

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADİPOZ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
HÜCRE YÜZEY MARKERLERİNİN İMMUNOSİTOKİMYASAL
DEĞERLENDİRMESİ

Dr.GÜLSEMİN ÇİÇEK

UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2017

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KÖK HÜCRELER

2.1.1. Kök Hücre Tanımı ve Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücreler in vivo ve in vitro olarak uygun şartlar altında kendi kendini yenileyebilen, özelliklerinin kaybetmeden çoğalabilen ve farklılaşabilen hücrelerdir. Belirli şartlar altında çeşitli özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler. Kök hücreler farklılaşma özelliklerine göre sınıflandırılırlar:

1. Totipotent: Erkeğin spermi ile kadının yumurtası birleştiğine oluşan hücre(zigot) tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. İlk 4 gün içerisinde oluşan bu hücreler totipotent kök hücrelerdir.

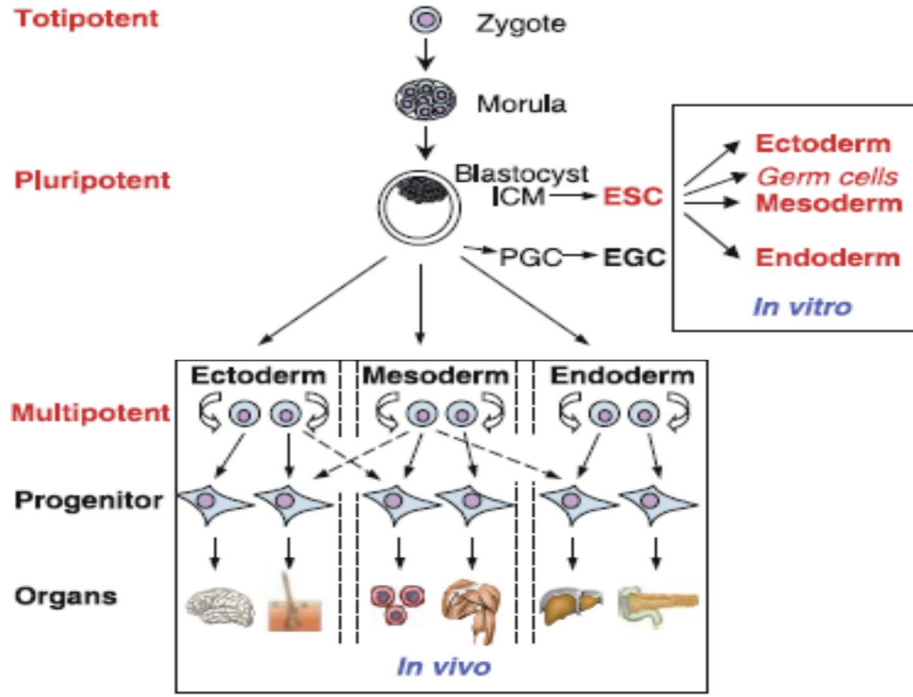
2. Pluripotent: Döllenmeden sonraki 5. günden sonra oluşan hücreler vücuttaki tüm hücelere dönüşebilme potansiyeline sahip olsa da; ancak tek başına bir canlıyı meydana getiremezler. Bu hücelere “pluripotent hücre” adı verilir. Blastosist aşamasındaki embriyoda iç hücre kitlesinden elde edilirler ve embriyonik kök hücre adını alırlar. Proliferasyon kapasiteleri çok yüksektir. Her 3 germ tabakasına da (mezoderm, endoderm, ektoderm) farklılaşabilirler. Ortalama 200 çeşit hücre tipine farklılaşabildikleri anlamına gelir.

3. Multipotent: Pluripotent hücreye göre daha sınırlı sayıda hücreye dönüşebilme potansiyelleri vardır. İçerisinde yer aldıkları germ tabakasına ait hücelere farklılaşabilirler. Çok sayıda hücre tipine farklılaşabilmektedirler.

Unipotent hücreler: Yalnız 1 çeşit hücreye dönüşebilme kapasitesine sahiptirler(Sağsöz ve Ketani, 2008).



Şekil.1. Zigot ve embriyo aşamasında totipotent evre; blastosist aşamasında pluripotent evre (Zuccotti ve ark., 2009)



Şekil.2. Totipotent, Pluripotent ve Multipotent Kök Hücre Aşamaları ve Farklılaşma Kapasiteleri (Ragina ve Cibelli, 2009)

Kök Hücre Plastisitesi

Belli bir dokudan alınan kök hücrelerin farklı dokuya ait kök hücrelere farklılaşabilmeleri plastisite olarak tanımlanır. Oluşan yeni hücreler tek seriden gelişen homojen bir topluluktur ve terapötik amaçlı verildiğinde alıcı dokuda işlevseldir. Örneğin; yapılan çalışmalarda kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin miyosit, hepatosit, nöronal hücre ve renal hücreye farklılaşabildiği gösterilmiştir (Eglitis ve Mezey, 1997; Orlic ve ark., 2001; Bai ve ark., 2003; Itescu ve ark., 2003; Masuya ve ark., 2003; Wang ve ark., 2003).

Plastisiteyi belirleyen şartları sayacak olursak; tek bir hücrenin birden fazla hücre soyuna ayrılması, farklılaşmamış hücrelerin in vitro ve in vivo fonksiyonel olabilmesi ve oluşan hücrenin sağlam ve kalıcı olmasıdır (Lakshmiathy ve Verfaillie, 2005). Deneysel olarak hücrelerin kimliklerinin değişmesi olarak görülebilen in vitro plastisite çalışmaları aslında normal fizyolojide hücrenin çevredeki değişikliklere ve sinyallere doğal yanıtının bir benzeridir (Merrell ve Stanger, 2016).

Kök hücrelerin bölünmesi 2 çeşit mekanizmayla olur. Asimetrik hücre bölünmesinde oluşan kök hücrelerden biri ilk hücre ile özdeş olur; diğeri farklılaşır. Simetrik hücre bölünmesinde ise kök hücre bölündüğünde ilk kök hücreyle birebir özdeş iki kök hücre oluşur.

2.2. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımı ve Kültürdeki Özellikleri

İlk defa 1867 yılında Cohnheim tarafından kemik iliğinde nonhemotopoetik kök hücrelerin varlığı gösterildi. Hasarlı dokuda rejenerasyona yardım etmek için yara bölgesine göç eden fibroblast benzeri morfolojide hücreler olduğu hipotezini kurdu. 1960 larda Friedenstein ve çalışma arkadaşları tarafından kemik iliği kaynaklı ve osteojenik olarak farklılaşabilen hücreler izole edildi ve kültürleri yapıldı. Yaklaşık 20 sonra Caplan ve Owen tarafından mezenkimal kök hücre ve stromal kök hücre terimleri bilimsel literatüre tanıtıldı (Caplan, 1991; Bianco ve ark., 2008).

MKH' ler kültürde çoğaltıldıklarında plastiğe yapışma özelliği gösterirler ve fibroblast benzeri iğsi fuziform şekildedirler. Nukleus yerleşimleri simetriktir. Uluslararası Kök Hücre Araştırma Komitesinin (ICST) belirlediği MKH özellikleri;

1. Hücre kültür ortamında kültür kabına yapışabilen iğsi fibroblast benzeri özellikte olmaları
2. MKH'lerde eksprese edilen yüzey işaretleyicileri CD105, CD73, CD90, CD44 ve eksprese edilmeyen (hematopoetik spesifik markerlar) CD45, CD34, CD11b, CD14, CD31, CD79A, HLA-DR dir
3. Adiposit, osteosit ve kondrositlere farklılaşma kapasitesi, göstermelidir (Volarevic ve ark., 2017).

2.2.2. MKH Yüzey Ekspresyonları

Hücrelerin yüzeyinde, hücre sel yapışma molekülleri olarak rol oynayan veya hücre sinyal yolları üzerinde etkili "CD" olarak adlandırılan farklılaşma kümeleri (Cluster of Differentiation) vardır. Mezenkimal kök hücrelerin belirli yüzey belirteçleri eksprese ettikleri gösterilmiştir (Baer ve Geiger, 2012). Bunlar hücre türüne göre çok özgün veya

yaygın belirteçler olabilir. İnsan mezenkimal kök hücreleri HLA-ABC ekspresyonu gösterirken; HLA-DR ekspresyonu göstermezler. Mezenkimal kök hücrelerde başlıca pozitif yüzey belirteçleri CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 iken; CD34 (hematopoetik kök hücre belirteci), CD45 (lökosit belirteci), CD19 (B lenfosit belirteci) , CD14 (monosit ve makrofaj belirteci), CD11b (monosit ve makrofaj belirteci) gibi yüzey belirteçleri eksprese etmezler. Bunlar daha çok hematopoetik kök hücrelere özgüdür (Bourin ve ark., 2013). CD105 (endoglin) hücre yüzeyinde bulunan tip 1 membran glikoproteinidir ve TGF-b reseptör kompleksinin üyesidir. CD105 sıklıkla endotel hücreleri ile birlikte bulunur. CD166 (ALCAM-aktif lökosit adezyon molekülü); spesifik SB-10 antijeni olarak tanımlanmıştır ve diferansiye olmamış mezenkimal hücrelerde bulunur. CD44 antijeni hücre yüzey glikoproteinidir ve hücreler arası iletişim, adezyon , migrasyonda rol oynar. CD90 (Thy-1) timosit antijendir ve hücre yüzeyinde GPI (glikozilfosfolinositol) bağımlı olarak yer alır. Yüzey belirteçlerinden laboratuvarlar güvenilir olarak çalışabildiklerini seçip, kültür ortamında çoğalttıkları hücrelerin MKH olduğunu doğrulamak için kullanmaktadır. Bu moleküller adezyon ve stromal özellikleri tanımlamaktadır (Haasters ve ark., 2009).

