve osteositler) farklılaşma yeteneklerine göre tanımlanmaktadır. Ancak her bireyin kemik iliği kaynaklı MKH kolonilerinin değişik derecelerde plastisite gösterdiklerini unutmamak gerekir [124]. Bununla birlikte bir bütün olarak, Kİ kaynaklı MKH'ler CD44 (hiyaluranat reseptörü), CD73 (SH3/SH4; ekto-5'-nukleotidaz), CD105 (SH2, endoglin) ve CD166'yı (ALCAM) içeren spesifik membrana bağlanan yüzey antijenleri eksprese etmektedir. CD45, CD34, CD31, Mac1 (CD11b), CD19 ve glikoforin A ekspresyonlarının eksikliği MKH'leri sırasıyla hematopoietik hücreler, endotelial hücreler, endotelial progenitörler, monositler, B hücreleri ve eritroblastlardan ayırt etmektedir [115].

Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücreler:

Adipoz doku tıpkı kemik iliği gibi mezenkimden köken almakta ve zengin bir kök hücre kaynağı sunmaktadır. Bu hücre grubuna, işlenmiş lipoaspire hücreler [processed lipoaspirate (PLA)] adı verilmektedir. Adipoz doku kaynaklı kök hücreler yağ dokusundan genellikle yağ emme metoduyla lokal anestezi altında alınıp *in vitro* kültürü yapılarak elde edilen pluripotent kök hücrelerdir.

Kemik iliğinde bulunan mezenkimal kök hücreler kadar, farklılaşma yeteneğine sahip olan yağ dokusu kök hücrelerinin elde edilmesi de kemik iliğine göre daha az acı vericidir. Lokal anestezi altında, büyük miktarlarda elde edilebilen yağ dokusundaki otolog erişkin yağ kök hücrelerinin bulundukları doku ve organlarda küçük hasarların giderilmesinde rol oynadığı ve *in vitro* ortamda bu fibroblast benzeri hücre topluluğunun adipojenik, kondrojenik, miyelojenik, ve osteojenik farklılaşma

yetenekleri gösterilmiştir [116]. Doku hasarlarında erişkin otolog kaynak olma potansiyeli sebebiyle rejeneratif tıpta farklı biyomateryaller ile birlikte de kullanılabilmeleri ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ciddi kemik hasarlarının onarımında da kullanılabileceği öne sürülebilmektedir. Mezenkimal kök hücrelere alternatif olarak, doku mühendisliğinde farklı biyomateryaller üzerinde farklılaştırılarak çeşitli rejeneratif tedavilerde kullanımları üzerinde de çalışmalar yapılmaktadır [117].

Kalp Kası Kök Hücreleri:

Multipotent kardiyak kök hücreler, yetişkin kalbinde son zamanlarda tanımlanmıştır ve yerleri belirlenmiştir. Böyle kök hücreler orijinal olarak gelişen kalp dokusunda gözlenmiştir. Böylece yetişkin kalbinde tamire dayanan intrinsik kök hücrelerin varlığından şüphelenilmiştir. Şu anda iyi belirlenmiştir ki genç bireylerde daha az sayıda olmasına karşın böyle dokularda kök hücreler bulunmaktadır.

Kardiyak kök hücrelerin miyokardiumun temel hücre tiplerini oluşturan miyositlere, endotelial hücrelere ve düz kas hücrelerine diferansiye olma yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir [6]. Hasarlı miyokardiyumun rejenerasyonunda rol oynayan kardiak progenitor hücreler bulunduğu gösterilmiştir [118, 119]. Bununla birlikte beyinde olduğu gibi kalp kök hücrelerinin *in vivo*'da hasarlı kalp dokusunun tamirindeki rolü hala tam olarak anlaşılamamıştır [6].

Gözdeki Kök Hücreler:

Gözün değişik bölgelerinde kök hücrelerin tanımlandığı üç kompartman vardır; kornea, konjuktivita ve retina. Bunların üçünden korneanın kök hücreleri limbal epiteliyal kök hücreler rutin klinik uygulamadadır. Konjuktivital kök hücrelerin varlığı iyice kanıtlanmıştır, fakat yerleşimleri kesin olarak belirlenememiştir. Retinal kök hücrelerin saptanması, örneğin makula dejenerasyonu gibi yaşa bağlı körlüğe sahip hastalarda fonksiyonel bir retinanın yeniden yapılandırılmasında böyle hücreler üzerindeki çalışmalara öncülük etmektedir [6].

Pankreatik Kök Hücreler:

Beta hücrelerinin homeostasisinde pankreatik kök hücrelerin varlığı ve rolü sorusu diyabetli kişilerin artan sayısı ile birlikte gelmektedir. Kadavra donörlerden beta

hücrelerinin transplantasyonundan elde edilen sonuçlar pankreatik kök hücre için araştırmaları teşvik etmektedir. Birçok kanıt, duktal bölgeler veya adacık bölgelerinde pankreatik kök hücrelerin varlığını göstermektedir, fakat kök hücre nişinin lokalizasyonu tam olarak bilinmemektedir. Pankreatik kök hücreler/progenitör hücreler son zamanlarda pankreatik kanal epitelinden izole edilmiş ve böyle hücrelerin endokrin hücrelere diferansiye olma yeteneği kanıtlanmıştır. Ancak böyle hücrelere dayanan bir tedavi henüz çok ileridedir [6].

Amniyon Sıvısı Kök Hücreleri:

Amniyotik sıvı kök hücreleri hem embriyonik hem de yetişkin kök hücreler için değerli bir alternatif olarak görülmektedir. 2007 yılında hamile kadınlar tarafından bağışlanan amniyon sıvısında kök hücrelerin varlığı tespit edilmiştir. Amniyon sıvısındaki kök hücrelerin varlığı bilim dünyasında çığır açacak yeni bir bulguyu temsil etmektedir. Artık amniyotik sıvı kök hücrelerinin rutin antenatal testler (amniyonsentez) yoluyla kolayca ulaşılabilir bir kaynak olduğu bilinmektedir. Herhangi bir aşamada bebeğin hayatına zarar vermeksizin elde edildiği için embriyonik kök hücrelerin kullanımındaki gibi etik tartışmaları da ortadan kaldırmaktadır.

Amniyotik sıvı kök hücreleri, yetişkin kök hücrelerden dada geniş bir diferansiyasyon yeteneğine sahiptir. Yapılan çalışmalarda bu hücrelerin OCT–4 eksprese ettiklerini ve nöron, kemik, kıkırdak, adiposit ve düz kas hücrelerine farklılaşma yetenekleri olduğunu göstermiştir [120, 121, 122, 123, 124, 125, 126].

Kanser Kök Hücreleri:

Kanser kök hücreleri (KKH), kendini yenileme, diferansiyasyon, doku rekonstitüsyonu ve çoklu ilaç direnci gibi kök hücre özellikleri sergileyen kanser hücrelerinin seyrek bir populasyonu olarak tanımlanmaktadır. Tümör başlatıcı kapasiteleri ile sitotoksik ilaçlar ve radyasyona dirençlerinden dolayı KKH'leri sadece primer tümör oluşumu ile değil aynı zamanda metastaz ve kanser nüksleri ile de ilişkilendirilmektedir.

KKH'lerinin karakteristik bir özelliği; onları anti-proliferatif ajanlara dirençli hale getiren düşük bölünme ve proliferasyon oranı ile sessiz durumlarıdır. Bu gerçek büyük olasılıkla çoğu güncel terapinin başarısızlığı için sebeplerden biridir: tümör içindeki

hücrelerin büyük çoğunluğu öldürülse bile birkaç ay veya yıl içerisinde tümörü yeniden oluşturmaya hazır bir şekilde kendini yenileme potansiyeline sahip KKH'lerinin küçük bir populasyonu hala oradadır. Aslında KKH'lerinin terapiye direnci normal kök hücrelerden daha yüksektir.

KKH modeli kanser tedavisi için yeni fırsatlar açmıştır. Geleneksel kanser tedavileri, diferansiye olmuş, kendini sınırlayan transit amplfying kanser hücrelerine karşı etkindir. Konvansiyonel tedaviler tarafından hedeflenen transit amplfying hücreler kendini yenileme kapasitesi olmaksızın henüz yüksek, fakat sınırlı proliferasyon kapasitesi ile daha geniş bir sınıf oluşturan KKH'lerinin asimetrik olarak soyundan gelen kuşaktır. Diferansiye hücreler tipik olarak KKH'lerinden daha az aktif DNA tamir sistemlerine ile kemoterapi ve radyoterapiye karşı daha yüksek hassasiyete sahiptir. KKH'lerini hedefleyen terapiler KKH havuzunu tüketmeyi hedeflemektedir. KKH'lerini hedefleyici terapiler; KKH yüzey molekül bağlanması, onkoprotein inhibisyonu, KKH regülasyon yolağı bozulması ve KKH terapi direnci makinelerinin önlenmesi yoluyla gerçekleştirilebilir. KKH ile yönlendirilmiş terapiler için hedeflerin hiçbir sıkıntısı bulunmamaktadır. Ancak ideal bir KKH hedefleyici ajan KKH normal kök hücrelerden ayırt etmelidir. Aynı zamanda hedeflenmiş tedavilerin etkinliğini izlemede KKH'leri için fonksiyonel ölçüm teknikleri KKH hedefleyici terapiler için kritiktir [8].

Göbek Kordonu:

Bazen *funiculus umbilicalis* veya doğum kordonu olarak da adlandırılan insan göbek kordonu, fetüs ile plasenta arasındaki ilişkiyi sağlayan, hem yapısal hem de fonksiyonel olarak basit görülmesine karşın gelişmekte olan fetüsün yaşamında kritik bir rol üstlenen yaşam bağıdır. Plasenta-fetüs arasındaki ilişki, göbek kordonu aracılığıyla sağlanmaktadır.

İnsan göbek kordonu, embriyolojik gastrulasyonun 26. gününde fetüs ile plasenta arasında oluşmakta; arter, ven ve allantoisi kapsayan göbek sapı ile omfalomezenterik sap ve orijinal yolk kesesi bağlantısının kalıntısını kapsayan yolk kesesinden şekillenmektedir. Kordonun dış yüzeyi mat beyaz renkte ve nemlidir. Normal olarak plasentanın koryonik villusunda kan damarları ile süreklilik gösteren iki umbilikal arter ve bir umbilikal venden oluşmaktadır. Göbek kordonunda kılcal damar ve lenfatikler

bulunmamaktadır. Damarlar, amniyon tarafından çevrelenen Wharton Jeli olarak bilinen jelatinimsi madde olan bir koruyucu ile çevrelenmiştir [127, 128, 129, 130].

Wharton jeli müköz bağ dokusundan oluşmaktadır. Wharton jelinde bulunan glikoprotein mikrofibrilleri ve kollajen fibrillerle ilgili çalışmalar mevcuttur. Ağsı yapıdaki kollajen lifler ile küçük dalgalı kollajen demetleri göbek kordonunun etrafını sararak süreklilik arz eden bağ doku iskeletini oluşturmaktadır. Yoğun olarak glikozaminoglikan olan hyaluronik asiti içeren Wharton jeli, fibroblastlar ile kollajen lifler etrafında sulu bir jel oluşturarak göbek kordonunu basınçtan koruyan bir doku mimarisi oluşturmaktadır [131].

Göbek kordonu, göbek kordon kanının ana rezervuarı olarak, normalde iki umbilikal arter ve tek venden oluşmaktadır. Bu damarlar Wharton jeli olarak bilinen ve proteoglikanca zengin bir matrikse gömülü olarak bulunmaktadır. Temel olarak iki arter, bir ven ve bu yapıları çevreleyen Wharton jelinden oluşan göbek kordonu, intrauterin dönemde fetal ve maternal kan arasında doğrudan bir temas olmaksızın anne ve bebek arasındaki besin, oksijen ve karbondioksit alışverişinin gerçekleşmesinde rol oynamaktadır. Oksijene kanı umbilikal ven aracılığı ile fetal portal dolaşıma ve duktus venosus'a (dolayısıyla kalbe), deoksijenize kanın ise umbilikal arter aracılığı ile fetal dolaşımdan maternal dolaşıma aktarılmasında görev almaktadır [134, 135].

Göbek kordonu içindeki kan damarları normalde beklenenden farklı işlemektedir. Umbilikal arterler ve vende görülen bu normalden farklı işleyişin insan fizyolojisindeki tek diğer örnek akciğer ve kalbi birleştiren pulmoner venlerde görülmektedir.

Wharton Jeli:

Thomas Wharton tarafından ilk kez 1656'da tanımlanan bu jel, poliüretan yastığı gibi, plasenta ve fetüs ile bağlantılı olan ve önemli bir iletim cankurtaranı olan kordonu korumaya yardım eden fiziksel özelliklere sahiptir. Son yıllarda kordon veninin yanında kök hücrelerin elde edilmesi için WJ'nin (Wharton jeli) de kullanılabileceği gösterilmiştir. Göbek kordonundan kök hücre elde edilmesinde sıklıkla kordon veni ya da Wharton jeli kullanılmakta, hücreler bu iki kaynaktan izole edilmekte ve kültürü yapılabilmektedir. Romanov 2003'te, Mezenkimal kök hücre (MKH) benzeri hücrelerin

insan göbek kordon veninin alt endotelial katmanında bulunduğunu ve başarıyla izole edilebildiğini, kültürünün yapılabildiğini ve rutin teknik yöntemlerle çoğaltılabilir olduğunu bildirmiştir. Morfolojik çalışmaların ve insan göbek kordonundan elde edilerek kültürü yapılmış MKH benzeri hücrelerin immunotiplendirmesi ile bu hücrelerin kemik iliği hücrelerinden ve diğer kaynaklardan elde edilerek kültürü yapılmış mezenkimal hücreler ile benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir [136, 137]. Ayrıca, atılmış ya da özel olarak izole edilmemiş insan göbek kordonu perivasküler hücrelerinin, fonksiyonel mezenkimal fenotip özellik gösterme yeteneğine sahip bir alt grup (subpopulation) hücreleri de içerebildiği gösterilmiştir. McElreavey de WJ'ni bir diğer alternatif mezenkimal kök hücre kaynağı olarak bildirmiştir. Daha sonra Naughton ve Purchio göbek kordonu-WJ'nden öncü kıkırdak hücrelerini izole etmesinin ardından Mitchell benzer bir yaklaşım kullanarak WJ'den nöral hücrelere diferansiye olabilen fibroblast benzeri hücreleri izole etmiştir [138].

Göbek Kordon Kanı:

Önceleri bir ameliyat atığı olarak görülen göbek kordon kanı (GKK), hem laboratuvarda hem de klinik ortamda, kemik iliği transplantasyonu ile ilgili sorunların birçoğunu ortadan kaldırmıştır. GKK hücre transplantasyonu, Fanconi anemisi hastası 5 yaşındaki bir çocuğu tedavi etmek için ilk kez 1988'de başarı ile kullanılmıştır. Daha sonra, çoğunluğu akrabalık ilişkisi olmayan donörlerden olmak üzere, 6.000'den fazla GKK transplantasyonu yapılmıştır. Kemik iliği gibi, GKK kullanımı da şu ana kadar hematopoietik hastalıklar, kemik iliği hastalıkları ve bağışıklık sistemi yetersizliği hastalıkları ile sınırlıdır ancak mevcut araştırmalar bunun çok daha güçlü bir klinik silah olabileceğini göstermektedir [139].

GKK, periferal kan ve kemik iliği gibi diğer HKH kaynakları ile karşılaştırıldığında çok sayıda lojistik ve klinik avantajlara sahiptir. Bu avantajlar; dünyada hemen hemen sınırsız bir kaynak olması, GKK bankalarındaki dondurulmuş birimlerin hemen kulanılabilmesi ve Kİ'ne kıyasla ortalama bekleme süresinin 25-36 gün azalması, HLA sisteminde iki uyumsuzluğa kadar tolerans olması nedeniyle donör havuzunun artması, graft versus host hastalığının (GVHD) sıklığı ve şiddetinin azalması, sitomegalovirüs ve Epstein Barr Virüsü gibi öldürücü infeksiyonların geçiş riskinin azalması, donör için bir

risk bulunmaması şeklinde sıralanabilmektedir. Bu nedenle GKK, Kİ ve aferez ile başarılı bir şekilde yer değiştirebilecektir [102].

İnsan Göbek Kordon Kanı Hücreleri:

GKK'nın hücresel bileşimi çoğunlukla lenfositler ve monositlerden oluşmaktadır. Bu, GKK' nın erişkin periferik kan ile karşılaştırıldığında benzer bir B-lenfosit populasyonuna, daha düşük mutlak T-lenfosit sayısına (CD3+) ancak daha yüksek CD4+/CD8+ oranına sahip olduğunu gösterir. GKK ayrıca, daha fazla doğal katil (Natural Killer NK) hücreye ve daha düşük sayıda CD56+ sitotoksik T-lenfositine sahiptir. GKK'nin erişkin hücre kaynaklarına göre farklılaşmamışlığı, daha yüksek sayıda erişkin olmayan T-lenfosit oranı (CB45RA+) azalan erişkin hafıza T-lenfosit (CD45RO+) sayısı ile karakterize edilmektedir. GKK hücreleri ayrıca, erişkin hücre kaynaklarından daha az mutlak sitokin düzeyleri üretmektedir. Ek olarak, GKK'da ifade edilen mRNA ile ilgili olarak antiinflamatuar sitokinler interferon-γ (INF-γ), interlökin (IL)-4 ve IL-10, proinflamatuar sitokin IL-2'den daha yüksek miktarda olduğu görülmektedir. Bu olgun immün işlev eksikliği, GKK'nın düşük GVHD insidansının göstergesidir. Bu hücresel yapı, daha zayıf GVH gerekliliklerine ve dolayısıyla, tedavi için daha kısa bekleme sürelerine yol açacaktır. Rocha, GVHD insidansının, GKK transplantasyonu geçiren çocuklarda, kaynak HLA-identik kardeş olduğu takdirde, kemik iliği alan çocuklardan daha düşük olduğunu göstermiştir. Rocha ayrıca, ilişkisiz HLA eşleşmesi olmayan GKK alıcılarında, HLA-identik kemik iliği alıcılarına göre daha düşük bir GVHD insidansı olduğunu göstermiştir [140, 141].

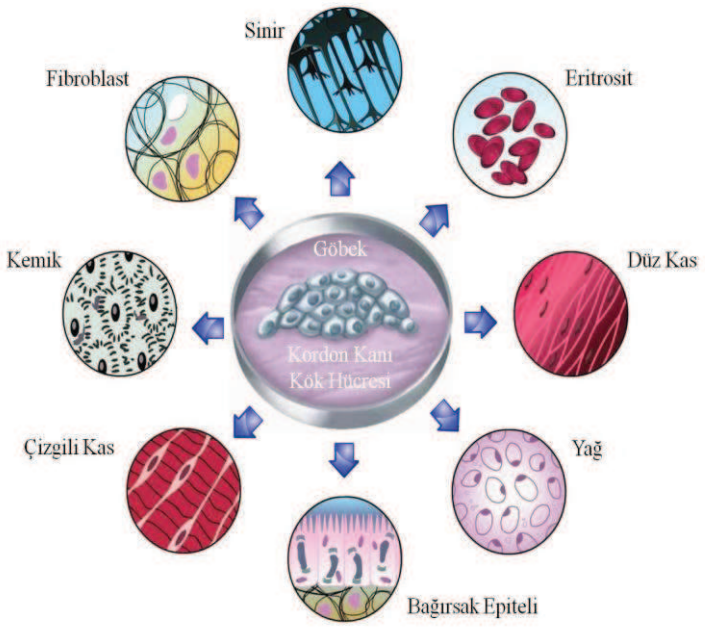
GKK' nın transplantasyonlar için uygun kök hücre kaynağı olarak seçilmesi, erişkin kaynaklar ile karşılaştırıldığında bunun daha büyük bir hematopoietik kök/progenitör hücre populasyonu içerdiğinin bulunması ile başlamıştır. Bu kolaylıkla elde edilebilen, düşük immunojenik multipotansiyel hücre kaynaklarının, özel koşullar altında vücuttaki herhangi bir hücre türüne dönüşebilme kabiliyetine sahip oldukları düşünülmektedir. GKK'nın yaklaşık % 1 CD34+ hücresi içermesi, bunun erken hematopoiezdeki rolü için bir marker görevi görmesine karşın, bu hücreler, Kİ'de bulunanlardan daha ham görünmektedir. Genel olarak, bir hücrenin olgunluk düzeyi, hücrenin hücre yüzey antijenlerinin varlığı ya da yokluğu ile tanımlanmaktadır. Örneğin, GKK'deki CD34+ populasyonu, daha yüksek bir oranda prelenfoid hücreler için bir marker olan CD38 için

negatif olmaları nedeniyle Kİ'de bulunanlardan daha öncül olarak tanımlanabilmektedir. GKK'de göreceli olarak daha yüksek sayıda bulunan CD34+ hücrelerin diğer bir alt kümesi, daha ilkel olan CD133+ hücrelerdir. CD133+ hücreleri, fetüs beyninde tanımlanmıştır ve bu alanda, nöral kök hücreler (NKH) olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte GKK'de bulunan CD133+ hücrelerinin fenotipik olarak ve işlevsel olarak fetüs beyninde bulunan NKH'ler ile aynı olup olmadığı bilinmemektedir.

Göbek Kordon Kanı Kök Hücreleri:

Ekstra embriyonik dokulardan olan, plasenta ve göbek kordonu, embriyonun vücuduyla birleşik olmamasına rağmen embriyonun gelişimi için zorunlu olan ve tek bir totipotent zigot hücresinden veya fertilize yumurta hücresinden gelişen hücreleri içermektedirler. Bebeğin doğumunun ilk yarım saati içerisinde alınan plasenta ve göbek kordonu kanı erişkin kök hücreler için önemli bir kaynaktır. Kordon kanı kök hücrelerinin avantajları: genç hücreler olmaları; yaşayabilme yeteneklerinin yüksek olması; fazla sayıda elde edilebilir olmaları ve alıcıya kolay uyum sağlamalarıdır. Kordon kanı elde edildikten sonra eritrositler uzaklaştırılarak, dondurularak, sıvı azot içerisinde kordon kanı bankacılığı arşivinde saklanmaktadır. Göbek kordonu kanı, kök hücre kaynağı olarak 1988 yılından beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca, kemik iliği ve kordon kanından elde edilen kök hücre nakilleri, radyoterapi ve kemoterapi sonrasında hasar gören kan hücrelerinin yerine konulmasını sağlamak amacıyla kanser tedavisinde kullanılmaktadır [142].

GKK klinik uygulamaları, hematolojik rejenerasyona odaklanmıştır. Ancak araştırmalar, heterojen MNC populasyonunun, osteoblastlar, kondroblastlar ve hatta nöronlar ve astrositlere farklılaşabileceğini göstermektedir (Şekil 2.4). GKK'nın, içerdiği yüksek kök/progenitör hücre oranı nedeniyle, çeşitli hastalıkların tedavisi için tartışmalı embriyonik ve fetal kök hücrelerin kullanımına bağımlılığın yerini alabileceği düşünülmektedir. Doğru koşullar altında yönlendirildiğinde, GKK hücrelerinin multipotent niteliğini gösteren çalışmalar yayınlanmıştır.



Şekil 2.4: Kordon kanı kök hücrelerinin *in vitro* şartlarda farklılaşma özelliği.

İnsan Göbek Kordon Kanının Klinik Uygulamaları:

İnsan göbek kordonu kanı kök hücreleri (İGKK-KH), erişkin kemik iliği kök hücrelerinin (Kİ-KH) tersine, daha az olgundur ve dolayısıyla daha az immünojeniktir ve uzun ömrü ve daha uzun telomerler ile ilişkilendirilen daha yüksek bir yayılma potansiyeli bulunmaktadır. Kordon kanı hücreleri 15 yıldan uzun süredir klinik uygulamaların bir parçasıdır ve klinik transplantasyon konusunda belirli avantajlar sunmaktadırlar. Kordon kanının, hematopoietik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler ve endotel prekürsör hücreleri içerdiği gösterilmiştir [143].

Kordon kanı kök hücreleri sürekli genişleyen rejeneratif ilaç alanında çok büyük bir potansiyele sahiptir. Kordon kanı içerisinde adherent kültürde büyüyen ve pluripotensi kaybı olmaksızın 10^{15} hücreye kadar çoğalabilen pluripotent $CD45^-$ hücrelerin seyrek bir populasyonu tanımlanmıştır. Bu $CD45^-$ populasyonunun osteoblastlara, kondroblastlara, adipositlere, hematopoietik hücrelere ve nöral hücrelere diferansiye olma yeteneklerinin olduğu gösterilmiştir. $CD45^-$ populasyonundan türeyen nöral hücreler nörofilamentleri, sodyum kanal proteinlerini ve nörotransmitter fenotipleri ekspresse eden astrositleri ve nöronları içermektedir. $CD45^-$ hücrelerin yetişkin sıçan beynine transplantasyonu; post-transplantasyon için 3 aya kadar insan Tau-pozitif

hücrelerin varlığını ve tipik nöron morfolojisini göstermiştir. Açıkçası, kordon kanı kök hücreleri nörodejeneratif hastalıkların gelecekteki tedavisinde ve travmatik yaralanmalardan sonra merkezi sinir sistemini tamir etmede bir potansiyele sahiptir [102].

1940 yılında, yeni doğanların göbek kordonunda kemik iliğindeki kök hücrelere benzer hücrelerin olduğu fark edilmiş, bunların tedavi amaçlı olarak kullanılabileceği düşünülmüş ve 1948 yılından itibaren tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır. Kordon kanı kaynaklı kök hücrelerin (hematopoietik kök hücrelerin) kan sisteminin yeniden yapılandırılmasına yönelik tedavilerde kullanılmasındaki temel çıkış noktası esas olarak üç nedene dayanmaktadır: Bu kaynaktan elde edilen kök hücreler çok gençtirler (immatür hücreler), diğer erişkin kaynaklı kök hücrelerle karşılaştırıldığında daha yüksek telomeraz enzim aktivitesine sahiptirler (dolayısıyla daha fazla çoğalma potansiyeline sahiptirler), yaşanmışlığın yıpranmışlığı olarak da adlandırabileceğimiz yaşlanma, radyasyon, güneş ışınları, toksinler, kimyasallar ve enfeksiyonlar sonucu oluşabilen DNA replikasyonundaki hatalar dolayısıyla ortaya çıkabilecek mutasyonları içerme olasılığı daha azdır. Kordon kanı kök hücrelerinin (KKKH) kan sistemini yerine koymayı amaçlayan tedavi protokollerinde kemik iliği ve periferik kan kök hücrelerine alternatif bir kaynak olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar artmaktadır. Son yıllarda hücre esaslı tedavilerde (rejeneratif ve reparatif tıp amaçlı) kullanılmasına yönelik girişimler de belirgin şekilde artmıştır. Bazı araştırmacılar, deneysel inme/felç (stroke) modelinde (Wistar sıçanlarda orta serebral arter oklüzyonu ile) ve deneysel musküler distrofi modelinde disferlin-noksan farelere insan KKKH'lerini uygulayarak olası tedavi edici etkilerini araştırmışlardır. Sonuçta, her iki çalışmada da önemli fonksiyonel iyileşmenin olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar, KKKH'lerinin *in vivo* plastisitesini ve rejeneratif/reparatif tıptaki olası kullanım alanları gösteren önemli bir kanıt olarak sunulmuştur. Ayrıca, insan kordon kanı kök hücrelerinin NOD-SCID farelere infüzyonu sonrası, hücre füzyonu olmaksızın hepatositlere transdiferansiye oldukları tespit edilmiştir. Son olarak, Güney Kore'de 20 yıldır felçli olan bir kadının, kordon kanı kök hücreleri kullanarak yeniden yürümesinin sağlandığı bildirilmiştir [144].

Kordon kanından nakil için hücrelerin bir diğer olası kaynağı klinik olarak kullanışlı sayılara kadar çoğaltılabilen $CD34^+$ endoteliyal prekürsör hücrelerin (EPC) kültüründen

elde edilebilir. Bu hücrelerin *in vivo*'da vaskular yapıları oluşturmak için prolifere olduğu ve deneysel olarak indüklenen miyokardiyal infarktüsü iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu hücreler yerleştirildikleri miyokardiyal infarktüse göç ederler ve neoanjiyogeneze katılırlar, böylece postinfarktüs tamirinde yeniden modelleme sürecine yarar sağlarlar. Benzer çalışmalar, kordon kanından elde edilen $CD34^+$ hücrelerin miyokardiyal infarktüsü takiben ventriküler fonksiyonu önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmalar akut miyokardiyal infarktüs ve belki de kardiyomiyopatide kordon kanı kök hücreleri için potansiyel bir role işaret etmektedir.

Deneysel araştırmalar, kordon kanı kök hücrelerinin aynı zamanda hem tip-1 hem de tip-2 diyabetin tedavisinde potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Özetle kordon kanı kök hücreleri hematolojik malignansiler ve hastalıklar ve kanser tedavisinde yüksek doz kemoterapiyi takiben kemik iliğinin tamiri için kök hücrelerin hazır, uygun bir kaynağını temsil etmektedir. Gelecekteki uygulamalar muhtemelen geniş bir alanı kapsayacaktır ve gelecek yıllarda önemli tedavileri temsil edecektir [102].

3. MALZEME VE YÖNTEM

Çalışmamızda, insan göbek kordon kanından izole edilen hücrelerin, kök hücre olduğunun saptanması, bu hücrelerin *in vitro*'da farklı ortamlarda yetiştirilerek, ortam şartlarına adaptasyonlarının belirlenmesi, kültür ortamında sürekliliğinin sağlanması amaçlanmıştır.

3.1. KULLANILAN HÜCRELERİN ELDE EDİLMESİ VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

3.1.1. Göbek Kordonu İçin Taşıma Ortamı Hazırlanması

Çalışmamızda kullanacağımız insan göbek kordon kanını, doğum kliniğinden laboratuarımıza taşımak için, hayvan doku kültürü laboratuarımızda her bir donör için tek kullanımlık 50 ml'lik steril şırınga içerisine antikoagülant olarak 45 µl heparin (5 IU/ml) steril kabin içinde çekildi, iğnenin ağzı steril olarak tekrar kapatılarak şırınga hazırlandı. Kordon kanı alındıktan sonra işleme konulmadan önce oda sıcaklığında tutulması gerektiğinden kapalı bir taşıma kutusu sağlandı.

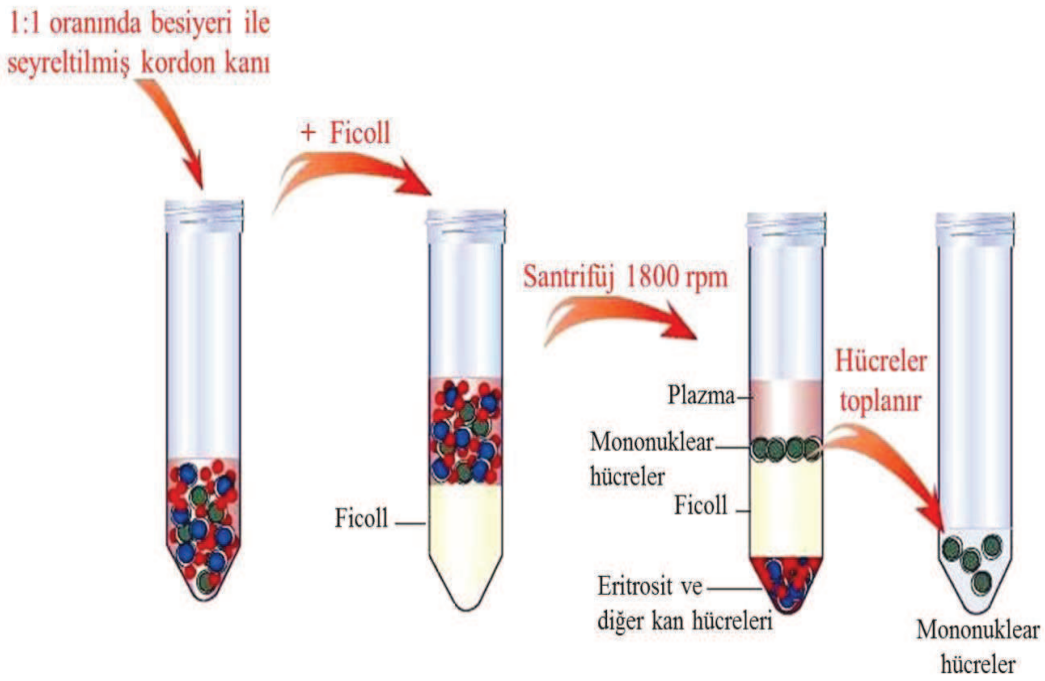
3.1.2. Etik Kurul Onayı Alınması

Çalışmamızın Etik Kurul Onayı, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 25.11.2010 tarih ve 937 sayı ile onaylanmıştır (Ek 1).