Embriyonik kök hücre ile ilişkili belirteçlerin yetişkin kök hücre popülasyonlarında mevcut olup olmadıkları ve farklı doku kaynakları ile ilişkili olup olmadıkları halen açık ve tartışılan konulardır. Hücre yüzey ekspresyonları ile ilgili yapılan çalışmalarda MKH lerin Nanog, Sox2, Oct-4 gibi embriyonik markerları da eksprese edebileceği gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2008; Riekstina ve ark., 2009). MKH'lerin hücre yüzeyi antijeni kapsamlı olarak araştırılmış olsa da, benzersiz kök hücre belirteçlerini göstermezler ve benzersiz kök hücre belirteçlerinin bu yetişkin hücrelerle ilişkili olduğuna dair kesin bir kanıt bulunmamaktadır.

2.2.3. MKH Kaynakları

MKH'ler kemik iliği, yağ dokusu, umbilikal kord, plasenta, synovium, endometrium, menstrüel kan, fetal karaciğer, kas dokusu ve diş pulpasından izole edilebilirler.

Kemik iliği kökenli MKH'ler osteojenik kapasite açısından ADSC'lere oranla daha iyiyken; kollajen üretiminde daha zayıftır. ADSC'lerin uzun süren kültürlerde daha

dayanıklı olduğu, daha az senesence gözlendiği ve proliferasyon kapasitesini koruduğu gözlenmiştir (Strioga ve ark., 2012).

2.2.4. MKH Etkileri

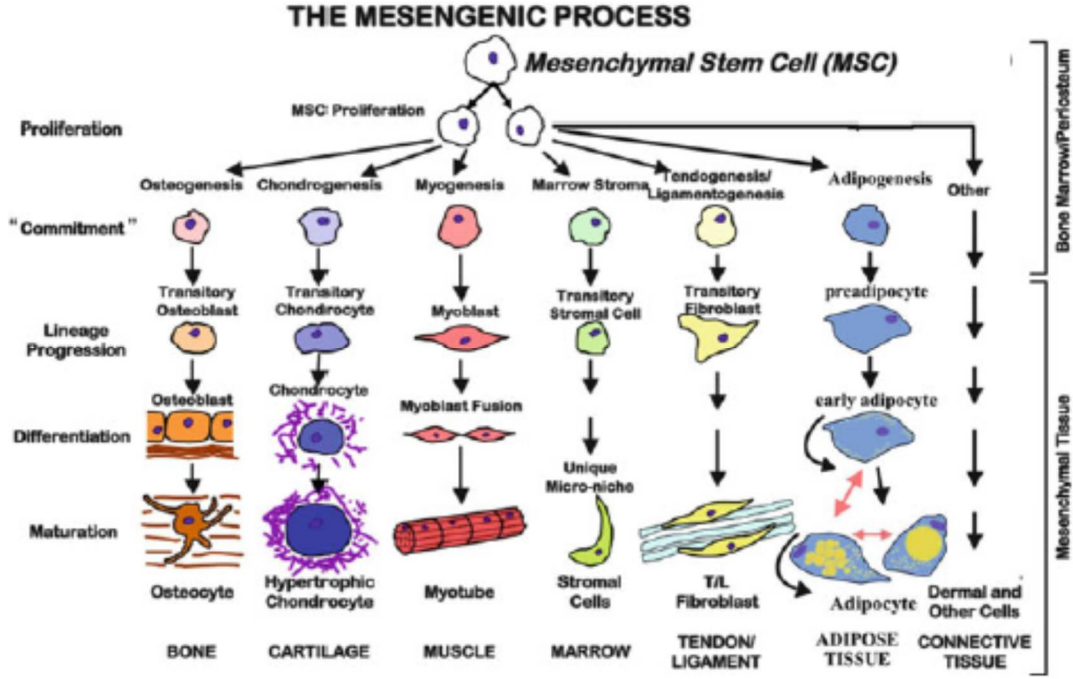
MKH Farklılaşma Potansiyeli

Tipik bir multipotent kök hücre olan MKH; adiposit, osteosit, kondrosit, myosit (kardiyomyosit, iskelet kası ve düz kas hücreleri) ve nöron benzeri hücelere farklılaşabilir. Seri pasajlar sonrasında ve uzun süren kültürlerde multipotent özelliklerinin kaybetmezler. İn vitro olarak istenilen farklılaşma yönüne göre kullanılan seçici medium ve media eklenen indüksiyon faktörleriyle MKH'lerin farklılaşması sağlanabilir. Mezodermal seri kök hücrelerin spesifik farklılaşmasının tetiklenmesi birçok moleküler ve transkripsiyonel olaya bağlıdır. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin aynı zamanda anjiojenik ve hematopoetik olarak destek hücreleri olduğu gösterilmiştir. Bu destek genel olarak antiapoptotik, anjiojenik ve hematopoetik faktörlerin (sitokinler , büyüme faktörleri) sekresyonu şeklindedir. Adipoz doku kaynaklı MKH'lerin mezodermal kökenli olsalar da; nonmezodermal hücre serilerine farklılaşma potansiyelleri vardır. Ektodermal ve mezodermal kökenli hücelere farklılaşma potansiyellerinin olduğu gösterilmiştir. Her 3 germ tabakası hücrelerine farklılaşabilen MKH'ler için multipotent yerine pluripotent terimi de gündeme gelmiştir; ancak bilimsel komiteler tarafından bu durum henüz onaylanmamıştır. Morfoloji olarak diğer pluripotent kök hücrelerden farklıdır ve teratoma oluşturma potansiyelleri gösterilmemiştir (Baer ve Geiger, 2012). İn vitro koşullarda hepatosit, pankreatik islet hücreleri, nöral hücreler, endotelial hücreler ve epitelyal hücelere farklılaşabildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Seo ve ark., 2005; Baer ve ark., 2010; Fang ve ark., 2010)

MKH'lerin klonal analizi yapıldığında, her hücrenin bir trilineage farklılaşma potansiyeline sahip olmadığı gösterilmiştir. Klonların % 81'i soylardan en az birine ayrılırken; %50'si iki veya daha fazlasına ayrıldığı gösterilmiştir. MKH'lerin unipotent projenitör hücre popülasyonu karışımı değil, bir tip erişkin multipotent kök hücre olduğu ileri sürülmektedir (Baer ve Geiger, 2012).

MKH'ler kırıkta, kemik, kas ve yağ dokusunda rejenerasyon ve tamir yapabilir. Periferik sinir rejenerasyonu, hepatik rejenerasyonu, insülin üreten islet hücre rejenerasyonu

, myokard infarktüsünün fonksiyonel tamiri ve renal fonksiyonların düzelmesi yapılan in vivo çalışmalarda gösterilmiştir. Yapılan in vivo çalışmalar farklılaşmamış MKH'lerin uygun şartlar altında farklılaşabildiğini göstermiştir (Lo Furno ve ark., 2016).



Şekil.3. Kök hücre farklılaşma kapasiteleri (Turksen, 2009)

MKH İmmunmodulator Etkileri

Farklılaşma potansiyelinin yanı sıra MKH'ler, immün aracılı hastalıkların tedavisinde yararlı terapötik etkileri için önemli olan en az iki özellik daha sahiptir: dokuların hasar gördüğü bölgeye gidiş ve immün cevabın modülasyonu. MKH lerin immunmodulator etkileri henüz tamamen aydınlatılmamıştır. MKH yaralı dokuya yapışır. Doku hasarından sonra ve enflamasyon sırasında salınan inflamatuvar sitokinler (tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), interlökin (IL) -1, interferon-gama (IFN- γ), yuvarlanma ve göçü yönlendiren adezyon moleküllerinin hücre yüzeyi ekspresyonunu indüklenerek MKH 'nin ekstraselüler matrikse yönlendirilmesi sağlanır. İnflamasyonun başlangıcında, inflamatuvar mediatörlerin (IFN- γ , TNF- α ve IL-1 β) düşük seviyelerde varlığında, MKH'ler proinflamatuvar fenotipi benimser, nötrofillerin aktivasyonunu ve migrasyonunu uyaran büyük miktarda proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler üretir. İnflamasyonun geç fazında ise yüksek miktarda sitokinlerin salınımıyla MKH dokuya girdiğinde; antiinflamatuvar bir fenotip kazanır ve inflamatuvar fonksiyonların baskılanmasıyla birlikte doku tamiri ve

homeostazisle sonuçlanır (Volarevic ve ark., 2017). T ve B hücre cevaplarını da etkilemektedir (Uccelli ve ark., 2006). T hücre proliferasyonunu, sitokin sekresyonunu sitotoksisteyi baskılar ve Th1/Th2 dengesine katkıda bulunur (Siegel ve ark., 2009). Treg hücrelerini de regüle eder. B hücrelerinin viabilitesini artırır; ancak onların proliferasyonlarını inhibe edebilir. B hücrelerinin ko-stimülatör moleküllerinin üretimini ve antikor sekresyonunu etkiler. Dendritik hücrelerin antijen sunumunu, maturasyonunu ve aktivasyonunu inhibe eder (Gao ve ark., 2016). Sonuç olarak MKH'ler ortamda güçlü inflamasyon varlığında immunsupresif, aksine zayıf inflamasyon varlığında immun cevabı artırır nitelikte davranırlar.