3.1.3. Göbek Kordon Kanından Mononuklear Kök Hücrelerin İzolasyonu

Mezenkimal kök hücrelerin kaynağından alındıktan sonra izolasyonu için çalışmamızda yoğunluk farkıyla ayırma yöntemi kullanıldı. Çalışmamızda mononuklear hücrelerin Ficoll, yoğunluk gradienti yöntemi ile ayrılmasında, literatürde önerilen 1800 rpm santrifüj hızı kullanıldı. Bu amaçla, laboratuvara getirilen kordon kanı, 1:1 oranında seyreltilmek üzere 50 ml konik falkon tüplerine bölündü. Üzerine eşit hacimde 100x AntiAnti (100 IU/ml Penisilin, 100 µg/ml Streptomisin ve 0.25 µg/ml Amfoterisin B

olacak şekilde besiyerine eklenmiştir) içeren besiyeri eklendi. Tüpler hafifçe alt-üst edilerek besi yeri ve kanın karışması sağlandı. Temiz 50 ml konik falkon tüplerine kan ile eşit hacimde Ficoll eklendi. Seyreltilmiş kan ve besiyeri karışımı 10 ml'lik serolojik pipet yardımıyla tüpün kenarından 45°'lik açı ile Ficoll üzerinde faz oluşturacak şekilde yavaşça eklendi. Tüplerin ağzı sıkıca kapatılarak hiç sarsmadan santrifüj cihazına konuldu ve 20°C'da 1800 rpm'de 30 dakika santifüj edildi. Santrifüjden sonra mononuklear hücreler Ficoll (1.077 g/L) solüsyonundan daha düşük yoğunluğa sahip oldukları için bu solüsyonun üzerinde bir sis tabakası halinde görüldü. Üst kısımda oluşan plazma tabakası daha sonra kullanılmak üzere pasteur pipeti yardımıyla ayrılarak temiz bir tüpe aktarıldı. Daha sonra tüm tüplerde Ficoll ile plazma arasındaki sis tabakası gibi görünen mononuklear hücreler tek kullanımlık steril pasteur pipeti yardımıyla çekilerek 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine alındı, üzerine 5 ml 1x AntiAnti içeren besiyeri eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika 1200 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde kalan pellet üzerine 100 µl Eritrosit Lizis Tamponu (Red Blood Cell Lysis Buffer) eklendi. Pellet pipetaj ile tampon içinde resüspanse edildi, oda sıcaklığında arada karıştırılarak 10 dakika bekletildi. 1200 rpm'de 25°C'da 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Yoğunluk farkıyla kordon kanından mononuklear hücrelerin izolasyonu.

3.1.4. Hücrelerin Kültüre Alınması

İzolasyonun ardından süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra geriye kalan pellet % 20 HyClone FBS (Hyclone Fetal Bovine Serum) 1x Anti Anti ve 2 mM Glutamax içeren 7.5 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyeri içinde süspanse edilerek 25 cm^2'lik kültür kaplarına ekildi. Çalışmamızda farklı besiyerlerinin insan göbek kordon kanı mezenkimal kök hücreleri üzerine etkisinin belirlenmesi için RPMI 1640 da kullanıldı. Bu 2 farklı besiyeri ile ekimi yapılan hücreler 37°C' da % 5 CO_2, % 95 nem içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin besiyerleri 2-3 günde bir değiştirildi ve morfolojileri invert mikroskop altında incelendi.

3.1.5. Mononuklear Hücrelerin Kültüründe Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

Kordon kanından izole edilen mononuklear hücrelerin kültüründe kullanılan farklı besiyerlerinin hazırlanması için öncelikle -20°C'da saklanan serum, Glutamax ve Anti Anti 37°C'lık etüv içinde ısıtıldı. 50 ml'lik steril falkonlar içine son konsantrasyonları % 20 serum, 2 mM glutamax ve 1x Anti Anti olacak şekilde hesaplanarak eklendi. Farklı besiyerleri ile yine % 20 serum konsantrasyonu olacak şekilde ortamlar hazırlandı.

3.1.5.1. RPMI-1640

50 ml Falcon tüpü içerisine 40 ml RPMI-1640 (Sigma) üzerine son konsantrasyonu % 20 olacak şekilde HyClone FBS (Thermo) ilave edildi ve tüp yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı.

3.1.5.2. DMEM

50 ml Falcon tüpü içerisine 39 ml DMEM (Sigma) eklendi üzerine 0.5 ml Anti-Anti ve 0.5 ml Glutamax ilave edildi. Son konsantrasyonu % 20 olacak şekilde HyClone FBS (Thermo) ilave edilerek tüp yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı.

3.1.6. Mononuklear Hücrelerin Kültüründe Kullanılan Serumların Hazırlanması

Çalışmamızda insan kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin kültüründe önerilen HyClone Fetal Bovine Serum (HFBS) kullanıldı. Kordon kanından izole edilen mononuklear hücrelerin kültüründe kullanılan ve -20°C'da saklanan HFBS stok solüsyonu 37°C'lik su banyosunda çözündürüldükten sonra besiyerindeki konsantrasyonu % 20 olacak şekilde hazırlandı.

3.1.7. Hücre Kültürünün Tripsinizasyonu

Hücreler yetiştirildikleri kültür kabı içerisinde tek tabakaya ulaştıklarında pasaj işlemi gerçekleştirildi. Hücrelerle kaplanan kültür kabı içerisindeki besiyeri dökülerek kültür kabı yüzeyi 1x Phosphate Balance Solution (PBS) ile yıkandı. Yapıştıkları yüzeyden kalkmaları amacı ile 5 ml % 0.25'lik tripsin ilave edilerek 3-5 dakika inkübatörde bekletildi. Bu süre sonunda hücreler süspanse edilerek santrifüj tüpüne aktarıldı ve tripsinin inaktive edilmesi amacıyla üzerine 2 ml besiyeri ilave edildi. Oda ısısında 1400 rpm de 5 dk santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonunda üst sıvı uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde kalan hücre pelleti besiyeri ile resüspanse edildi. Olgunlaşmış hücrelerin daha iyi bir gelişme göstermesi için yeni bir kültür şişesi içine ekimi yapıldı.

3.1.8. İzole Edilen Mononuklear Hücrelerin Tripan Mavisi ile Canlılık Testi

3.1.8.1. Tripan Mavisi (TM) İle Canlı Hücrelerin Sayılması

Hücrelerin sayımının kolay yapılması için 100 kat seyretme tercih edildi. Besiyeri ile yıkanarak santrifüj edilen, süpernatant'ı uzaklaştırılan ve ardından resüspanse edilen hücre süspansiyonundan 2 µl otomatik pipet ile çekilerek 1.5 ml'lik steril eppendorf tüpü içine aktarıldı. Üzerine 98 µl % 0.4 tripan mavisi solüsyonu ve 100 µl PBS eklenerek iyice pipetaj yapıldı. Thoma lamının her iki bölümüne de lam ile lamel arasına 10'ar µl hücre süspansiyonundan dikkatlice yayıldı. İnvert mikroskop altında tripan mavisi ile maviye boyanmamış olan canlı hücreler sayıldı.

3.1.9. İnvert ve Işık Mikroskobu İncelemeleri

Kordon kanından izole edilip kültürü yapılan mononuklear hücrelerin morfolojilerinde meydana gelen değişiklikler invert faz mikroskobu ve ışık mikroskobunda incelenmiştir.

3.1.10. Hücre Kinetiği Parametresi Analizi (Çoğalma Hızı)

RPMI-1640 (Sigma) + % 20 FBS (Hyclone) ve DMEM (Sigma) + % 20 FBS (Hyclone) eklenen gruplardaki hücrelerin bulundukları kültür kaplarının içine % 0.25'lik tripsin eriyiği 3 dakika boyunca uygulanarak hücreler toplandı ve hücrelere tripan mavisi ile canlılık testi uygulanarak hemositometrede sayımları yapıldı. Hemositometredeki bu sayımlar sonucunda ml'deki canlı hücre sayısı hesaplanarak her bir grup için çoğalma

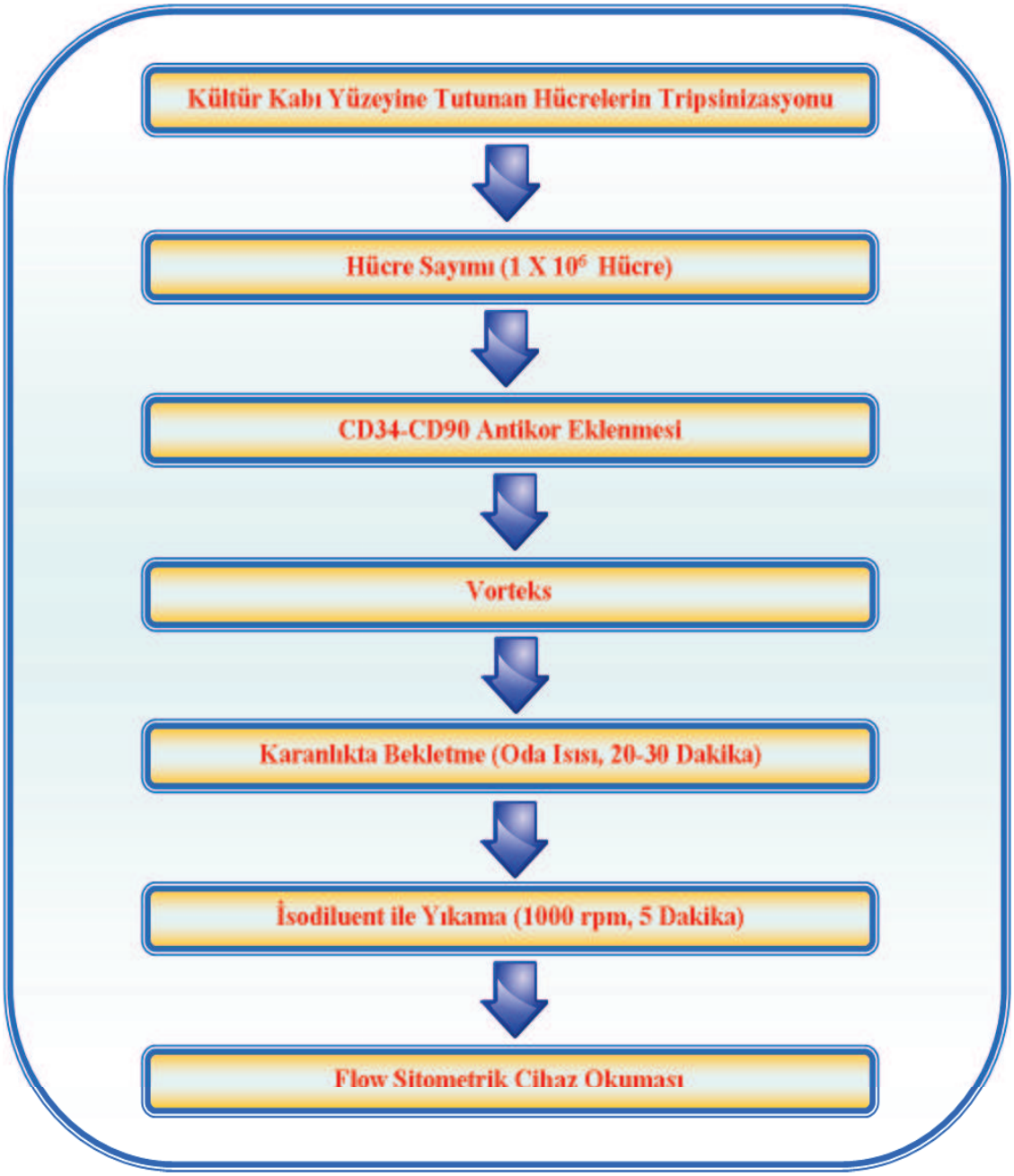
hızı sonuçları bulundu. Bu amaçlar her bir gruptan 10000 hücre mikroplatelere ekilerek zamana bağlı olarak hücre sayıları ve hücre morfolojileri incelendi (Hücre Kinetiği Parametresi Analizi, sadece 1. dönörde alınan kandan elde edilen mononuklear hücrelere uygulanmıştır.).

3.1.11. İstatistiksel Analiz

RPMI-1640 (Sigma) + % 20 FBS (Hyclone) ve DMEM + % 20 FBS (Hyclone) eklenen gruplardaki hücrelerin çoğalma hızındaki zamana bağlı değişimin aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları (SD) hesaplandı. Grupların birbirlerine göre istatistiksel açıdan bir fark gösterip göstermedikleri incelendi. Saptanan bu değerlerin istatistiksel analizleri, tek ve çift yönlü Student-t testi uygulanarak gerçekleştirildi (n=25). Sonuçların değerlendirilmesinde, istatistiksel açıdan $p<0.001$ anlamlılık seviyesi temel alındı.

3.1.12. İnsan Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücre Kültürünün Flow Sitometrik Analizi

Heparin'li tüpler içinde laboratuvara getirilen kordon kanından, eritrosit liziz tamponu ve yoğunluk gradiyent ayırma yöntemleri ile mononuklear hücreler izole edildi. İzole edilen mononuklear hücrelerin tripan mavisi ile sayımı yapıldı. Kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin immünofenotiplendirilmesinde negatif kontrol olarak CD34-FITC, pozitif olarak ise CD90-PE immünofloresan antikorlar kullanıldı. Her bir antikordan 20'şer µl, Flow tüplerine (Bechman Coulter, ABD) eklendi. Sayımı yapılan mononuklear hücrelerden 1 x 10^6 hücre alınarak antikorların üzerine eklendi ve 1 dakika vortekslendi. Karanlık ortamda 20–30 dakika, oda ısısında antikorların yüzey antijenlerine bağlanması için beklendi. Bekleme sonunda mononuklear hücrelerin üzerine 500 µl isodiluent eklenerek, 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra tüplere 500 µl isodiluent eklenerek Flow Cytometer (Beckman Coulter, Cell Lab Quanta, USA) cihazında analiz edildi (Şekil 3. 2) (Flow Sitometrik Analiz, sadece 6. dönörde alınan kandan elde edilen mononuklear hücrelere uygulanmıştır.).