Allerjik rinit, astım, kolit, romatoid artrit, SLE, otoimmun tiroidit, kontakt dermatit gibi birçok hastalıkta immun cevabı regüle ettiği gösterilmiştir (Gao ve ark., 2016).

MKH Parakrin Etkileri

Kök hücre biyolojisini anlamada biyolojik olarak aktif mediatörlerin salınımını ve eksprese edilmesini göstermek önemlidir. Parakrin sitokinlerin salınımının aktiflenmesi için hücre içinde bulunduğu ortamdan etkilenmesi ile veya ortama saldığı kendi mediatörleri ile olabilir. Bu yüzden içerisinde buldukları mikroçevrenin kimyasal ve fiziksel özellikleri kök hücrelerin kaderi açısından çok önemlidir. Ek olarak patolojik durumlarda da parakrin mediatörlerin etkileri vardır. Doku hasarına yanıt olarak ortaya çıkan parakrin faktörlerin salınımı endojen tamir ve rejenerasyon mekanizmalarını aktive eder ve hücrenin hayatta kalmasını etkiler. Kök hücreler ve öncül hücreler çoğalma ve farklılaşma arasındaki dengenin sağlanmasıyla yaşamın devamı için dokuyu korurlar. Erişkin kök hücreden salınan faktörler parakrin mekanizmalar ile kök hücre mobilizasyonu sonrası gözlenen onarıcı süreçte önemli bir rol oynamaktadır ve bu hipotezi destekleyen kanıtlar giderek artmaktadır (Gündeşlioğlu ve ark., 2013).

Mezenkimal kök hücrelerden kaynaklı ekstraselüler vezikül (EV)'ler birçok hastalıkta tedavi edici özelliği bulunan yapılardır. Hücreler tarafından sekrete edilen EV'ler genellikle mikrovezikül, hücre kökenli vezikül, mikropartikül, salınan vezikül ve eksozom olarak adlandırılırlar. EV 'ler hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde hücreler arası iletişimde önemli mediatörlerdir. Hücre tiplerine ve fizyolojik şartlara göre vezikül içeriği değişkenlik gösterir; EV'ler çeşitli protein, lipid ve nükleik asit içerirler. EV'ler tıpkı bir

kargo gibi proteinleri, RNA' ları ve tanımlanmamış bazı molekülleri bünyesinde barındırır. EV içereği dokudaki hücrelerin proliferasyonunu desteklerken, apoptozisin inhibisyonunu intraselüler sinyal yollarına etki ederek sağlarlar (Abels ve Breakefield, 2016). Mikroveziküller; trombositler, endotelial hücreler, eritrositler, monositler, lenfositler ve lökositler gibi çeşitli hücrelerden aktivasyonla ya da apoptozisle salınır. Bu EV'lerden 50-200 nm çapında olanlara eksozom denmektedir ve eksozomlar da hücreler arasındaki iletişimde önemli rol oynarlar (Katsuda ve Ochiya, 2015). Bununla birlikte MKH'ler tarafından salgılanan sitokin ve büyüme faktörlerindeki değişimler dokuda yerleşik olarak bulunan (göç etmeyen) hücrelerin fonksiyonunu etkileyebilir; hatta etkileri MKH ortadan kaybolduktan sonra bile devam eder (Hoogduijn ve ark., 2016). İntravenöz yolla verilen kök hücreler böbrek, akciğer, karaciğer gibi organlara girişte boyutları sebebiyle sıkışma yaşasalar da; onlardan salınan eksozomlar ilgili organlara gidip orada etki edebilirler (Riazifar ve ark., 2017).

2.2.5. MKH'lerin Klinik Kullanımı

Klinik kullanımını daha güvenli olduğu belirlenen mezenkimal kök hücreler multipotent karaktere sahip, elde edilmesi ve üretilmesi kolay olan hücrelerdir. Klinik kullanımları için HLA doku uygunluğu şartı yoktur. Vücuda alındıklarında herhangi bir immün yanıt oluşturmazlar. Bu özellikleri sayesinde klinik kullanımlarında herhangi bir immün sistem baskılayıcıya gerek kalmamaktadır.

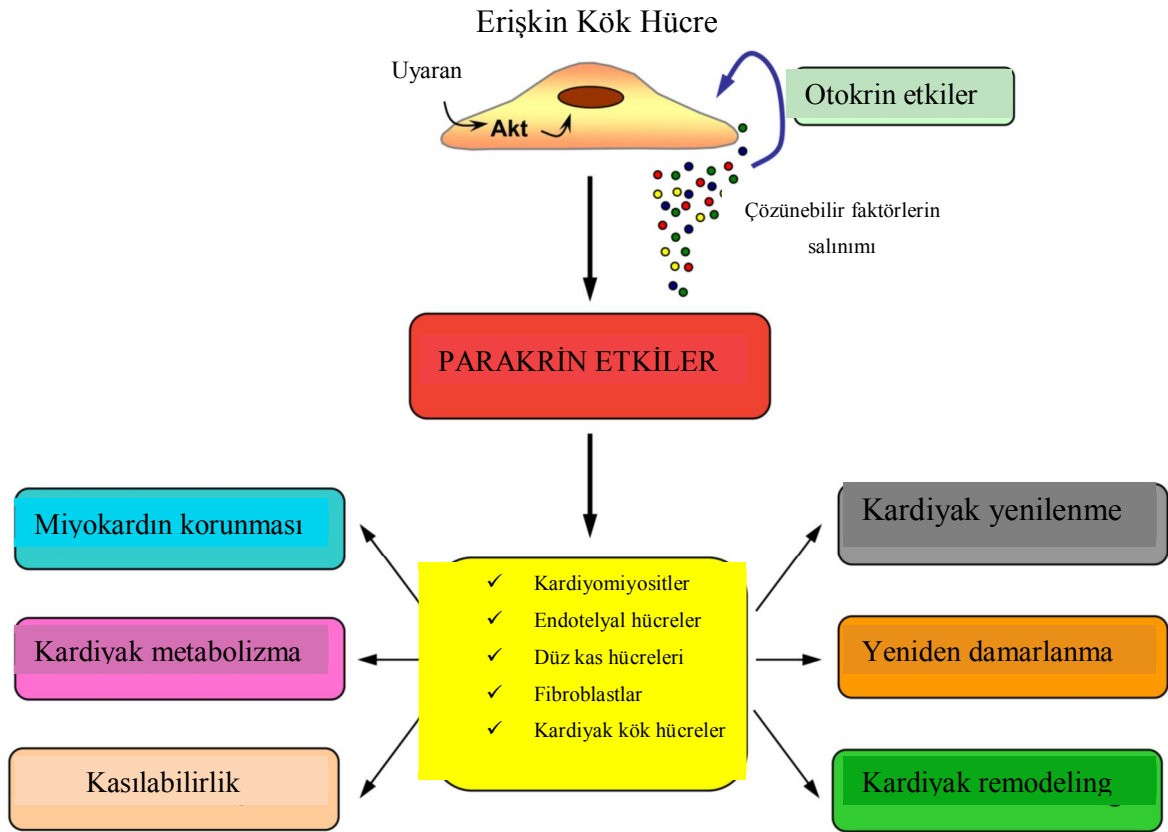
Hücre bazlı tedavilerde otolog kemik iliği kaynaklı MKH ile özellikle de sayısal olarak kemik iliğine nazaran çok daha bol MKH barındıran yağ dokusu tercih edilmektedir. MKH'ler hasarlı dokuya göç etmeleri, doku rejenerasyona destek olmaları, immunmodulator özellikte olmaları nedeniyle; in vitro koşullarda çoğaltılıp klinik olarak kullanılabilirler. MKH'lerin sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin parakrin sekresyonunu yapma kapasiteleri onları klinik olarak çok daha çekici bir hale getirmiştir. Dahası; anti-apoptotik, anti-inflamatuvar, proanjojenik ve immunmodulator etkileri gösterilmiştir. Birleşik Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü internet sayfasında yaklaşık 130 adet aktif klinik çalışma listelenmiştir. MKH'lerin hem immün hem de immün olmayan birçok hastalığın tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. MKH'lerin onarıcı etkilerinin prelinik ve klinik modellerde gösterilmesiyle, yara iyileşmesinde kritik role sahip oldukları fikri güçlenmiştir (Squillaro ve ark., 2016).