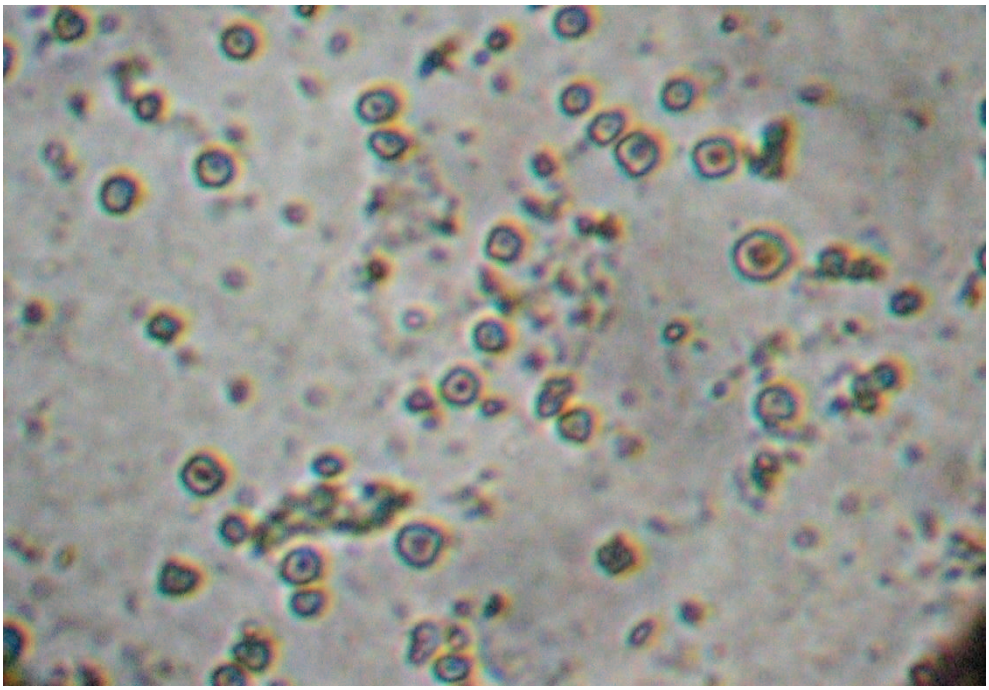


Şekil 3. 2: İnsan kordon kanı mezenkimal kök hücre kültürünün flow sitometrik ölçüm için hazırlanması

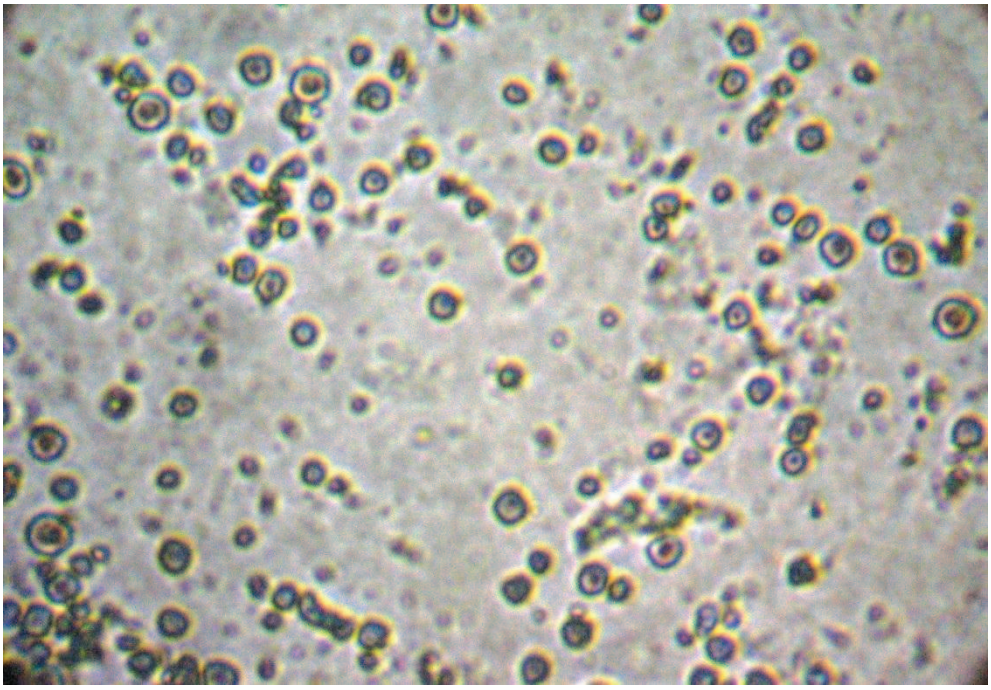
4. BULGULAR

4.1. İNVERT VE FAZ KONTRAST MİKROSKOP İNCELEMELERİ

DMEM ve RPMI-1640 olmak üzere iki ayrı besiyerine ekimleri gerçekleştirilen 1. donörden elde edilen mononuklear hücrelerin bulunduğu kültür kabı izolasyondan 72 saat sonra invert mikroskop altında incelendiğinde her iki besiyerinde de yüzeye tutunmayan çok sayıda yuvarlak şekilli hücrelerin bulunduğu gözlenmiştir. 96. saatte yüzeye tutunmuş olan hücrelerin tek tabaka haline gelmiş olduğu görülmüştür. DMEM besiyeri içerisindeki hücrelerin RPMI-1640 besiyerinde bulunan hücrelerden daha düzgün bir morfolojiye sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.1-2).

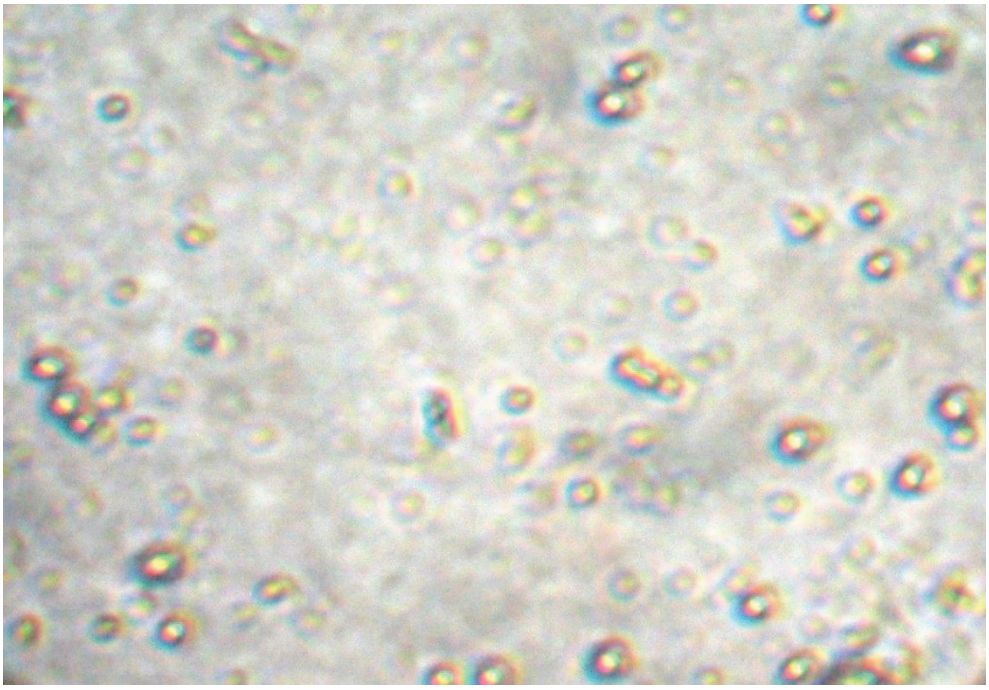


Şekil 4.1: 1. donöre ait insan kordon kanı hücrelerinin RPMI-1640 + % 20 FBS ile kültüre edilmesinden sonraki 96. saatte ekilen hücrelerin sonraki 72. saatte invert faz mikroskobundaki görünümleri (x200).

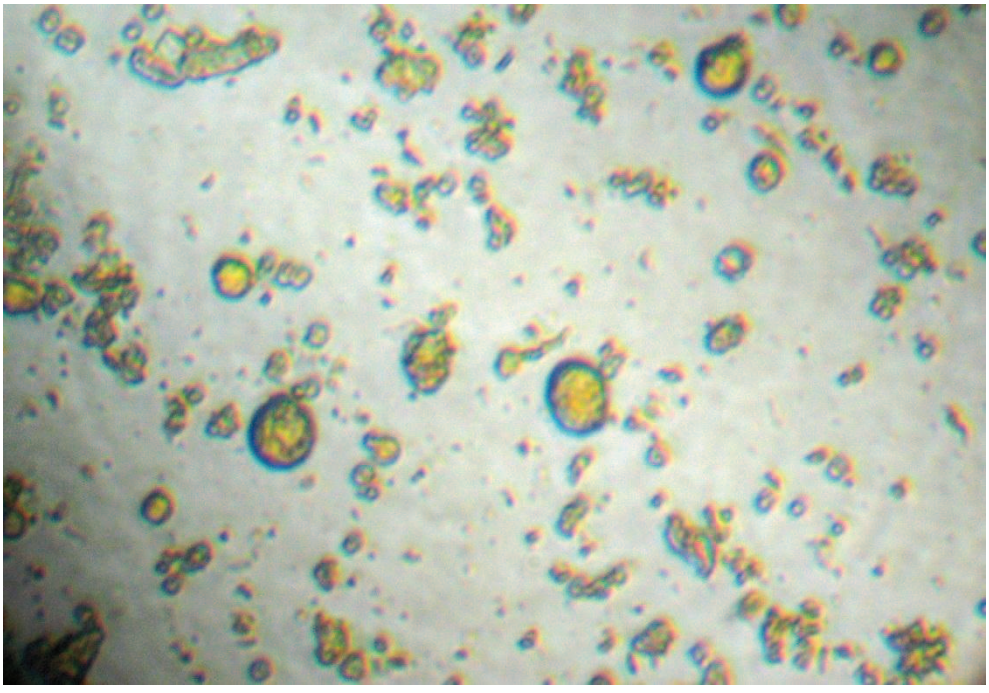


Şekil 4.2: 1. donöre ait insan kordon kanı hücrelerinin DMEM + % 20 FBS ile kültüre edilmesinden sonraki 96. saatte ekilen hücrelerin sonraki 72. saatteki invert faz mikroskobundaki görünümleri (x200).

DMEM besiyerine ekimleri gerçekleştirilen 2. donöre ait mononuklear hücrelerin bulunduğu kültür kabı izolasyondan 72 saat sonra invert mikroskop altında incelendiğinde yüzeye tutunmayan çok sayıda yuvarlak şekilli hücrelerin bulunduğu gözlenmiştir. İzolasyonun 22. gününde kültür kabının yüzeyinde iğ şeklinde fibroblast benzeri birkaç tane mezenkimal kök hücre tespit edilmiştir. 30. günden itibaren hücreler yüzeye tutunma özelliklerini kaybetmeye başlamışlar, 33. günde ise hücreler tamamen deforme olduklarından kültüre son verilmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4).

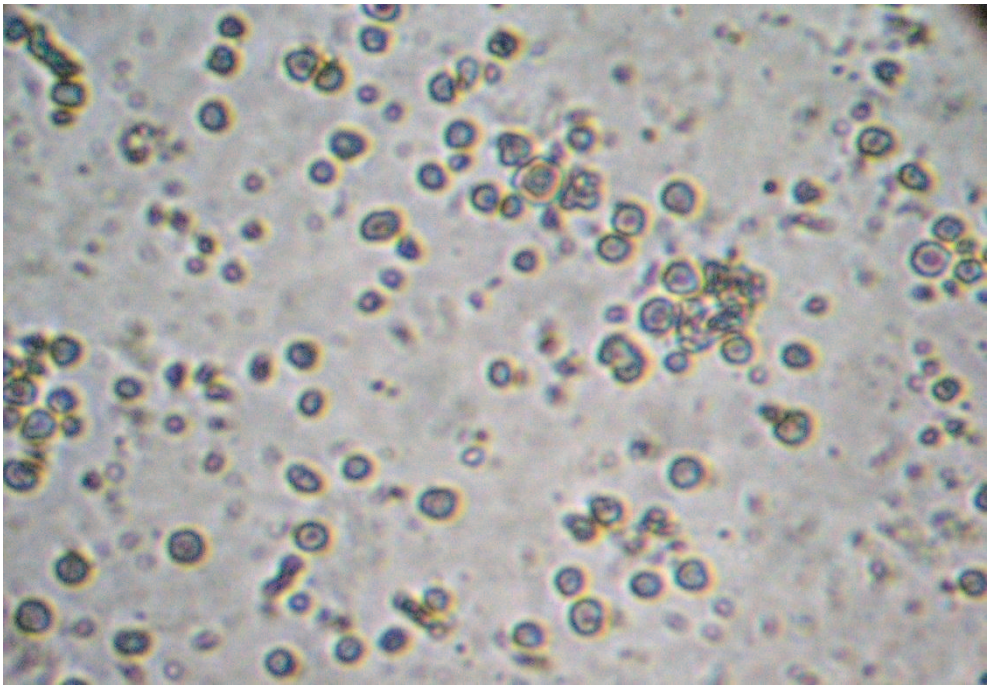


Şekil 4.3: 2. donöre ait insan kordon kanı hücrelerinin kültüre edilmesinden sonraki 30. günde yüzeye tutunma özelliklerini kaybetmeye başlayan hücrelerin invert faz mikroskobundaki görüntüleri (x200).



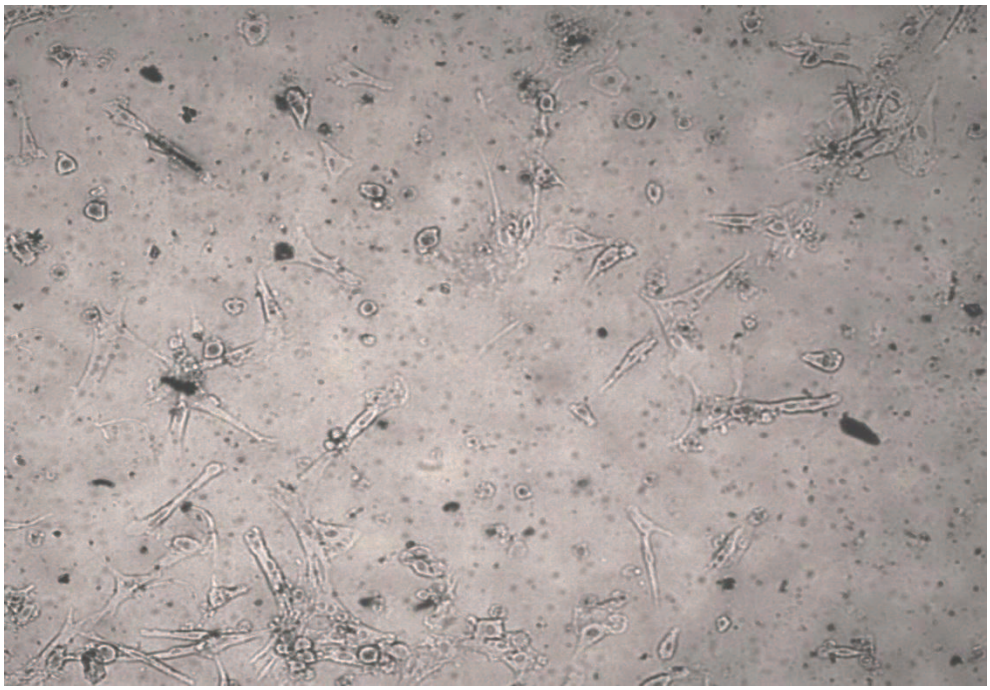
Şekil 4.4: 2. donöre ait insan kordon kanı hücrelerinin kültüre edilmesinden sonraki 33. günde tutunma özelliklerini tamamen kaybederek bozulan hücrelerin invert faz mikroskobundaki görüntüleri (x200).

İzolasyon sırasında bir miktar pıhtılaşmış olduğu gözlenen 3. donöre ait kanın izolasyonunun ardından kültür kabında çok az hücre olduğu belirlenmiştir. İzolasyondan 7 gün sonra kültür kabında yüzeye tutunmayan çok sayıda yuvarlak şekilli hücrenin olduğu, yüzeye tutunmuş olan hücrelerin ise az miktarda ve yuvarlak şekilli olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5). Ancak 16. günde hücrelerin yüzeyden kalkarak öldükleri tespit edilmiştir.