İmmün sistem hastalıklarında da MKH'lerin immün cevabı güçlü bir şekilde düzenleyen etkileri gösterilmiştir. Örneğin kemik iliği transplantasyonu sonrası gelişen Graft-Versus-Host Hastalığı (GVHH)'da özellikle steroid direnci olan hastalarda başarılı bir şekilde tedavi sağladığı gösterilmiştir. Aynı zamanda Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) ve Crohn Hastalığında da, hem otolog hem de allojenik MKH terapisinin inflamasyonu baskıladığı ve regülatuar T hücrelerinin indüklenmesiyle böbrek ve barsak hasarını azalttığı gösterilmiştir (Dhere ve ark., 2016). Multipl Sklerozis (MS) ve Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS)'de de benzer immunmodulator etkileri olduğu gösterilmiştir (Petrou ve ark., 2016; Tejedor ve ark., 2016).

Kardiyovasküler Hastalıklarda Kullanımı

Son yıllarda kardiyovasküler ve myokardiyal doku rejenerasyonunda hücresele terapiler daha geniş bir yer almaya başlamıştır. MKH'lerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik kapasitelerinin yanı sıra myojenik kapasiteye sahip olması myokard iskemi rejenerasyonunda önemlidir. Kök hücrelerden salgılanan parakrin faktörler kardiyomyositlerde apoptozisi azaltır ve kardiyak kök hücreleri aktive eder. Yapılan çalışmalarda; iskemik kalp hastalığı ve kronik kalp hastalığında intrakoroner kök hücre enjeksiyonundan haftalar sonra kardiyak fonksiyonların ve beslenmenin iyi yönde geliştiği gösterilmiştir (Valina ve ark., 2007; Quevedo ve ark., 2009).

MKH ler; kardiyovasküler sistem için önemli olan kardiyomyosit, endotelial hücreler ve vasküler düz kas hücrelerine farklılaşabilirler (Fraser ve ark., 2006). Vasküler endotelial growth faktör (VEGF), hepatosit growth faktör (HGF), insülin like growth faktör (IGF-1) ve çeşitli microRNA'lar gibi protektif maddeler sekrete ederler (Ikegame ve ark., 2011). Miyokard infarktüsü; ilerleyici kardiyomyosit kaybı ve ventrikül remodelingiyle birlikte konjestif kalp yetmezliğiyle sonuçlanır. MKH'lerden salgılanan IGF-1 kardiyak hücrelerde PI3K ve MEK1 yollarını aktive ederek antiapoptotik etki gösterir (Mehrhof ve ark., 2001). Kardiyak remodeling kardiyak hipertrofi ve fibrozisle karakterizedir. HGF; ADSC'ler tarafından salınır ve antifibrotik özelliktedir. Özetle MKH ler antiapoptotik, anti-kardiyak remodeling ve anjiogeneziste önemli rol oynayarak kardiyovasküler iskeminin hasarını azaltır (Ma ve ark., 2017).



Şekil.4. Kök hücre terapisinde parakrin etkiler (Gnecchi ve ark., 2008)(Uyarlanmıştır)

Nörolojik Hastalıklarda Kullanımı

Yapılan prelinik çalışmalar MKH lerin nöroinflamasyonu etkin bir şekilde baskıladığı , nörolojik fonksiyonel bozukluklara ait semptomları geriletği ve lokal lezyonları azalttığı gösterilmiştir (Drela ve ark., 2013). Nüfusun yaşlanması ve diyabetteki artışla birlikte inme hastalığı (stroke) da çok sık görülmeye başlanmıştır. İnme sonrası sadece nöronlar değil; aynı zamanda glionörovasküler ortam dediğimiz hücre dışı matriks ortamı da etkilenmektedir.

Yine faz I ve II klinik çalışmalarında kök hücrelerin kullanım güvenilirliği ve uzun süre etkileri üzerine durulmuştur. Multipl skleroz, amyotrofik lateral skleroz, spinal kord hasarı gibi nörolojik hastalıkları içeren klinik çalışmalar mevcuttur (Squillaro ve ark., 2016).

Kas İskelet Hastalıklarında Kullanımı

Osteoartrit daha çok yaşlı popülasyonda görülen ağrılı ilerleyici bir hastalıktır. NSAID , steroid, hyaluronik asid ve fizikoterapi gibi tedaviler daha çok semptomatik tedavilerdir. Nihayetinde morbidite oranı yüksek diz ve kalça replasmanına ilerleyen bir süreç mevcuttur. Yapılan hayvan çalışmaları (Carter ve ark., 1998) ve ardından insan çalışmalarda kartilaj rejenerasyonunda MKH lerin başarılı bir şekilde kullanılabilceği gösterilmiştir (Westminster ve ark., 2008). Kök hücrelerden sekrete edilen sitokin, kemokin, büyüme faktörleri ve eksozomların ; çevredeki projenitör hücreleri pozitif yönde etkiledikleri ve bunun yanında enjekte edilen kök hücrelerin de dokuya spesifik hücrelere farklılaşmasıyla bu etkiyi yaptıkları düşünülmektedir (Ferro ve ark., 2011).

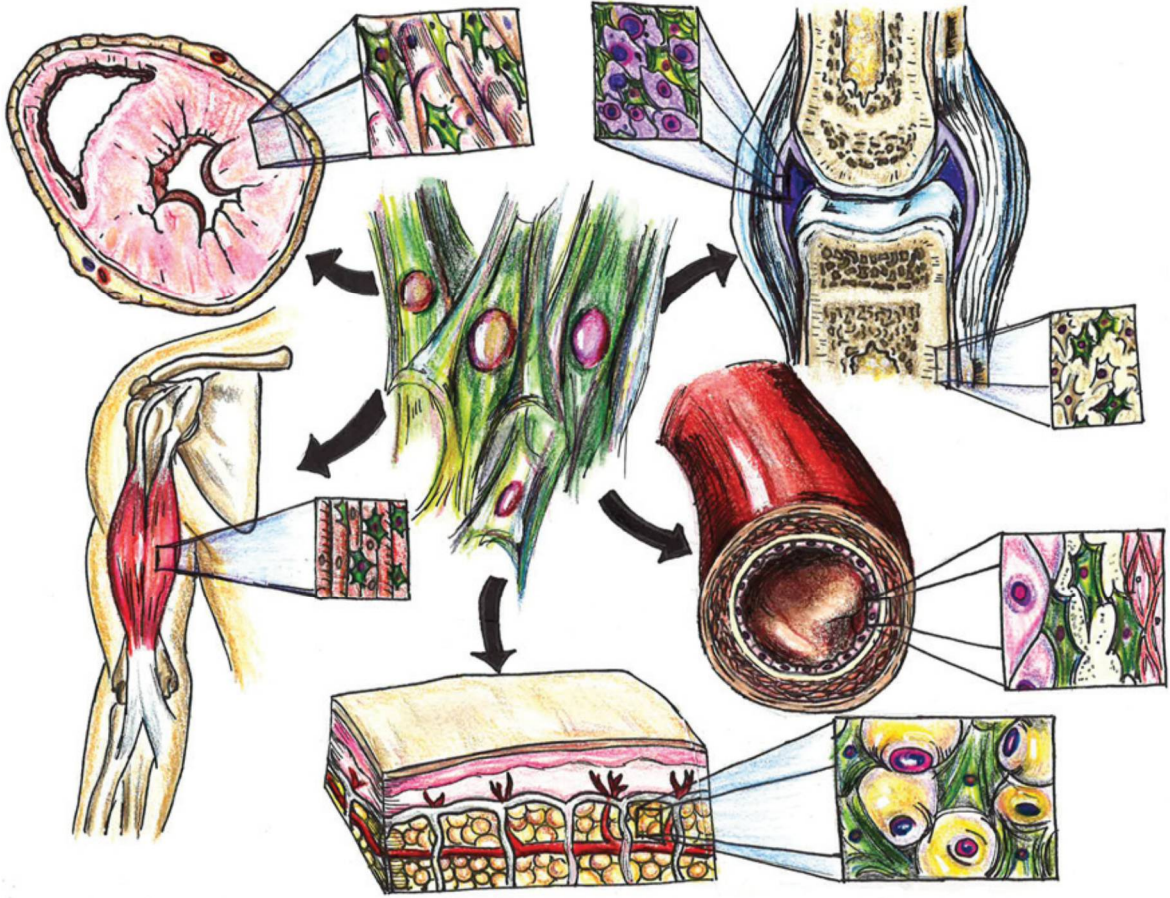
Daha çok adolesan çağda görülen non-travmatik eklem ağrısıyla seyreden osteokondritis dissekans hastalığında; adipoz doku kaynaklı MKH terapisinin osteokondral kusurların tedavisinde, yapısal, fonksiyonel ve ağrıda iyileştirme sağlamıştır (Freitag ve ark., 2017).

Diğer Klinik Kullanımlar

Allojenik hematopoietik greftlerin transplantasyonu ile bağlantılı olarak en sık görülen komplikasyon GVHD'dir. Son zamanlarda MKH'lerin etkileri olduğu ve hem in vivo hem de in vitroda immunojenik olmadığı hatta orta düzeyde immunsupresif olduğu ileri sürülmektedir. Bu sayede GVHD'de MKH ler güvenli bir şekilde kullanılmıştır (Yanez ve ark., 2006).

Yapılan faz I/II çalışmalarında multipl sklerozda MKH'ler başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Karussis ve ark., 2010; Yamout ve ark., 2010; Connick ve ark., 2011). Connick ve arkadaşlarının yaptığı faz II çalışmasında progresif ilerlemiş MS'li hastalarda visual aktivitede ve görsel uyarılmış yanıtta iyileşme gösterilmiştir (Connick ve ark., 2011).

Böbrek transplantasyonu öncesi otolog MKH enjeksiyonunun transplante edilen organın disfonksiyonundan koruyabileceği gösterilmiştir (Perico ve ark., 2013). Yapılan faz II çalışmalarında son dönem karaciğer yetmezliği olan sirozlu hastalarda MKH infüzyonunun serum bilirubin seviyelerini azalttığı ve albümin seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Amer ve ark., 2011; El-Ansary ve ark., 2012).



Şekil.5. Mezenkimal kök hücrelerin organlarda etkileri (Golpanian ve ark., 2016)

2.3. YAĞ DOKUSU

İnsan vücudunda gevşek bağ dokusunda adipositler bulunmaktadır. Adipositlerden oluşan dokuya yağ doku (adipoz doku) denmektedir. Yağ dokusu yalnızca bir destek doku ya da enerji kaynağı olarak değil aynı zamanda glikoz ve lipid metabolizmasında, üreme, kan basıncı kontrolü, immünite ve pıhtılaşmada da etkin rol oynadığı kabul edilmektedir. Beyaz adipoz doku yetişkinlerde görülen tipken; kahverengi adipoz doku daha çok fetal dönemde bulunmaktadır.

Vücudumuzda enerji depolama lipid damlacıklarında trigliserit şeklindedir. Vücudumuzda lipid su içermeyen bir şekilde depolanırken; aksine karbonhidratlar suyla birlikte daha ağır bir formda depolanır. Lipidler karbonhidratlara nazaran 100 kat daha fazla enerji depolayabilir. Cilt altı yağ tabakası cinsiyet ve yaşa bağlı olarak değişmekle

birlikte, tekdüze bir kalınlıkta değildir. Örneğin; kadınlarda erkeklere nazaran umblikusun altında daha fazla yağ depolanır (Koller ve ark., 2001).

Adipositlerin endokrin, parakrin ve otokrin fonksiyonları vardır. Adipositler ve pre-adipositler IGF-1, FGF ve transforming büyüme faktörleri gibi büyüme faktörleri üretirler. Adipositler tarafından üretilen sitokinler ve adiposit kaynaklı TNF- α 'nın obezite ve tipII diyabetle bağlantısı vardır.

Adipoz doku, omentum majus, mezenter, retroperitoneal bölge, böbreklerin çevresi, kemik iliği, avuç içi ve ayak tabanları, visseral perikardiyumun altında, orbitada ve diğer dokuların aralarında bulunur (Casteilla ve ark., 2011).

İlk kez Zuk ve arkadaşları tarafından 2000'li yılların başında yağ dokusundan multipotent, farklılaşmamış, kendini yenileyebilen ve morfolojik olarak MKH görünümünde projenitör hücreler izole edilmiştir (Zuk ve ark., 2002). Birçok çalışmada intakt yağ dokusundaki kök hücre popülasyonunun lokalizasyonu tanımlanmaya çalışılmıştır. Yapılan immunositokimyasal ve immunofloresan tekniklerle kök hücre popülasyonunun perivasküler lokalizasyonda olduğu fikri yaygındır ve burada perisit ve endotelial hücrelerle birlikte bulunur. Damar duvarını çevreleyen lokalizasyonda farklılaşmanın çeşitli aşamalarındaki öncül kök hücreler ve perisitler bulunmuştur.

Yağ dokusu ameliyat sırasında veya lokal anestezi altında iğne ile veya açık biyopsi ile elde edilebilir. Laparotomi veya laparoskopi ile de elde edilebilir. Alınan yağ dokusu Ringer Laktat gibi tuzlu bir solusyon veya % 10 FBS içeren DMEM gibi bir medyumla transpot edilebilir. Yağ dokusunun elde edilip taşınması ile ilgili bütün süreçler steril şartlar altında yapılmalıdır. Yağ dokusu makroskopik olarak görünen sinirler, kan damarları ve fibröz dokudan arındırılmalıdır (Hutley ve ark., 2001).

2.3.1. Stromal Vasküler Fraksiyon

Stromal vasküler fraksiyon (SVF) , adipoz dokunun enzimatik ya da nonenzimatik yolla ayrıştırılmasıyla hücrelerin izole edildiği heterojen bir karışımdır. Heterojen hücre popülasyonunda endotelial hücreler, eritrositler, fibroblastlar, lenfositler, monosit/makrofajlar ve perisitler yer almaktadır (Frese ve ark., 2016). SVF klinik uygulamalarda doku rejenerasyonu için doğrudan kullanılabilir (Riordan ve ark., 2009).

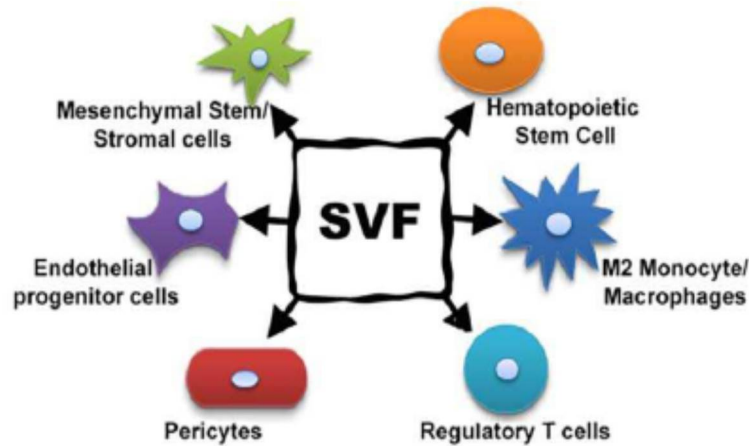
2.3.2. Enzimatik ve nonenzimatik SVF izolasyonu

En yaygın kullanılan izolasyon yöntemi enzimatik izolasyondur. Genellikle kollajenaz, tripsin ve dispaz enzimleri kullanılmaktadır. Adipoz doku kaynaklı MKH izolasyonu için oldukça çeşitli yöntemler olsa da; belirli standart bir prosedür takip edilir. Yıkama aşamalarının sayısı, enzim konsantrasyonu, santrifüj parametreleri, eritrosit lizis metodu ve filtrasyon laboratuardan laboratuara değişir.

MKH içeren plastiğe yapışan hücre fraksiyonu kültür pasajı sonrası ayrılmış olur ve bu yolla daha homojen bir hücre popülasyonu elde edilebilir. Nonenzimatik izolasyon metotları olarak; akım stresi, santrifüj, radyasyon veya basınç kullanılabilir. Bu mekanik aşamayla enzimatik sindirim aşamasındaki hücrelerin veya hücre agregatlarının ayrılması gerçekleşmiş olur. Aynı zamanda enzimatik ve nonenzimatik olarak geliştirilmiş hücre izolasyon sistemleri de vardır.

Stromal vasküler fraksiyonda; MKH'ler, hematopoetik kök hücreler, monositler/makrofajlar, T hücreleri, perisitler, endotelial progenitor hücreler yer almaktadır.

Yağ dokusundan kök hücre elde etmede eksplant yöntemi de kullanılabilir. Yağ dokusu kültür kabına direk konularak aynı medyum içerikleri ile kültüre edilir ve kök hücrelerin yağ dokusundan çıkışı gözlenir. Daha sonra geriye kalan doku ortamdan uzaklaştırılır (Koller ve ark., 2001).



Şekil.6. Stromal Vasküler Fraksiyonun Hücresel İçeriği (Dykstra ve ark., 2017)

2.4. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücrelerin ekim yapılarak dokudan ilk elde edilmesine primer hücre kültürü adı verilir. Elde edilen bu hücrelerden tekrar ekim yapılmasına pasaj adı verilir. İlk elde edilen hücreler sıfıncı pasaj hücreleri olarak adlandırılır.

Kültürdeki hücrelerden bazıları süspansiyon içinde çoğalıp yaşayabilirken bazıları çoğalmak için tutunacakları yüzeye ihtiyaç duyar. Örneğin hematopoetik hücreler süspansiyon içinde çoğalırken; mezenkimal kök hücreler içinde buldukları kaba tutunarak büyürler. Hücre kültürleri için genellikle polistren plastikten yapılmış kültür kapları kullanılır. Hücrelerin tutunmasını kolaylaştırmak için bazı kültür kaplarının yüzeyi fibronektin gibi maddelerle kaplı olabilir.