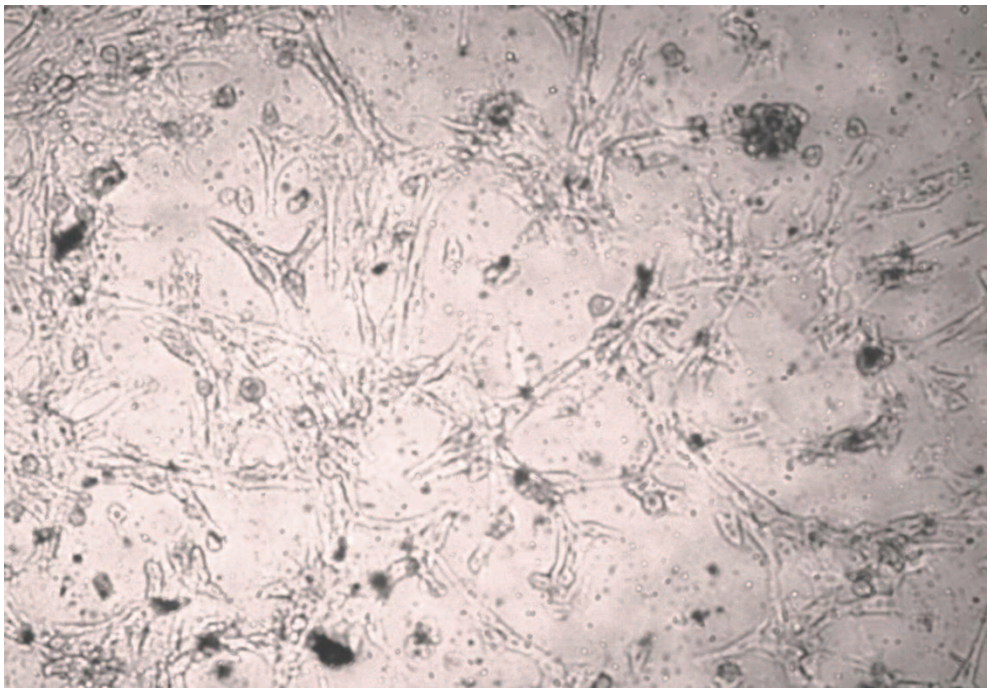
Şekil 4.5: 3. donöre ait insan kordon kanı hücrelerinin kültüre edilmesinden sonraki 7. günde yüzeye tutunan hücrelerin invert faz mikroskobundaki görüntüleri (x200).

4. donöre ait göbek kordonu kanının izolasyonundan 72 saat sonra kültür kabı içerisinde yüzeye yapışmayan hücrelerin varlığı tespit edilmiş, 96. saatte yuvarlak morfolojiye sahip olan hücrelerin yapışmış olduğu görülmüştür. 10. günde kültür kabının yüzeyine yapışmış olan az sayıda fibroblast morfolojisine sahip hücrelerin olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6). Fibroblast görünümündeki hücreler üçüncü pasajdan sonra dejenere olarak kaybedilmiştir.

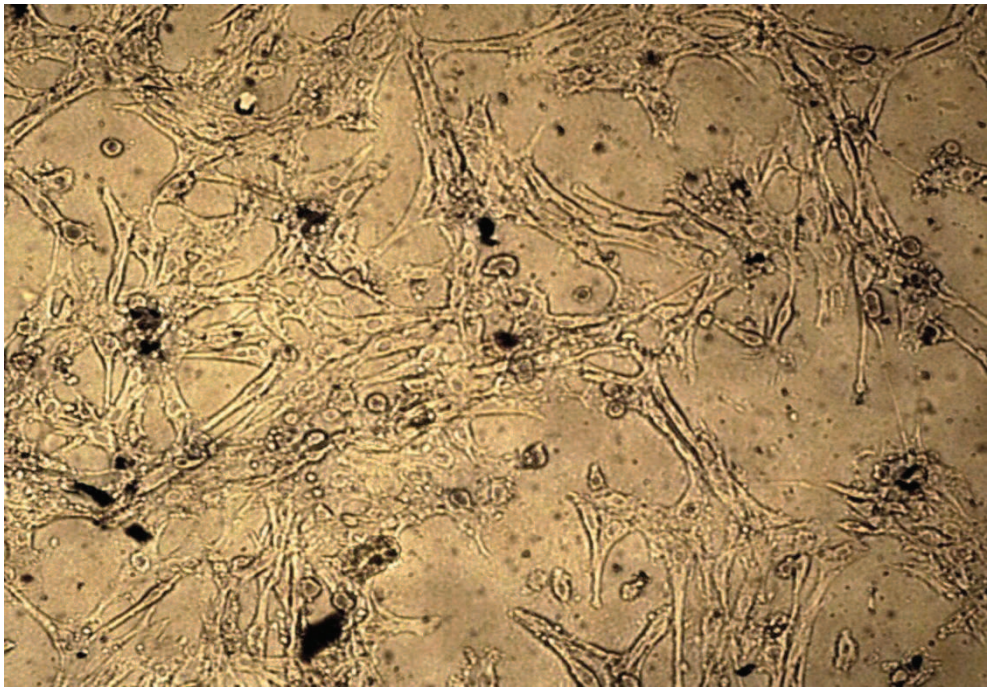


Şekil 4.6: 4. donöre ait insan kordon kanı hücrelerinin kültüre edilmesinden sonraki 10. günde yüzeye tutunan fibroblast morfolojisindeki hücrelerin ışık mikroskobu görüntüsü (x 1000; Giemsa).

5. donöre ait göbek kordonu kanının izolasyonunun 96. saatinden itibaren fibroblastik morfolojideki hücreler gözlenmeye başlanmıştır. Hücrelerin tek tabakaya ulaştığı 5. günde ilk pasaj işlemi gerçekleştirilmiştir. Fibroblast karakterdeki hücreler toplam 6 pasaj boyunca sürdürülebilmiştir. 6. pasajdan iki gün sonra hücreler dejenere olarak parçalanmıştır (Şekil 4.7, Şekil 4.8).



Şekil 4.7: 5. donöre ait insan kordon kanı hücrelerinin kültüre edilmesinden sonraki ilk pasaj sonrası fibroblast morfolojisindeki hücrelerin ışık mikroskobu görüntüsü (x 1000; Giemsa).



Şekil 4.8: 5. donöre ait insan kordon kanı hücrelerinin kültüre edilmesinden sonraki beşinci pasaj sonrası fibroblast morfolojisindeki hücrelerin ışık mikroskobu görüntüsü (x 1000; Giemsa).

4.2. HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRESİ ANALİZİ (ÇOĞALMA HIZI)

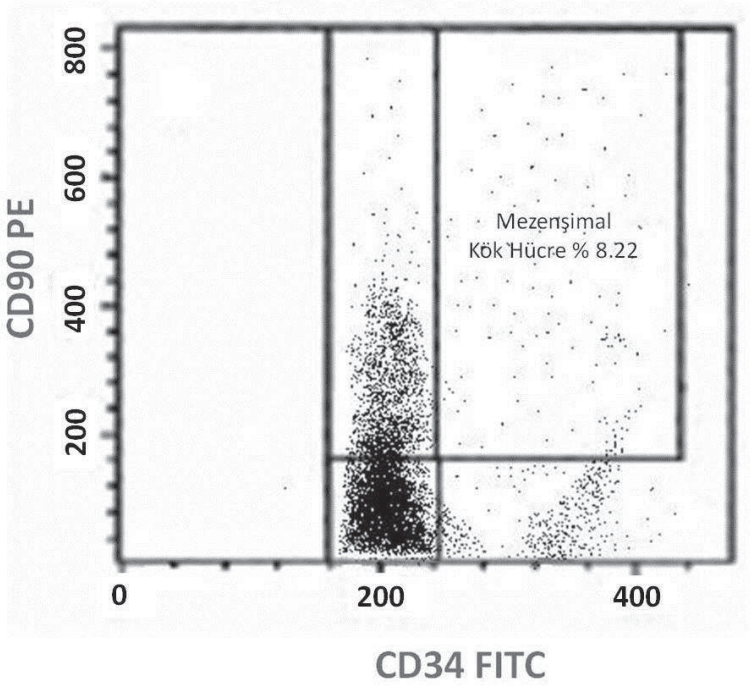
DMEM ve RPMI-1640 besiyeri içeren grupların 24., 48. ve 72. saatlerdeki çoğalma hızları incelenmiştir. Başlangıçta her iki besiyeri için her bir kuyucuğa 10000 hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Bu hücre sayısı RPMI-1640 besiyeri için 24. saatte 16500, 48. saatte 52750 ve 72. saatte ise 71500 hücre sayısına ulaşmıştır. DMEM besiyerinde ise hücre sayıları 24. saatte 18000, 48. saatte 65500 ve 72. saatte 97225 hücre sayısına ulaşmıştır. Hücre sayımları sonucunda DMEM uygulanan hücrelerin RPMI-1640 uygulanan hücrelere göre 24. saatte yaklaşık % 9, 48. saatte % 24 ve 72. saatte % 36 oranında daha fazla çoğaldıkları ve bu farkın Student-t testi ile istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p< 0.001$) saptanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: İnsan kordon kanı hücrelerinin RPMI-1640 + % 20 FBS ve DMEM + % 20 FBS ile kültüre edilmesinden sonraki 96. saatte ekilen hücre sayılarının zamana göre değişimi (± SD).

	Hücre Sayısı	
Saatler	**RPMI-1640 + % 20 FBS**	**DMEM + % 20 FBS**
0	10000 ± 1245	10000 ± 1260*
24	16500 ± 2225	18000 ± 1950
48	52750 ± 9750	65500 ± 10121
72	71500 ± 13780	97225 ± 16540

4.3. FLOW SİTOMETRİK ANALİZ

Daha önce belirtilmiş olan yöntemle yapılan flow sitometrik analiz ile 6. donöre ait olan göbek kordonu kanının izole edilmesinin ardından kültürün 7. günündeki mononuklear hücrelerden 10^6 tanesi incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda 10^6 mononuklear hücreden % 8.22'sinin CD34 antikorları ile negatif iken CD90 antikorları ile pozitif olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9). Bu oran, mononuklear hücre populasyonunun % 8.22'sini mezenkimal kök hücrelerin oluşturduğunu göstermektedir.



Şekil 4.9: DMEM + % 20 FBS içeren kültür ortamında 6. donöre ait insan kordon kanı mezenkimal kök hücre oranı (Mononuklear hücre izolasyonu sonrası 7. gün).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde kök hücre çalışmalarında özellikle kordon kanı kök hücrelerinin kullanımı hızla önem kazanmaktadır. Kök hücre uygulamaları ve kök hücre tedavisi biyolojide ve tıpta yeni bir kavramdır. Bu tedavi kavramı, hücresel terapi için, yine hücrelerin kullanımını ifade etmektedir. Spesifik patolojik durumların tedavisinde, rejenerasyonun hedeflenip spesifik hasarlı kısımlar için progenitörlerin uygulanması kök hücre terapisinin temel yöntemidir. Bu yaklaşım, yeni bir tedavi şeklidir ve deneme aşamasındadır. Aslında kök hücreler yıllardan beri bilinmektedir. Ancak tedavi için kök hücre tedavisinin başlaması, yeni bir başlangıçtır. Geçmişte insan embriyonik kök hücre hattı elde etmek için klasik uygulama, bir insan embriyosunun iç hücre kitlesinin alınmasını içermekteydi. Ancak bu embriyoların tahrip edilmesi kaçınılmaz olduğundan bu uygulama, kritik etik sorunlara neden olmaktadır.

İnsan embriyonik kök hücre hattı elde etmek için bir başka yaklaşım da somatik hücre nuklear transferi (SCNT) tekniği veya klonlama teknolojisidir. Bu teknik ve teknoloji, immün sistemden dolayı olası bir rejeksiyon problemini ortadan kaldırmakta, transplantasyon amacıyla kullanılacak spesifik kök hücre hatları sağlamak için iyi bir potansiyel aday olarak kabul edilmektedir. Ancak klonlama teknolojisi çeşitli etik problemleri de beraberinde getirmektedir [145].

Kök hücre transplantasyonu, birçok hastalığın tedavisi için umut verici bir yöntem olarak görülmektedir. Kök hücreler, birçok dokudan izole edilebilmektedir ancak kan, toplanmasının kolaylığından dolayı ideal bir kaynaktır ve son yıllarda göbek kordon kanı, mezenkimal kök hücrelerin elde edilmesinde kemik iliğine karşı alternatif bir kaynak olarak kullanılmaktadır [102].

Kök hücre kaynağı olarak göbek kordon kanı, diğer kök hücre kaynaklarına göre bir takım avantajlara sahiptir. Bunlardan ilki donör için hiçbir risk olmaksızın kanın invaziv olmayan bir yöntemle toplanmasıdır. Ayrıca dünyada her yıl 100 milyondan fazla doğumun olması nedeniyle kök hücreler için hazır bir kaynak olarak düşünülmektedir. Kordon kanı, bebek doğduktan hemen sonra toplanmaktadır. Bu da göbek kordonu kök

hücrelerinin bir insandan izole edilebilen hücrelerin en gençleri arasında yer aldığı anlamına gelmektedir. Bu durum önemlidir, çünkü yetişkin donörlerden alınan hücreler, hayatları boyunca çevresel ve içsel faktörlerden kaynaklanan DNA hasarına sahip olabilmektedirler. Dahası, göbek kordonu kök hücreleri, prenatal yaşam süresince donör bebeklerin virüslere maruziyetlerinin minimum seviyede olmasından dolayı çok düşük bir viral kontaminasyon riski taşımaktadır.

Normal hücrelerin replikasyon potansiyelleri, kromozom uçlarında bulunan DNA dizileri, yani telomerlerin uzunluğu ile belirlenmektedir. Telomerler her hücre siklusunda kısalmakta ve kritik şekilde kısalan telomerler sonunda hücre siklusu G_0 fazına geçişe veya hücre ölümüne yol açmaktadır. Yapılan bir araştırmada, göbek kordonu kök hücrelerinin, doğum öncesinde sınırlı sayıda hücre bölünmesine uğradıkları için çok uzun telomerlere sahip olduğu saptanmıştır. 16-19 yaşlarındaki donörlerin kemik iliğindeki 8-9 kilo baz çiftlik telomerler ile karşılaştırılan göbek kordon kanı hücrelerinin telomer uzunluğu 11-13 kilo baz çiftlik bir yapıda olduğu saptanmıştır. Ayrıca göbek kordon kanı kök hücreleri, telomerleri uzatan telomeraz enzimini de içermektedir. Böylece hücre replikasyonunun neden olduğu telomer kısalması göbek kordonu kök hücrelerinde azalmıştır [146].

Klinik uygulamalarda kullanılabilecek 4 temel kök hücre kaynağından biri olan kordon kanı, kemik iliği, periferik kan ve yağ dokusu ile kıyaslandığında daha genç hücreleri içermesi, yaşayabilme yeteneklerinin yüksek olması, fazla sayıda elde edilebilir olmaları ve immunolojik karakter bakımından alıcıya kolay uyum sağlamaları gibi olumlu özellikleri taşıması nedeniyle daha çekici görülmektedir. Doğumdan sonra kordon veninden elde edilebilen bu kök hücre kaynağı, uzun süre saklanabilmekte ve hem otolog hem de allojenik transplantasyona uygun olması nedeniyle klinik kullanımda tercih edilmektedir. İnsan göbek kordon kanı kök hücreleri ayrıca etik tartışmalara yol açmadan ve verici açısından fazladan bir cerrahi müdahale gerektirmeden kolayca elde edilebilir [147, 148]. Bununla beraber, kordon kanı yeteri kadar mezenkimal kök hücre içermemektedir. Yapılan bir çalışmada kordon kanında 1:2.000000 mezenkimal kök hücre bulunduğu bildirilmiştir [149]. Bu miktar doku mühendisliği çalışmaları ve klinik uygulamalar için oldukça yetersizdir.

Yapılan bu çalışmada, birçok kez alınan kanlardan kök hücrelerin izole edilmesi sırasında yeterli miktarda hücre elde edememe problemiyle karşılaşıldı. Bu problemi aşmak amacıyla, literatürlerdeki farklı santrifüj hızları denendi ve optimum verim elde edilmesi için gerekli değerler saptandı.

Literatürde kordon kanı kök hücreleri ile yapılan çalışmalar, çoğunlukla hematopoietik kök hücrelerin izolasyonu ve kültürünün yapılmasına yöneliktir. Ülkemizde ise bu konu ile ilgili çalışmalar ancak hematopoietik kök hücrelerin kültürünün değil, izole edilip transplantasyonuna yöneliktir. Hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, uyarılmış periferik kanda kemik iliğinden daha fazla tek çekirdekli hücre olduğu gösterilmiştir. Bu sebepten, periferik kan kök hücrelerinin kemik iliğine alternatif olarak kullanımına yönelik yoğun çalışmalar başlatılmıştır. Kemik iliğinden mobilize edilen kök hücrelerin periferik kana geçmelerinden sonra izolasyonu yapılır. Son yıllarda izolasyonu yapılan bu kök hücreler ile hayvan ve insanlarda farklılaşma ve rejenerasyon çalışmaları da yapılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, periferik kandan elde edilen kök hücrelerin *in vitro* şartlarda hematopoietik, nöral ve kardiyak hücrelere dönüşebildiği gösterilmiştir [150, 151]. Bu nedenle, periferik kanda mezenkimal kök hücre oranı çok az olmasına rağmen, kolaylıkla elde edilebilmesi ve ön çalışmalar için uygun olması sebebiyle kullanımı önerilmektedir.

Kordon kanından izole edilen mezenkimal kök hücrelerin kültürünün yapılmasına ait dünyada yapılan birçok çalışma bunmasına rağmen kordon kanından izole edilen kök hücrelerin kültürünün yapılmasında halen ciddi sorunlar bulunmaktadır. Bunun çeşitli nedenleri vardır. En önemli nedeni, kordon kanındaki mezenkimal kök hücre sayısının çok az miktarda olması, her donörden elde edilen mezenkimal kök hücrelerinin kültürünün yapılmasının mümkün olmamasıdır. Öyle ki, yapılan çalışma sonuçlarına göre, alınan 100 kordon kanı örneğinden yaklaşık 7 tanesinden mezenkimal kök hücre izolasyon sağlanabilmiştir [14, 15]. Diğer bir önemli neden ise, şimdiye kadar kordon kanından izole edilen mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* kültür ortamına etki eden çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörlerin yeteri kadar incelenmemesi, ayrıca donöre bağlı olarak hücrelerin kültürde farklılık göstermesinin nedenlerinin şimdiye kadar belirlenmemiş olmasıdır.

Kordon kanı mezenkimal kök hücreleri ile birçok çalışma yapılmasına rağmen, literatürde bu hücrelerin izolasyonunda ve *in vitro* kültürünün yapılmasında kullanılan farklı parametrelerin karşılaştırılması ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden kordon kanından mezenkimal kök hücrelerin izolasyonunda kullanılan yöntemlerin, hücrelerin adaptasyonu ve uzun süreli kültürünün yapılması için, kültür ortamında hücre proliferasyonuna etki eden çeşitli etkenlerin (büyüme faktörleri, serum, glukoz konsantrasyonu, L-Glutamin konsantrasyonu, besiyerleri vb.) incelenmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle bu çalışmada ilk kez olarak kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonunda, mezenkimal kök hücrelerin adaptasyonu ve uzun süreli kültürünün sağlanması için farklı mediumlar karşılaştırılmış ve bu mediumların hücrelerin çoğalma hızına farklı etkileri incelenmiştir.

İnsan göbek kordonu kök hücrelerini izole etmek ve büyütmek için birçok farklı formülasyonlu mediumlar kullanılmaktadır. İnsan göbek kordonu kök hücrelerini başarılı bir şekilde çoğaltmak için BGJb, Alpha MEM, DMEM:F12, McCoy's 5A ve RPMI 1640 içeren ortamlar kullanılmıştır. Bu ortamların bazıları belirli bileşenler açısından DMEM'den daha zengin olmasına karşın bunların orijinal formülasyonları ve DMEM'i kullanan diğer birçok çalışmaya üstünlükleri kanıtlanamamıştır [104].

Literatürde mezenkimal kök hücrelerin kemik iliği, periferik kan ve kordon kanında çok düşük oranda bulunduğu belirtilmiştir Bu nedenle yapılan bir çalışmada kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu ve proliferasyonu için optimum kültür koşulları belirlenmeye çalışılmıştır. Buna göre, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin, izolasyondan sonra DMEM besiyerindeki proliferasyonunun, IMDM besiyeri içeren ortamdaki proliferasyondan daha yüksek olduğu gözlenmiştir [105].

Kordon kanı mezenkimal kök hücrelerin kültüründe çeşitli besiyerleri (α-MEM, DMEM, IMDM, RPMI-1640) kullanılmaktadır. Ancak kullanılan bu besiyerlerinin kordon kanı mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonuna ve adaptasyonuna etkisi ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmada ilk kez diğer çalışmalardan farklı olarak olarak, kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin kültüründe RPMI-1640 ve DMEM besiyerinin, izolasyon ve

proliferasyona etkisini inceledik. Yaptığımız çalışma sonuçlarına göre; izole edilen kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin DMEM besiyeri ile hazırlanan besiyerinde RPMI-1640 besiyeri ile hazırlanan besiyerinden daha yüksek proliferasyon gösterdikleri belirlendi.

Elde edilen bu sonuç, literatürde DMEM besiyerinin kemik iliği MKH'lerinin proliferasyonunu arttırdığı sonucunu da desteklemektedir. Ayrıca düşük glikoz (1g/L) DMEM ile yüksek glukoz (4.5 g/L) DMEM içeren kültür ortamının, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin izolasyon sonrası proliferasyonuna etkisinin incelendiği çalışmada, düşük glikozlu DMEM içeren ortamın, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı belirtilmiştir [105].

Yaptığımız çalışma sonuçlarına göre, 2 mM Glutamax içeren DMEM ile RPMI-1640 içeren besiyerleri ile izole edilen göbek kordon kanı kök hücreleri morfolojik olarak karşılaştırıldığında, 2 mM Glutamax içeren DMEM besiyerindeki hücrelerin, RPMI-1640 besiyerlerinde yetiştirilen hücrelere göre daha sağlıklı morfolojiye sahip oldukları, ayrıca hücrelerin kültür ortamında daha uzun süre sağlıklı hücre morfolojilerini koruduğu saptanmıştır.

Mezenkimal kök hücre izolasyonu ve kültürü için kullanılan fetal sığır serumunun (FBS) içeriğinin tam olarak bilinmemesi, serumun virüs transmisyonu, prion hastalıkları açısından risk taşıması ve bazı proteinlere karşı istenmeyen immün yanıt oluşturması önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle yapılan birçok çalışmada FBS'ye alternatif olarak mezenkimal kök hücre kültürü için otolog ve allojenik serum kullanılmıştır. Çalışmaların sonuçlarına göre, insan mezenkimal kök hücreleri, otolog serum içeren kültür ortamında FBS'ye göre daha hızlı prolifere olmalarına rağmen allojenik serum bulunan kültür ortamında bir süre sonra canlılıklarını kaybetmişlerdir. Ayrıca FBS bulunan kültür ortamında kök hücrelerin daha kolay farklılaştıkları görülmüştür [152]. Kök hücreler organizmada ancak ihtiyaç duyulan durumlarda diğer hücre tiplerine farklılaşırlar. Bu farklılaşma, kök hücrelerin *in vivo* farklılaşmayı düzenleyen sinyal molekülleri tarafından uyarılmaları ile mümkün olur. Buna karşın *in vitro* kültür ortamlarında, kök hücrelerin uzun süre farklılaşmaması gereken çalışmalarda, kültür ortamına farklılaşmayı baskılayacak faktörler eklenir (bFGF, LIF

REF). Büyüme faktörleri açısından zengin bir kaynak olan serumun içeriğindeki maddelerin henüz tam olarak aydınlatılamamış olması, kültürde devam eden mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasına neden olabilir. Kültürde kullanılan serumların bu endişe verici potansiyelleri sebebiyle, mezenkimal kök hücrelerin kültüründe kullanılacak olan en uygun serumun literatürde, özellikle kök hücre çalışmalarında, kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu için kullanılan Hyclone FBS olduğu saptanılmış ve çalışmamızda bu serum kullanılmıştır.

İnsan göbek kordon kanından, mezenkimal kök hücre karakteristiklerine sahip fibroblastik hücrelerin izolasyonu için kanıtlar çelişkili olmasına karşın elde edilen veriler, % 60'dan fazla bir etkinlik derecesi ile uzun süreli göbek kordon kanı kültürlerinde mezenkimal kök hücre benzeri hücrelerin izole edilebileceğini açığa çıkarmıştır. Bu verimi elde etmek için kritik parametreler; 15 saatten daha az bir saklama süresi, 33 ml'den fazla net hacim, mononuklear hücrelerin 1x 10^8 mononuklear hücreden fazla sayıda olması ve hiçbir koagülasyon veya hemoliz belirtisi olmamasıdır [153].

İnsan göbek kordon kanı bileşenleri arasında (i) embriyonik kök hücreler, (ii) mezenkimal kök hücreler, (iii) hematopoietik kök hücreler ve (iv) endotelial progenitör hücreleri (EPC) tanımlamak mümkündür. Kordon kanı kök hücreleri, kültürün ilk 4-5 günü süresince fibroblast benzeri şekil göstererek mikroskopi ile karakterize edilebilmektedir. Göbek kordon kanı, CD 34^+ ve CD 105^+ hücrelerin yüksek bir yüzdesine sahiptir. Bu da göze çarpan rejeneratif bir potansiyel anlamına gelmektedir. Kordon kanı kök hücreleri *in vitro*'da muhtemelen daha fazla koloni oluşturdukları ve kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerden farklı diferansiyasyon faktörlerine gereksinim duydukları için rejeneratif tıp alanındaki çalışmalar için daha uygun oldukları görülmektedir. Göbek kordon kanı türevli mezenkimal kök hücrelerin şu anda transplantasyon protokolleri için en uygun kaynak olduğu düşünülmektedir. Göbek kordon kanı türevli mezenkimal kök hücreler karakterize edilmiş ve sinir hücresi ve viseral mezoderm gibi kondrositlere, osteositlere ve adipositlere diferansiye olma yetenekleri gösterilmiştir. Göbek kordon kanı türevli mezenkimal kök hücreler, izole edilip kültürde yetiştirildiklerinde CD 14, CD 34 ve CD 105 gibi moleküllerden yoksun olmakta ve CD 106, CD 54, SH2, SH3 ve SH4 gibi markerları kazanmaktadır. Bu

nedenle ışık ve elektron mikroskopisi göbek kordon kanı türevli mezenkimal kök hücrelerinin SMA, vimentin, nestin ve dezmin gibi mezenkimal markerlar için pozitif olduklarını göstermektedir.

Göbek kordon kanı türevli hematopoietik kök hücrelerin hematolojik hastalıkların tedavisinde transplantasyon için en uygun kaynak olduğu düşünülmektedir. Göbek kordon kanı türevli hematopoietik kök hücreler, kan elemanlarının yanı sıra kemik iliği dokusuna diferansiye olma potansiyeline sahiptir. Hematopoiezin geleneksel tanımı dikkate alındığında göbek kordon kanı türevli hematopoietik kök hücrelerin primordiyal hematopoiez progenitörleri ile yakından ilişkili olduklarını söylemek mümkündür. Göbek kordon kanı türevli hematopoietik kök hücreler, fetal karaciğer kinaz 1, vaskular endotelial büyüme faktörü reseptörü 2 (VEGFR2), mezodermal marker Brachyury, Oct4ve CD 41^{+} eksprese eden koloni oluşturan hücreler olarak karakterize edilmiştir [154, 155].

Mezenkimal kök hücrelerin temel karakteristikleri; fibroblast benzeri morfolojileri, plastiğe adezyonları, morfolojik olarak heterojen bir populasyona sahip olmaları, belirli koşullar altında adipositlere, kondrositlere, osteositlere, miyositlere, kardiyomiyositlere, nöral hücrelere ve diğer hücre tiplerine diferansiyasyonları, marker genlerin ekspresyonları (CD 13, CD 44, CD 90, CD 105, Stro 1 ve bazı diğer markerlar) olarak ifade edilmektedir [156].

Yapılan Flow Sitometrik analiz sonuçları da DMEM besiyeri ile kültürü yapılan kordon kanı mononuklear hücrelerindeki mezenkimal kök hücre miktarının % 8.22 değerine ulaştığımızı göstermektedir. Alınan bu sonuca göre, insan göbek kordon kanında az miktarda bulunan mezenkimal kök hücrelerin başarılı bir şekilde izole edildiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, Fakültemizde ilk kez, kök hücre konusunda yapılan bu çalışmada kısıtlı bütçe imkanları dahilinde farklı donörlerin kordon kanından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin izolasyonuna, kültür ortamına adaptasyonuna ve proliferasyonuna etki eden çeşitli kimyasal faktörler incelenmiş, hücrelerin kültür şartları optimize edilmiş, farklı donörlerden elde edilen kordon kanından, mezenkimal kök hücrelerin

immunofenotipik özellikleri incelenerek insan göbek kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu başarılmıştır. Yapılan bu araştırmanın, kurulacak olan kök hücre laboratuvarının çekirdeği olmasından dolayı, daha sonraki projelerle desteklendiğinde Fakültemiz açısından da önemli bir kazanım olacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1.KARAKOÇ SÖKMENSÜER, L., 2007, Embriyonik kök hücreler ve tedavi amaçlı kullanımları, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38 (1), 15-19.

2. ULLOA-MONTOYA, F., VERFAILLIE, C. M., HU, W. S., 2005, Culture systems for pluripotent stem cells, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100 (1), 12-27.

3. URAL, A.U., 2006, Kök hücreler, *TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi*, 5 (3-4), 140-145.

4. ROOBROUCK, V. D.**,** ULLOA-MONTOYA F., VERFAILLIE C. M., 2008, Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells, *Experimental Cell Research*, 314 (9), 1937-1944.

5. RAJASEKHAR, V. K., VEMURI, M. C., 2009, *Regulatory Networks in Stem Cells*, Humana Press, New York, 978-1-60327-227-8.

6. ØSTNOR, L., 2008, *Stem Cells, Human Embryos and Ethics*, Springer, Oslo, Norway, 978-1-4020-6989-5

7. TAUPIN, P., 2010, *Stem Cells and Regenerative Medicine Volume V*, Nova Biomedical Books, New York, 978-1-60741-782-8.

8. DITTMAR, T., ZÄNKER, K. S., 2009, *Stem Cell Biology in Health and Disease*, Springer, New York, 978-90-481-3040-5.

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

10. BRAYFIELD, C., MARRA K., RUBIN J. P., 2010, Adipose stem cells for soft tissue regeneration, *Handchir Mikrochir Plast Chir*., 42 (2), 124-128.

11. ZUK P. A., 2010, The Adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead, *Mol Biol Cell*, 21 (11), 1783–1787.

12. SOLVES, P., MIRABET, V., LARREA, L., MORAGA, R., PLANELLES, D., SAUCEDO, E., UBEROS F. C., PLANELLS, T., GUILLEN, M., ANDRES, A., MONLEON, J., SOLER M. A., FRANCO E., 2003, Comparison between two cord blood collection strategies, *Acta Obstet Gynecol Scand*., 82 (5), 439-42.

13. LEE O. K., KUO T. K., CHEN W. M., LEE K. D., HSIEH S. L., CHEN T. H., 2004, Isolation of Multipotent Mesenchymal Stem Cells From Umbilical Cord Blood, *HEMATOPOIESIS*, 103 (5), 1669-1675.

14. LAITINEN A., LAINE J., 2007, Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Cord Blood, *Curr Protoc Stem Cell Biol.*, John Wiley & Sons, Inc. 1:2A.3.1-2A.3.7.

15. ZEDDOU, M., BRIQUET, A., RELIC, B., JOSSE, C., MALAISE, M. G., GOTHOT, A., LECHANTEUR, C., BEGUIN, Y., 2010, The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood, *Cell Biol Int*, 2010, 34 (7), 693-701.