Plastiğe yapışarak büyüyen hücrelerde belli bir yoğunluğa ulaşıldığında hücreler arası kontakt inhibisyon nedeniyle hücreler yaşlanmaya (senescence) gidebilir. Bu yüzden belli bir yoğunluğa ulaşıldığında hücrelerin tekrar pasajlanması için tripsinize edilmeleri gerekir. Bir de ilerleyen pasajlarda hücrelerin yaşlanması olarak da 'senescence' kavramı ortaya çıkmıştır. Günümüzde MKH'ler veya başka herhangi bir kök hücre tipi için hücre yaşlanmanın bilinen yüzey markerı yoktur (Madsen ve ark., 2017). Yaşlanmaya giden hücrelerin proliferasyon kapasitesinin düştüğü düşünülmektedir ve β -Galaktozidaz yöntemiyle yaşlanma saptanabilir. Yine hücrelerdeki telomer uzunluğuna bakılarak da hücre yaşlanma hakkında fikir edinilebilir (Legzdina ve ark., 2016).

Kök hücrelerin kültür ortamı onların hem beslenip, büyümesinde hem de biyolojik etkilerini açığa çıkarabilmeleri için çok önemlidir. Gaz yüzdeleri (O_2 - CO_2 -N) ve kültür medyumunun kompozisyonu(örn:ph, glukoz konsantrasyonu), cm^2 ye ekilmesi gereken hücre sayısı,pasaj zamanı ve sayısı, bunlar arasındadır.Mediumlar arasında virus ve prion bulaş riski olan Sığır Kaynaklı Seruma (FBS) alternatif olarak serumdan yoksun(serum-free) medyumlar üretilmiştir. Medyumlara içeriklerine büyüme faktörleri eklenmiştir. Yine otolog kaynaklı serum eldesi ile hazırlanan medyumlar da MKH kültürleri için iyi bir alternatif olarak durmaktadır (Van Der Sanden ve ark., 2010). Temel sorun serum yüzdelerinin tesbitidir. MKH in vitro kültürlerinde kullanılmak üzere sitokinler ve büyüme faktörleriyle zengin bir içeriğe sahip platelet lizat; FBS'nin yerini almaya adaydır. Platelet granüllerinde çok çeşitli moleküller depolanmıştır. Bunlar lizozomal enzimler (elastaz, kollajenaz, katepsin), koagülasyon faktörleri (faktör

V,XI,XIII,antitrombin,protrombin), immunolojik moleküller (IgG, faktör D, platelet faktör H, C1 inhibitör), adezyon molekülleri (P selektin,fibrinojen, VWF), kemokinler (IL8, RANTES,NAP2), büyüme ve angiogenez regülatörleridir (Burnouf ve ark., 2016). PRP (Platelet rich plasma), PL (platelet lizat) ya da platelet jel gibi zenginleştirilmiş platelet ürünleri PDGFs (platelet derived growth factors), TGF β (transforming growth factor), EGF (epidermal growth factor) ve bFGF (basic fibroblast growth factor) gibi çeşitli büyüme faktörleri içerirler. Bu büyüme faktörleri mezenkimal kök hücreler üzerine mitojenik etki gösterir ve kültür sonu elde edilen hücrelerin *in vivo* anjiogenezini uyararak doku tamiri ve rejenarasyonda anahtar role sahip olduğu gösterilmiştir (Schallmoser ve ark., 2007; Burnouf ve ark., 2016).

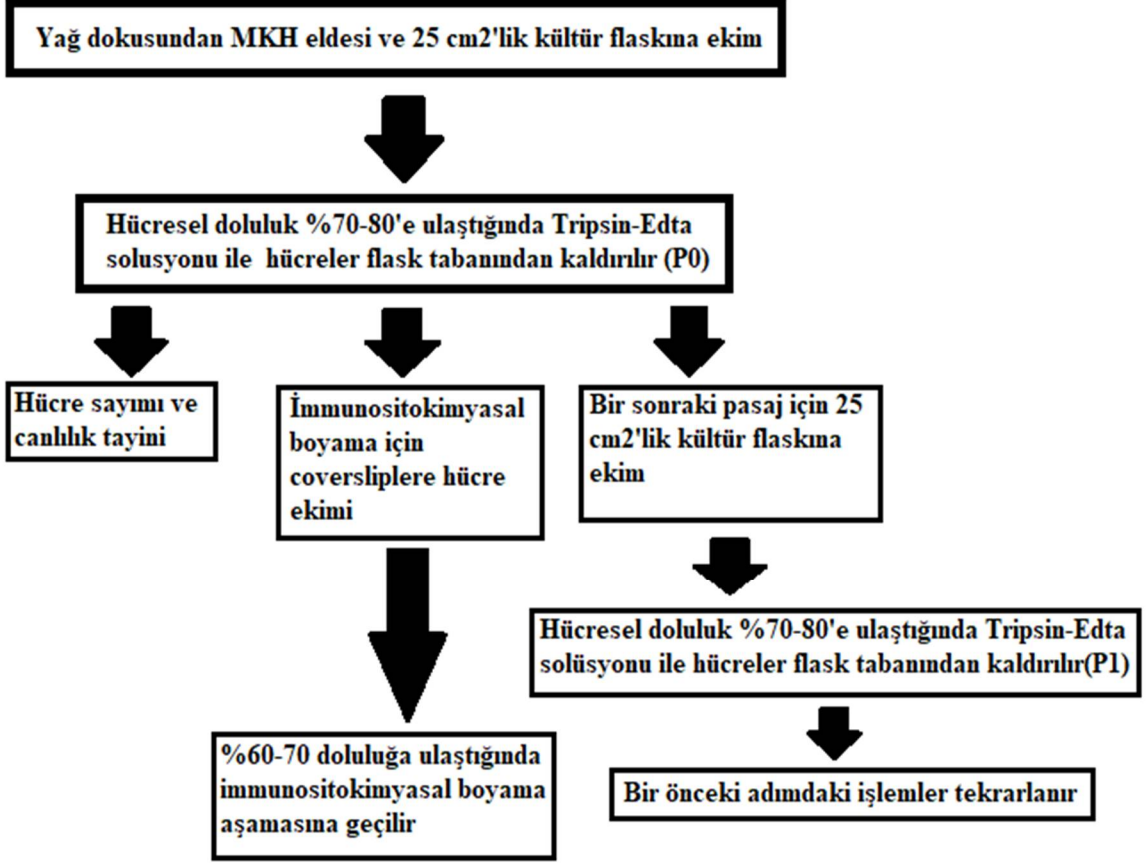
Oksijen konsantrasyonu, kök hücrelerin bakımı, farklılaşması ve işlevi için önemli bir faktördür. Moleküler oksijen hücreler için hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak sinyal molekülü ve metabolit substrat özelliği vardır. Kök hücreyi içeren *in vitro* deneyler yorumlandığında dikkatli bir oksijen seviyesine ihtiyaç vardır (Abdollahi ve ark., 2011). İmplantasyonun başlangıcında ve fetal gelişim boyunca embriyonik kök hücre düşük oksijen seviyesinde yaşar. Embriyo implantasyonu boyunca maternal sirkülasyona erişememe hipoksik bir çevre ile sonuçlanır. Uterin yüzey oksijen konsantrasyonu gebeliğin erken dönemi boyunca yüzde 2 seviyesindedir. Embriyo maternal damarlarla bağlantı kurduktan sonra plasental oksijen seviyesi yaklaşık olarak yüzde 8' e çıkar. Bu yüzden embriyonik kök hücrelerin normal fizyolojik çevresi *in vitro* koşullara göre daha hipoksik kalmaktadır. Erişkin kök hücreler göreceli olarak oksijenden fakir anatomik bölgelerde (%0-5) yer alırlar (Chung ve ark., 2009).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 30/09/2016 tarih ve 2016/674 karar numaralı izni ile, gerçekleştirildi.

3.1. Kök hücre Eldesi ve Hücre Kültürü Aşaması

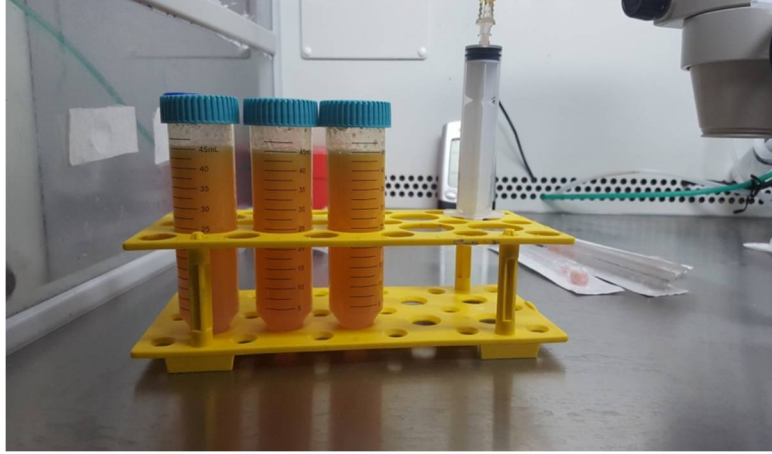
Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahisi Anabilim Dalı'ndan abdominoplasti veya mamoplasti amacıyla liposuction yöntemi veya eksize edilmiş karın yağ dokusu veya meme yağ dokusu sonucu elde edilen atık 10-20 gr yağ materyali serum fizyolojik ile yıkandıktan oda sıcaklığında mekanik olarak ayrıştırılarak yağ dokunun hücresel komponentleri ayrıştırıldı ve 25 cm²'lik kültür kaplarına (Nest, USA) ekildi. Bu aşama ve ilerleyen kültür işlemleri DMEM (Wisent, Kanada) kültür medyumuna ve %10 FBS (Capricorn, Germany) kullanılarak, Penisilin-Streptomisin-L-Glutamin(Wisent, Kanada) ilavesiyle 37°C 'de %5 CO₂ atmosfer basıncına sahip ar-ge amaçlı hizmet veren inkübatör ve laminer flow kabin ile gerçekleştirildi. Kültür kabında doluluk oranı %70-80 e ulaşıncaya kadar 3 günde bir medium değişimi yapıldı. Her pasajda immunositokimyasal inceleme için ve bir de pasajların devamı için 2 seri hücre ekimleri yapıldı. Ortalama 7-8. Günlerde kültür kabındaki doluluk oranı %70-80 e ulaştığında; 0.25% trypsin + 0.04% EDTA (Wisent, Kanada) solusyonu ile hücrelere muamele edilerek kültür kabı tabanından hücrelerin ayrılması sağlandı. Hücrelerin olduğu kültür medyumuna santrifüj edilerek hücresel pellet oluşturuldu ve buradan thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı. Canlılık oranı trypan blue boyası ile saptandı. Ortalama 2 milyon hücre sayıldı ve bir sonraki pasaj için ekim yapıldı. Her pasajda ADSC' ler ışık mikroskop altında incelendi. Toplamda 1. , 3. Ve 5. Pasajlar olmak üzere 3 pasajın değerlendirilmesi için negatif (CD19) ve pozitif (CD44, CD90, CD105) hücre yüzey markerlarının immünositokimyasal boyanması yapıldı. Her pasajın 6-7 gün sürdüğü toplam 5 pasaj sürdürüldü.