16. HUSS, R., LANGE, C., WEISSINGER, E. M., KOLB, H. J., THALMEIER, K., 2000, Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent cd34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics, *Stem Cells*, 18 (4), 252-260.

17. KATSUMOTO K., SHIRAKI N., MIKI, R., KUME, S., 2010, Embryonic and adult stem cell systems in mammals: ontology and regulation, *Dev. Growth Differ.*, 52 (1), 115-129.

18. NANDOE TEWARIE, R. S., HURTADO, A., BARTELS, R. H., GROTENHUIS A., OUDEGA, M., 2009, Stem cell-based therapies for spinal cord ınjury, *The Journal Spinal Cord Medicine*, 32 (2),105-114.

19. LIU, Z. C., CHANG, T. M., 2010, Artificial cell microencapsulated stem cells in regenerative medicine, tissue engineering and cell therapy, *Adv Exp Med Biol.*, 670, 68-79.

20. KELLER, R., 2002, Stem cells on the way to restorative medicine, *Immunology Letters*, 83(1), 1-12.

21. BOSSE, R., KULMBURG, P., von KALLE, C., ENGELHARDT, M., DWENGER, A., ROSENTHAL, F., SCHULZ, G., 2000, Production of stem-cell transplants according to good manufacturing practice, *Ann Hematol*., 79 (9), 469-476.

22. TÁRNOK, A., ULRICH, H., BOCSI, J., 2010, Phenotypes of stem cells from diverse origin, *Cytometry A*., 77 (1), 6-10.

23. LENGNER, C. J., ANN, N. Y., 2010, iPS cell technology ın regenerative medicine, *Acad Sci*., 1192 (1), 38-44.

24. SMITH A.R., WAGNER, J. E., 2009, Alternative hematopoietic stem cell sources for transplantation: place of umbilical cord blood, *Br. J. Haematol.*, 147 (2), 246-261.

25. YU, R. N., ESTRADA, C. R., 2010, Stem cells: a review and implications for urology, *Urology*, 75 (3), 664-670.

26. HOUCK, J. C., SHARMA, V. K., HAYFLICK, L., 1971, Functional failures of cultured human diploid fibroblasts after continued population doublings, *Proc Soc Exp Biol Med.*, 137 (1), 331-333.

27. BOZZONE, D. M., 2007, *The Biology Of Cancer: Cancer Genetıcs*, Chelsea House Publishers, New York, 0-7910-8818-9.

28. MARION, R. M., STRATI, K., LI, H., TEJERA, A., SCHOEFTNER, S., ORTEGA, S., SERRANO, M., BLASCO, M. A., 2009, Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in ınduced pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, 4, 141-154.

29. LANGE, T. DE, 2005, Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres, *Genes Dev.*, 19, 2100-2110.

30. PALM, W., LANGE, T., 2008, How shelterin protects mammalian telomeres, *Annu. Rev. Genet*., 42, 301-334.

31. ULRICH, H., 2010, *Perspectives of Stem Cells*, Springer, New York, 978-90-481-3375-8.

32. HIYAMA, E., HIYAMA, K., 2007, Telomere and telomerase in stem cells, British *Journal of Cancer*, 96(7), 1020 – 1024.

33. KONDO, Motonari., 2010, *Hematopoietic Stem Cell Biology*, Humana Press, New York, 978-1-60327-347-3.

34. LANZA, R., 2009, *Essentials of Stem Cell Biology*, Academic Press, Canada, 978-0-12-374729-7.

35. VERFAILLE, C., 2009, Pluripotent stem cells, *Transfusion Clinique et Biologique*, 16 (2009), 65-69.

36. HO, A. D., 2005, Kinetics and symmetry of divisions of hematopoietic stem cells, *Experimental Hematology*, 33, 1-8.

37. LANZA, R., GEARHART, J., HOGAN, B., MELTON, D., PEDERSEN, R., THOMSON, J., WEST, M., 2004, *Handbook of Stem Cells*, Elsevier Academic Press, 978-0-12-436643-5.

38. SCHEPER, T., MARTIN, U., 2009, *Engineering of Stem Cells*, Springer, Germany, 978-3-540-88806-2.

39. WATT F.M., DRISKELL, R. R., 2010, The therapeutic potential of stem cells, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 365, 155-163.

40. HOCHEDLINGER, K., PLATH, K., 2009, Epigenetic reprogramming and induced pluripotency, *Development*, 136, 509-523.

41. SHANTHLY, N., ARUVA M.R., ZHANG, K., MATHEW, B., THAKUR, M. L., 2006, Stem cells: a regenerative pharmaceutical, *Q J Nucl Med Mol Imaging.*, 50 (3), 205-216.

42. SAĞSÖZ, H., KETANİ, M. A., 2008, Kök hücreler, *Dicle Üniv Vet. Fak. Derg.*, 1 (2): 29 – 33.

43. MUNSIE, M. J., MICHALSKA, A. E., O'BRIEN, C. M., TROUNSON, A. O., PERA, M. F., MOUNTFORD, P. S., 2000, Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei, *Curr Biol.*, 10 (16), 989-992.

44. BRIGNIER, A. C., GEWIRTZ, A. M., 2010, Embryonic and adult stem cell therapy, *J Allergy Clin Immunol.*, 125 (2 Suppl 2), 336-344.

45. BARLOW, S., BROOKE, G., CHATTERJEE, K., PRICE, G., PELEKANOS, R., ROSSETTI, T., DOODY, M., VENTER, D., PAIN, S., GILSHENAN, K., ATKINSON K., 2008, Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells, *Stem Cells Dev*., 17 (6), 1095-10107.

46. SECCO, M., ZUCCONI E., VIEIRA, N. M., FOGAÇA, L. L., CERQUEIRA, A., CARVALHO, M. D., JAZEDJE, T., OKAMOTO, O. K., MUOTRI, A. R., ZATZ, M., 2008, Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood", *Stem Cells.*, 26 (1): 146-50.

47. SHOJI, T., II, M., MIFUNE, Y., MATSUMOTO, T., KAWAMOTO, A., KWON, S. M., KURODA, T., KURODA, R., KUROSAKA, M., ASAHARA, T., 2010, Local transplantation of human multipotent adipose derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis, *Lab Invest.*, 90 (4), 637-649.

48. YOUNG, H. E., BLACK, A. C., 2004, Adult stem cells, *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 276 (1), 75-102.

49. KRETSER, D. J., 2007, Totipotent, pluripotent or unipotent stem cells: a complex regulatory enigma and fascinating biology, *Law Med.*, 15 (2), 212-218.

50. ZHANG, H., WANG, Z. Z., 2008, Mechanisms that mediate stem cell self-renewal and differentiation, *J Cell Biochem.*, 103 (3), 709-718.

51. MANDAL, A., BHOWMIK, S., PATKI, A., VISWANATHAN, C., MAJUMDAR, A. S., 2010, Derivation, characterization, and gene expression profile of two new human es cell lines from ındia, *Stem Cell Research*, 5, 173–187

52. YU, J., THOMSON J. A., 2008, Pluripotent stem cell lines, *Genes Dev*, 22, 1987-1997.

53. LIEW, C.G., MOORE, H.D., RUBAN, L., SHAH, N., COSGROVE, K., DUNNE, M., ANDREWS, P., 2005, Human embryonic stem cells: possibilities for human cell transplantation, *Ann. Med.*, 37, 521–532.

54. KOKA, P. S., 2009, *Developments in Stem Cell Research*, Nova Biomedical Books, New York, 978-1-60741-213-7

55. VATANSEVER, H. S., 2009, Embriyonik kök hücreler, *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1 (5), 25-44.

56. TURKSEN, K.,2010, *Human Embryonic Stem Cell Protocols*, Humana Press, New York, 978-1-60761-369-5.

57. BUECKER, C., GEIJSEN, N., 2010, Different flavors of pluripotency, molecular mechanisms, and practical implications, *Cell Stem Cell*, 7, 559-564.

58. ODORICO, J., ZHANG, S.-C., PEDERSEN, R., 2005, *Human Embryonic Stem Cells*, BIOS Scientific Publishers, New York, 0-203-59754-0.

59. WOBUS, A. M., 2001, Potential of embryonic stem cells, *Mol Aspects Med*, 22, 149-64.

60. BONGSO, A., LEE, E. H., 2005, *Stem Cells: From Bench to Bedside*, World Scientific, USA, 981-256-126-9.

61. HENDERSON, J. K., DRAPER, J. S., BAILLIE H. S., 2002, Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stagespecific embryonic antigens, *Stem Cells*, 20: 329–337.

62. BRANDENBERGER, R., WEI, H., ZHANG, S., 2004, Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation, *Nat Biotechnol*, 22, 707–716.

63. RICHARDS, M., TAN, S. P., TAN J. H., 2004, The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by sage, *STEM CELLS*, 22, 51– 64.

64. NICHOLS, J., ZEVNIK, B., ANASTASSIADIS, K., 1998, Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the pou transcription factor oct4, *Cell*, 95, 379 –391.

65. CHAMBERS, I., COLBY, D., ROBERTSON, M., 2003, Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells, *Cell*, 113, 643– 655.

66. MESHORER, E., PLATH, K., 2010, *The Cell Biology of Stem Cells*, Springer Science+Business Media, LLC Landes Bioscience, USA, 978-1-4419-7036-7.

67. BOYER, L. A, LEE, T. I., COLE, M. F., 2005, Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells, *cell*, 122, 947-56.

68. CARLIN, R., DAVIS, D., WEISS, M., SCHULTZ, B., TROYER, D., 2006, Expression of early transcription factors oct-4, sox-2 and nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4 (8), 1-13.

69. BARRERO, M. J., BOUE´, BELMONTE S, J. C. I., 2010, Epigenetic mechanisms that regulate cell identity, *Cell Stem Cell*, 7 (5), 565-570.

70. SCHULMAN, A., 2005, The search for alternative sources of human pluripotent stem cells, *Stem Cell Rev*, 1, 291–292.

71.122. HODGKINSON, T., YUAN, X. F., BAYAT, A., 2009, Adult stem cells in tissue engineering, *Expert Rev Med Devices.*, 6 (6), 621-640.

72.STOJKO, R., WITEK, A., 2005, Umbilical cord blood-a perfect source of stem cells?, *Ginekol Pol,* 76 (6), 491–497.

73. NOMBELA-ARRİETA, C., RITZ, J., SILBERSTEIN, L., E., 2011, The elusive nature and function of mesenchymal stem cells, *Nature Reviews Molecular Cell Biology,* 12, 126-131.

74.WEXLER, S., A., DONALDSON, C., DENNING-KENDALL, P., ET AL. 2003, Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not, *Br J Haematol,* 121(2), 368–374.

75. Majka M, Kucia M, Ratajczak MZ. Stem cell biology – a never ending quest for understanding. Acta Biochim Pol 2005; 52(2): 353–8.

76. Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's Disease. Stem Cells 2006; 24(3): 781–92.

77. HOU, L., CAO, H., WANG, D., et al., 2003, Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro, *Int J Hematol.,* 78(3): 256–261.

78. CATERSON, E. J, NESTI, L. J., ALBERT, T., et al., 2001, Application of mesenchymal stem cells in the regeneration of musculoskeletal tissues, *Med Gen Med*: E1

79. ROMANOV, Y., A., SVINTSITSKAYA, V. A., SMIRNOV, V. N., 2003, Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord, *Stem Cells*, 21(1): 105–110.

80. JU, X. L, HUANG, Z. W., SHI, Q., et al., 2005, Biological characteristics and induced differentiation ability of in vitro expanded umbilical cord blood mesenchymal stem cells, *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 43 (7), 499–502.

81. WEXLER, S. A., DONALDSON, C., DENNING-KENDALL, P., et al., 2003, Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not., *Br J Haematol*, 121 (2), 368–374.

82. GANG, E. J., HONG, S. H., JEONG, J. A., et al., 2004, In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 321 (1), 102–108.

83. FELDMANN RE, J. R., BIEBACK, K., MAURER, M. H., et al., 2005, Stem cell proteomes: a profile of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood, *Electrophoresis*, 26 (14), 2749–2758.

84. LE BLANC, K., TAMMIK, C., ROSENDAHL, K., et al., 2003, HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells, *Exp Hematol*, 31 (10), 890–896.

85. ANJOS-AFONSO, F., SIAPATI EK, BONNET D., 2004, In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions, *J Cell Sci*, 117 (Pt 23), 5655–5664.

86. JAVAZON, E. H, BEGGS, K. J., FLAKE, A. W., 2004, Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging, *Exp Hematol*, 32 (5), 414–425.

87. SOTIROPOULOU, P. A., PEREZ, S. A., SALAGIANNI, M., et al, 2006, Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells, *Stem Cells*, 24 (2), 462–471.

88. NIEMEYER, P., SECKINGER, A., SIMANK, H. G, et al. 2004, Allogenic transplantation of human mesenchymal stem cells for tissue engineering purposes: an in vitro study, *Orthopade,* 33 (12), 1346–1353.

89. BARRY, F. P., MURPHY, J. M., 2004,Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization, *Int J Biochem Cell Biol*, 36(4), 568–584.

88. TOGEL, F., WESTENFELDER, C., 2007, Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair, *Developmental Dynamics*, 12, 3321-3331.

89. KUCIA, M., WU, W., RATAJCZAK, M. Z. (2007), Bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells: their developmental origin and biological significance, *Developmental Dynamics*, 12, 3309-3320.

90. HORWITZ, E. M., LE BLANC, K., DOMINICI, M., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F. C., DEANS, R. J., KRAUSE, D. S., KEATING, A., 2005, Clarification of the nomenclature for mkh : the international society for cellular therapy position statement cytotherapy, *International Society for Cellular Therapy*, 5, 393-395.

91. DOMINICI, M., LE, BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D., HORWITZ, E., 2006, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells, theınternational society for cellular therapy position statement, *Cytotherapy*, 4, 315-317.

92. LEE, K. D. 2008, Applications of mesenchymal stem cells: an updated review, *Chang Gung Medical Journal*, 3, 228-36.

93. DEMIRER, T., BUCKNER, C. D., BENSINGER, W. I. 1996, Optimization of peripheral blood stem cell mobilization, *Stem Cells*, 1, 106-116.

94. APPELBAUM, F. R., 1996, The use of bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of cancer, *Cancer Journal For Clinicians*, 46, 142- 164.

95. RATAJCZAK, M. Z., ZUBA-SURMA, E. K., MACHALINSKI, B., KUCIA, M. 2007, Bone-marrow- derived stem cells--our key to longevity?, *Journal of Applied Genetics*, 4, 307-319.

96. KÖRBLING, M., ANDERLINI, P., 2001, Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter?, *Blood Journal*, 15, 2900-2908.

97. GROVE, J. E., BRUSCIA, E., KRAUSE, D. S., 2004, Plasticity of bone marrow-derived stem cells, *Stem Cells*, 4, 487-500.

98. HASSAN, H. T., EL-SHEEMY, M. 2004, Adult bone-marrow stem cells and their potential in medicine, *Journal of the Royal Society of Medicine*, 97, 465–471.

99. LI, H. C., STOICOV, C., ROGERS, A. B., HOUGHTON, J., 2006, Stem cells and cancer: evidence for bone marrow stem cells in epithelial cancers, *World Journal of Gastroenterology*, 3, 363-371.

100. PLACZEK, M. R., CHUNG, I. M., MACEDO, H. M., ISMAIL, S., MORTERA BLANCO, T., LIM, M., CHA, J. M., FAUZI, I., KANG, Y., YEO, D. C., MA, C.Y., POLAK, J. M., PANOSKALTSIS, N., MANTALARIS, A., 2009, Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles, *Journal of the Royal Society Interface*, 32, 209-232.

101. WU, L. P., CHEN, F. X., LU, H. M., WU, Z. L., 2009, Biological characteristics of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in children with acute leukemia, *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 3, 734-8.