Tablo.1. Hücre kültürü ve boyama metot aşamaları

3.2. Hücre Sayımı ve Canlılık Tayini

Kültür flaskı tabanından kalkan hücreler 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası konik tüpte tabanda kalan hücre pelletinin üst kısmı (süpernatant) döküldü ve kalan hücreler kültür medyumunu ile dilüe edildi. Thoma lamında sayım için bir miktar alındı ve sayıldı. Canlılık oranını belirlemek amacıyla 1x1 oranında trypan blue kullanıldı. Canlı hücreler hiçbir boya almazken; ölü hücreler maviye boyandı. Mikroskop altında sayımları yapıldı.



Resim.1. Lipoaspiratla gelen yağ dokusu



Resim.2. 25 cm²'lik kültür flaskı

3.3. İmmunositokimyasal Boyama Aşaması

Kültürde yapışık halde bulunan hücreler kültür medyumundan arındırıldıktan sonra fiksasyon aşaması için PBS içerisinde çözülmüş %4 paraformaldehit solusyonu (Santa Cruz, USA) ile muamele edildi. Boyama kiti kullanılarak hidrojen peroksit ve ardından UV block (Thermofisher, USA) ile muamele edildi. Primer antikorlar (Abcam, UK) damlatılarak 1 saat oda ısında bekletildi. Daha sonra sekonder antikor (Thermofisher, USA) ile muamele edildi. Her solusyon arasında hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra AEC substrat sistem (Thermofisher, USA) kullanılarak markerların boyanması sağlandı. Son olarak zıt boyama için hücre nükleusları Mayer's Hematoksilenle boyandı. Lam lamel

arası kapatılarak mikroskopta incelendi. Her bir örnek için mikroskopta 100 hücre sayımı yapıldı. İmmunositokimyasal boyama CD44, CD90, CD105, CD19 ve embriyonik markerlarda (Nanog, Oct-4, SOX-2, Tra-1-60, SSEA-4) yapıldı. Ayrıca tezimizde bulunmayan immunfloresan olarak da tek pasajda hücresel aktin ve hücre marker boyanması yapıldı. İmmünfloresan boyamada hücresel aktin CytoPainterPhalloidin-iFluor 594 kırmızı (Abcam UK) ve yüzey antikor boyaması için primer antikorlar (Abcam, UK) ve sekonder antikor FITC yeşil (Abcam UK) kullanıldı. Floresan ataçmanlı mikroskopta (Olympus, Japonya) görüntülendi.

3.4. İstatistiksel Analiz

Pasajlar arası karşılaştırmaların analizi doğrusal karma model kullanılarak yapıldı. Anlamlılık seviyesi 0,05 olarak alındı.

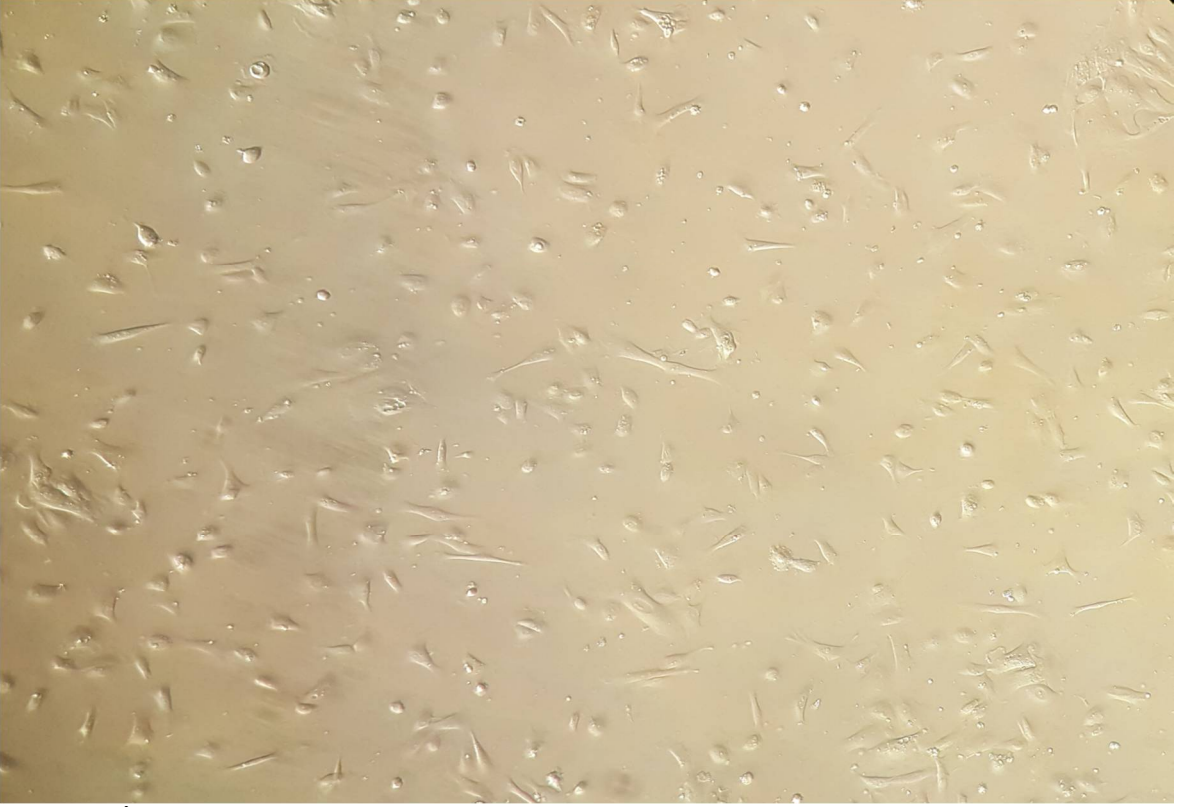
4. BULGULAR

Yağ dokusundan mekanik ayrıştırma yöntemi ile elde edilen hücreler kültür kabına ekimi sonrası İverted mikroskopta (Nikon, Japonya) gözlemlendi. 24. Saatte kültür kabının tabanına yapışmış iğsi morfolojide hücreler gözlemlendi. 7. günde doluluk oranı %70 civarında gözlemlendi.

Trypsin+Edta solusyonu ile kültür kabının tabanından ayrıldıktan sonra hücreler yuvarlak morfolojide gözlemlendi. Santrifüj sonrası Thoma lamında hücre sayımı sonrası 25 cm²'lik kültür kabından ortalama 1,5-2 milyon hücre elde edildi. Elde edilen hücrelerde Trypan mavisi ile 1x1 dilüsyon faktörü ile boyandı ve canlılık oranı ortalama %92 olarak bulundu.

İmmünohistokimyasal boyamalar sonucu her lamelde 100 hücre sayıldı. Hücresel yüzey ekspresyonları pozitifliği AEC kromojen ile kırmızı renkte gözlemlendi. Hücre çekirdekleri Mayer's hematoksilenle mavi-mor olarak boyandı.