102. BHATTACHARYA, N., STUBBLEFIELD, P., 2009, *Frontiers of Cord Blood Science*, Springer, London, 978-1-84800-167-1.

103. LIN, T., ISLAM, O., HEESE, K., 2006, ABC transporters, neural stem cells and neurogenesis-a different perspective, *Cell Research*, 11, 857-871.

104. PROCKOP, D., BUNNELL, B., PHINNEY, D., 2008, Mesenchymal stem cells: methods and protocols, *Methods in Molecular Biology*, Human Press, 171-186.

105. SOTIROPOULOU, P. A., PEREZ, S. A., SALAGIANNI, M., BAXEVANIS, C. N., PAPAMICHAIL, M., 2006, Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells, *Stem Cells*, 24, 462-471.

106. BAXTER, M. E., WYNN, R. F., JOWITT, S. N., WRAITH, J., FAIRBAIRN, L. J., BELLANTUONO, I., 2004, Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion*, Stem Cells*, 22, 675-682.

107. GOTHERSTROM, C., WEST, A., LIDEN, J., UZUNEL, M., LAHESMAA, R., LE BLANC, K., 2005, Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells, *Haematologica*, 90, 1017-1026.

108. BOBIS, S., JAROCHA, D., MAJKA, M., 2006, Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications, *The Folia Histochemica et Cytobiologica*, 44, 215-230.

109. HORWITZ, E. M., GORDON, P. L., KOO, W. K. K., MARX, J. C., NEEL, M. D., MCNALL, R. Y., MUUL, L., HOFMANN, T., 2002, Isolated allogeneic bone marrow derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone, *PNAS*, 99 (13), 8932-8937.

110. KOÇ., N., GERSON, L., COOPER, B., DYHOUSE, S., HAYNESWORTH, S., CAPLAN, A. VE LAZARUS, H., 2000, Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy**,** *Journal of Clinical Oncology***,** 18: 307-316.

111. PETITE, H., VIATEAU, V., BENSAID, W., MEUNIER, A., POLLAK, C., BOURGUIGNON, M., OUDINA, K., SEDEL, L ve GUILLEMIN,G., 2000, Tissue-engineered bone regeneration, *Nature Biotechnology*, 18, 959 – 963.

112. TENG, Y. D., LAVIK, E. B., QU, X., PARK, K. I., OUREDNIK, J., ZURAKOWSKI, D., Langer, R., SNYDER, E. Y., 2002, Functional recovery following traumatic spinal cord ınjury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 3024–3029.

113. TAUPIN, P., 2008, *Stem Cells and Regenerative Medicine, Volume I: Adult Neurogenesis and Neural Stem Cells*, Biomedical Books, New York, 978-1-61668-578-2.

114. DULBECCO, R., FREEMAN, G., 1959, Plaque production by the polyoma virus, *Virology*, 8, 396-397.

115.160. STAGG, J., 2007, Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin, *Tissue Antigens*, 69, 1–9.

116. ZUK, P.A., ZHU, M., MIZUNO, H., HUANG, J., FUTRELL, J. W., KATZ, A. J., BENHAIM, P., LORENZ, H. P., HEDRICK, M. H., 2001, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Engineering*, 2, 211-28.

117. İNAN, S., ÖZBİLGİN, K., 2007, Kök hücre: biyolojik ve klinik yaklaşım, *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1 (5), 11-23.

118. GHERGHICEANU, M., POPEKHU, L.M., 2010, Cardiomyocyte precursors and telocytes in gorin nc, piantadosi s, stull m, bonte h, wingard jr, civin c. increased risk of lethal graft-versus-host disease-like syndrome after transplantation into nod/scid mice of human mobilized peripheral blood stem cells, as compared to bone marrow or cord blood, *J Hematother Stem Cell Res*., 11 (2), 277-292.

119. VENTURA, C., 2010, Cardiomyocyte proliferation: paving the way for cardiac regenerative medicine without stem cell transplantation, *Cardiovasc Research*, 4, 643-4.

120. DOBREVA, M. P., PEREIRA, P. N., DEPREST, J., ZWIJSEN, A., 2010, On the origin of amniotic stemcells: of mice and men, *The International Journal of Development of Biology*, 5, 761- 77.

121. MAURO, A., TURRIANİ, M., IOANNONI, A., RUSSO, V., MARTELLI, A., DI GIACINTO, O., NARDINOCCHI, D. VE BERARDINELLI, P., 2010, Isolation, characterization, and *in vitro* differentiation of ovine amniotic stem cells, *Veterinary Research Communnity,* 34 (1), 25-28.

122. DA SACCO, S., SEDRAKYAN, S., BOLDRIN, F., GIULIANI, S., PARNIGOTTO, P., HABIBIAN, R.,WARBURTON, D., DE FILIPPO, R.E. VE PERIN, L., 2010, Human amniotic fluid as a potential newsource of organ specific precursor cells for future regenerative medicineapplications, *The Journal of Urology*, 3, 1193-1200.

123. FENG, J. X., LA, X. L., MA, Y., BI, X. J., WEN, H., 2009, Isolation of human pluripotentmesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using two kinds ofculture protocol and their differentiation into neuron-like cells, *Zhongguo WeiZhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 12, 729-733.

124. SIEGEL, N., VALI, A., FUCHS, C., ROSNER, M., HENGSTSCHLÄGER, M., 2009, Induction Of mesenchymal/Epithelial Marker Expression In Human Amniotic Fluid Stem Cells, Reproductive Biomedicine Online, 6, 838-846.

125. GALENDE, E., KARAKIKES, I., EDELMANN, L., DESNICK, R. J., KERENYI, T., KHOUEIRY, G., LAFFERTY, J., MCGINN, J. T., BROMDAN, M., FUSTER, V., HAJJAR, R. J., POGLAR, K., 2009, Amniotic fluid cells are more efficiently reprogrammed to pluripotency than adult cells, cloning stem cells*, Cellular Reprogramming*, 12 (2), 117-125.

126. GARGETT, C. E., 2007, Review article: stem cells in human reproduction, *Reproductive Sciences*, 5, 405-24.

127. CHANTLER, C., BAUM, J. D., WIGGLESWORTH, J. S., SCOPES, J. W., 1969, Giant Umbilical cord associated with a patent urachus and fused umbilical arteries, *The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Commonwealth*, 76, 273-4. 2.

128. SEPULVEDA, W., DEZEREGA, V., CARSTENSI, E., GUTIERREZ, J., 2001, Fused Umbilical Arteries: Prenatal Sonographic Diagnosis And Clinical Significance, *Journal of Ultrasound in Medicine,* 20, 59-62.

129. TIRAN, D., 2008, *Baillière's Midwives' Dictionary*, Baillière Tindall, Edinburgh, UK, 978-0-7020-2884-7

130. CUNNINGHAM, F. G., LEVENO, K. J., BLOOM, S. L., 2005, Subclinical Hypothyroidism and Pregnancy Outcomes, *Williams Obstetrics*, 105(2), 239-245.

131. PAMUKÇU BARAN, Ö., NERGİZ, Y., BAHÇECİ, S., 2007, Göbek Kordonu Kan ve Stromal Kökenli Hücrelerin Sinir Hücrelerine Farklılaşması, *Dicle Tıp Dergisi*, 34 (3), 233-238.

132. RAIO, L., GHEZZI, F., DI NARO, E., 1999, Sonographic measurement of the umbilical cord and fetal anthropometric parameters, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 83, 131–135.

133. DI NARO, E., GHEZZI, F., RAIO, L., 2001, Umbilical cord morphology and pregnancy outcome, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 96, 150 –157.

134. CHANTLER, C., BAUM, J. D., WIGGLESWORTH, J. S., SCOPES, J. W., 1969, Giant umbilical cord associated with a patent urachus and fused umbilical arteries, *The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Commonwealth*,76 (3), 273-274.

135. SEPULVEDA, W., DEZEREGA, V., CARSTENSI, E., GUTIERREZ, J., 2001, Fused umbilical arteries: prenatal sonographic diagnosis and clinical significance, *Journal of Ultrasound in Medicine,* 20, 59-62.

136. RACHAKATLA, R.S., TROYER, D., 2009, Wharton's jelly stromal cells as potential delivery vehicles for cancer therapeutics, *Future Oncology*, 8, 1237-1244.

137. TROYER, D. VE WEISS, M., 2008, Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromalcell population, *Stem Cells*, 3, 591-599.

138. MCELREAVEY, K. D., IRVINE, A.I., ENNIS, K. T., MCLEAN, W. H., 1991, *Biochemical Society Transactions*, Portland Press, England, 0300-5127.

139. SHLEBAK, A. A., MARLEY, S. B., ROBERTS, I. A., DAVIDSON, R. J., GOLDMAN, J. M., GORDON, M. Y., 1999, Optimal timing for processing and cryopreservation of umbilical cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation, *Bone Marrow Transplant*, 2, 131-136.

140. TISATO, V., NARESH, K., GIRDLESTONE, J., NAVARRETE, C., DAZZI, F., 1992, Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease, *Leukemia*, 21(9), 1992-1999.

141. GORIN, N. C., PIANTADOSI, S., STULL, M., BONTE, H., WINGARD, J. R., CIVIN, C., 2002, Increased risk of lethal graft-versus-host disease-like syndrome after transplantation into nod/scıd mice of human mobilized peripheral blood stem cells, as compared to bone marrow or cord blood, *J Hematother Stem Cell Res.*, 11(2), 277-292.

142. ZUK, P. A., ZHU, M., MIZUNO, H., HUANG, J., FUTRELL, J. W., KATZ, A. J., BENHAIM, P., LORENZ, H. P., HEDRICK, M. H., 2001, Multilineage cells from

human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Engineering*, 2, 211-228.

143. DOMANSKAJANIK, K., BUZANSKA, L., LUKOMSKA, B., 2008, A novel, neural potential of non-hematopoietic human umbilical cord blood stem cells, *International Journal of Developmental Biology*, 52, 237-248.

144. KANG, K. S, KIM, S. W., OH, Y. H., YU, J. W., KIM, K. Y., 2005, A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human uc blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study, *Cytotherapy*, 7(4), 368-373.

145. WIWANITKIT, V., 2009, *Cell, Gene and Molecular Therapy*, Nova Biomedical Books, New York, 978-1-60741-682-1.

146. KOBLAS, T., HARMAN, S. M., SAUDEK, F., 2005, The application of umbilical cord blood cells in the treatment of diabetes mellitus, *The Review of Diabetic Studies*, 2 (4), 228-234.

147. NEWCOMB, J. D., SANBERG, P. R., KLASKO, S. K., WILLING, A. E., DOMANSKA-JANIK, K., 2007, Umbilical cord blood research: current and future perspectives, *Cell Transplantation*, 2, 151-158.

148. BUZANSKA, L., LUKOMSKA, B. 2008, A novel, neural potential of nonhematopoietic human umbilical cord blood stem cells, *The International Journal of Developmental Biology*, 52, 237-248.

149. SARUGASER, R., LICKORISH, D., BAKSH, D., HOSSEINI, M. M., DAVIES JE., 2005, Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors, *Stem Cells*, 23(2), 220-229.

150. KANSU E., 2006, Erişkin Kök Hücreleri: Pluripotensi ve Kendini Yenileme Kavramları, *II.Current Perspectives on Stem Cell Biology and Clinical amplications Symposium*, T. B. A. K. H. Ç. G., 10-13.

151. ZVAIFLER, N.J., MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L., ADAMS, G., EDWARDS, C.J., MOSS, J., BURGER, J.A. , MAN, R.M., 2000, Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals, *Arthritis Research*,.2, 477-488.

152. SHAHDADFAR, A., FRØNSDAL, K., HAUG T, REINHOLT, F. P., BRINCHMANN, J. E., 2005, *In vitro* expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability, *Stem Cells*, 23 (9):1357-1366.

153. BIEBACK, K., KERN, S., KLUTER, H., EICHLER, H., 2004, Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood, STEM CELLS, 22, 625–634.

154. FRANCESE, R., FIORINA, P. 2010, Immunological and regenerative properties of cord blood stem cells, *Clinical Immunology*, 136 (3), 309-322.

155. MUSINA, R. A., BEKCHANOVA, E. S., SUKHIKH, G. T., 2005, Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues, *Cell Technologies in Biology and Medicine*, 1 (2), 504-509.

156. WEXLER, E., PALMER, T., 2002, Where, oh where, have my stem cells gone?, *Trends in Neurosciences*, 25 (5), 225-227.

EKLER

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 937 Tarih : 25/11/2010

Konu : Yard. Doç. Dr. Mehmet Rıfkı TOPÇUL hk,

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

İlgi : Dekanığın 27.10.2010 tarihli 51979 sayılı yazınız

Sorumlu araştırıcılığını Üniversitemiz Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Mehmet Rıfkı TOPÇUL'un üstlendiği ve Yük. Lis. Öğr. İdil ÇETİN'in yürüteceği 2010/785 - 240 dosya numaralı "Kordon Kanından Elde Edilen Kök Hücrelerin Diferansiyasyonu, Moleküler ve Biyokimyasal Analizleri" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 03.11.2010 tarihli 07 sayılı toplantısında etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Tutanakların Üniversitemiz Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Mehmet Rıfkı TOPÇUL'a iletilebilmesi hususunda gereğini saygılarımla arz ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Tarihi : 03/11/2010

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Toplantı Sayısı : 07

Sorumlu araştırıcılığını Üniversitemiz Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Mehmet Rıfkı TOPÇUL'un üstlendiği ve Yük. Lis. Öğr. İdil ÇETİN'in yürüteceği 2010/785 - 240 dosya numaralı "Kordon Kanından Elde Edilen Kök Hücrelerin Diferansiyasyonu, Moleküler ve Biyokimyasal Analizleri" başlıklı araştırma kurulumuzca incelenmiştir.

Etik yönden uygun bulunmuştur.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İ.Ü. Farmakoloji ve Klinik Far. A.D.
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Prof.Dr. Ayşen BULUT (T.Katılmadı)
Halk Sağlığı (Emekli)

Prof.Dr. Berrin UMMAN
İ.Ü. Kardiyoloji A.D. (Bşk. Yardımcısı)

Doç.Dr. Tufan TÜKEK
Vakıf Gureba E. ve Araş. Hst. İç Hast.

Prof.Dr. Ahmet GÜL
İ.Ü. İç Hastalıkları A. D.

Prof.Dr. Ünal KUZGUN
Şişli Etfal Eğitim ve Araş. Hst. Ortopedi

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN
İ.Ü. Nöroloji A. D.

Prof.Dr. Ahmet O. ARAMAN (T.Katılmadı)
İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Dekanı

Prof.Dr. Pınar SAİP
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Demir TİRYAKİ
Biyofizik (Emekli)

Prof.Dr. Rukiye Eker ÖMEROĞLU
İ.Ü. Çocuk Sağ. ve Hast. A. D.

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK
İstanbul Üniversitesi

Uzm.Dr. Ahmet Rıza URAS
Vakıf Gureba E. ve Araş. Hst. Biyokimya

M. Kerim AKMAN
İİBF İktisat Bölümü (Özel)

Doç.Dr. H. Hanzade DOĞAN
İ.Ü. Cerrahpaşa T.F. Deontoloji

ÖZGEÇMİŞ

29.01.1985'te İstanbul'da doğdum. Orta öğretim ve lise eğitimimi Vefa Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2005 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne girdim. 2009 yılında okul 4.'sü olarak Biyoloji Bölümü ile birlikte Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden mezun oldum. Eylül 2009 tarihinde Genel Biyoloji yüksek lisans programına kabul edildim. 2009-2010 ve 2010-2011 eğitim-öğretim dönemlerinde "Genetik" ile "Hücre ve Doku Kültürü" derslerinde öğrenci asistan olarak, 2010 ve 2011 yaz döneminde İstanbul Üniversitesi Çocuk Üniversitesi "Biyolojinin Bin Bir Rengi" programında baş asistan olarak görev aldım. Şu anda TEV Bursu almaktayım. Yüksek lisans eğitimimi "Kordon Kanından Elde Edilen Kök Hücrelerin Diferansiyasyonu, Moleküler ve Biyokimyasal Analizleri" başlıklı tez çalışmam ile bitirmekteyim.