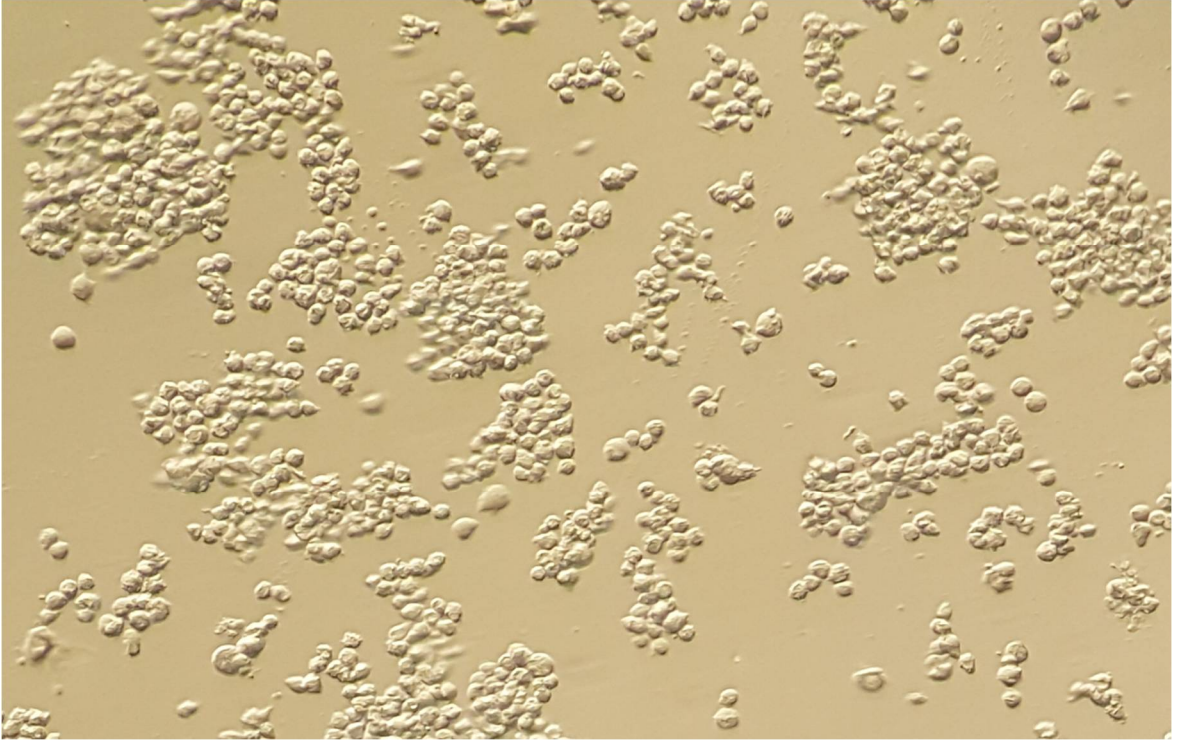
CD44 yüzey ekspresyonu genel sitoplazmik olarak, CD90 pozitifliği daha çok perinükleer boyanma olarak, CD105 pozitifliği sitoplazmik boyanma olarak gözlemlendi. 3 pasajın ortalaması olarak CD44 %96,13; CD90 %94,5; CD105 %87,6 oranlarında pozitif bulundu. CD19 negatif boyandı. Embriyonik markerlar ile yapılan sayımda Nanog, SSEA-4 ve Tra-1-60 negatif boyandı; Oct-4 %91 ve Sox-2 %36 oranında pozitif bulundu. Oct-4 ekspresyonu nükleer boyama olarak, Sox-2 ekspresyonu sitoplazmik olarak gözlemlendi.



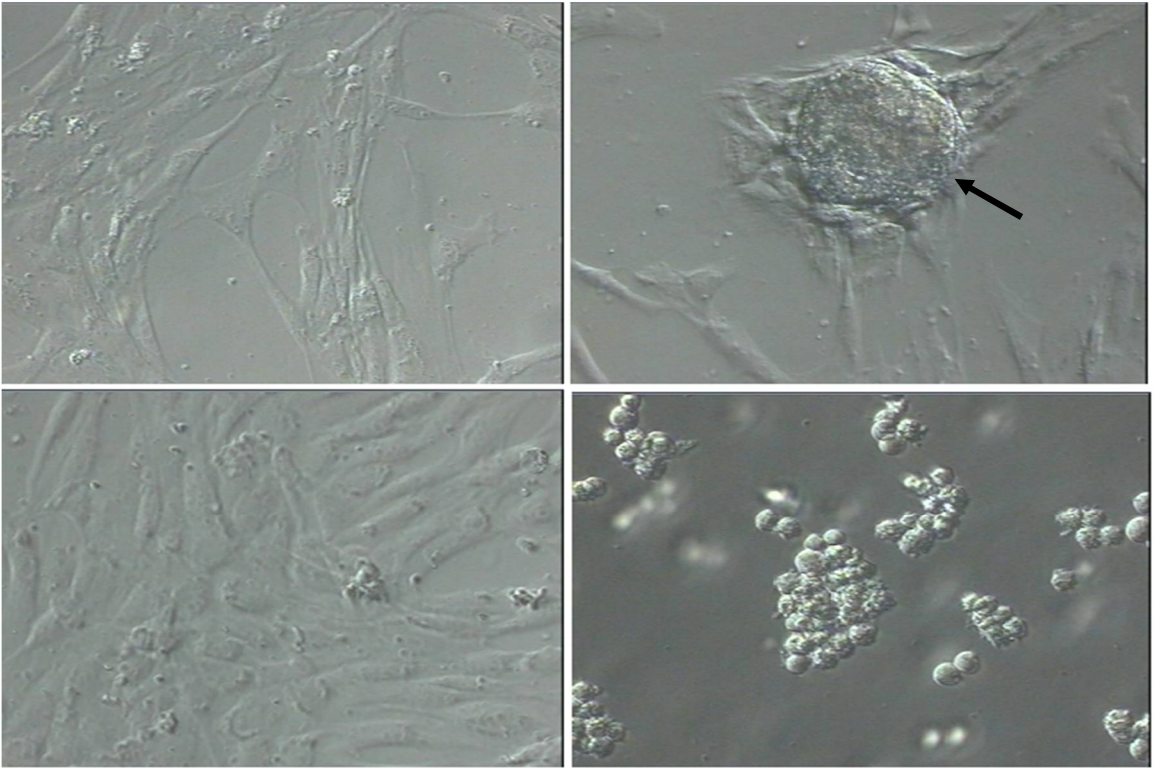
Resim.3. İlk 24 saatte kültür kabında yapışık iğsi morfolojide kök hücreler



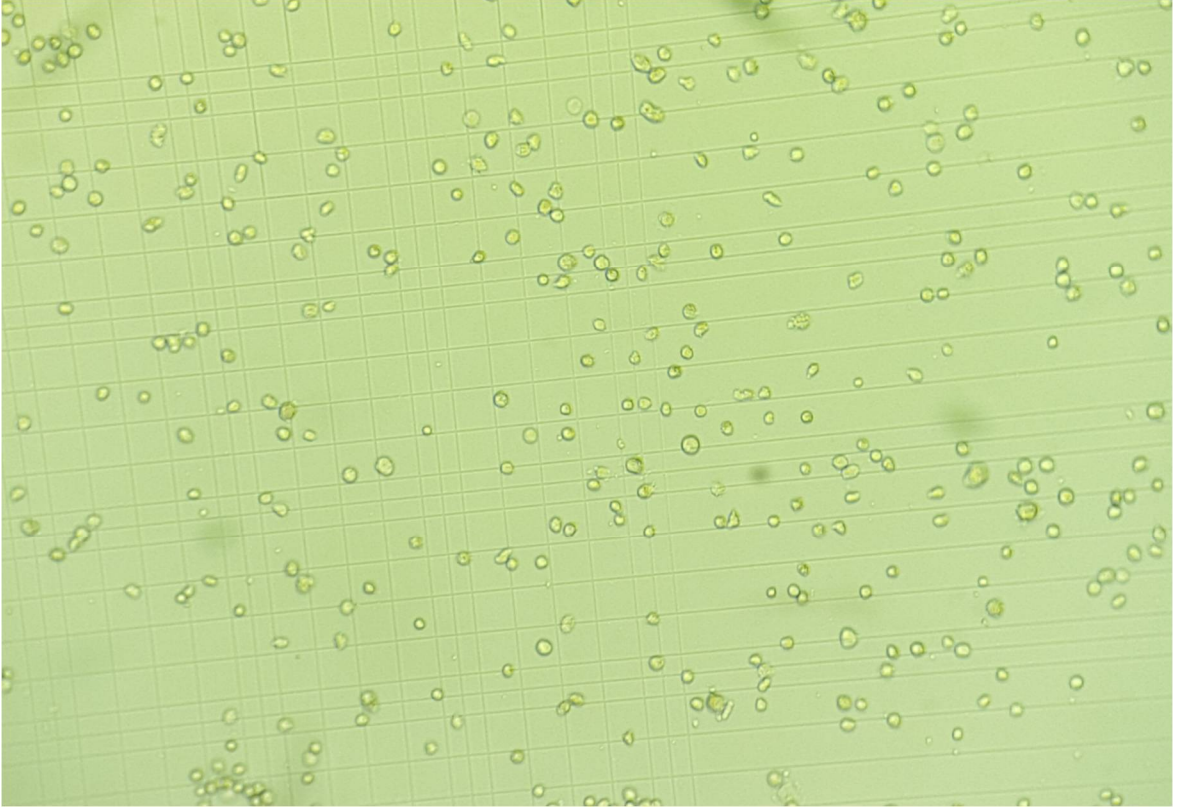
Resim.4. 7. Günün sonunda kültür kabında %70 doluluk oranı



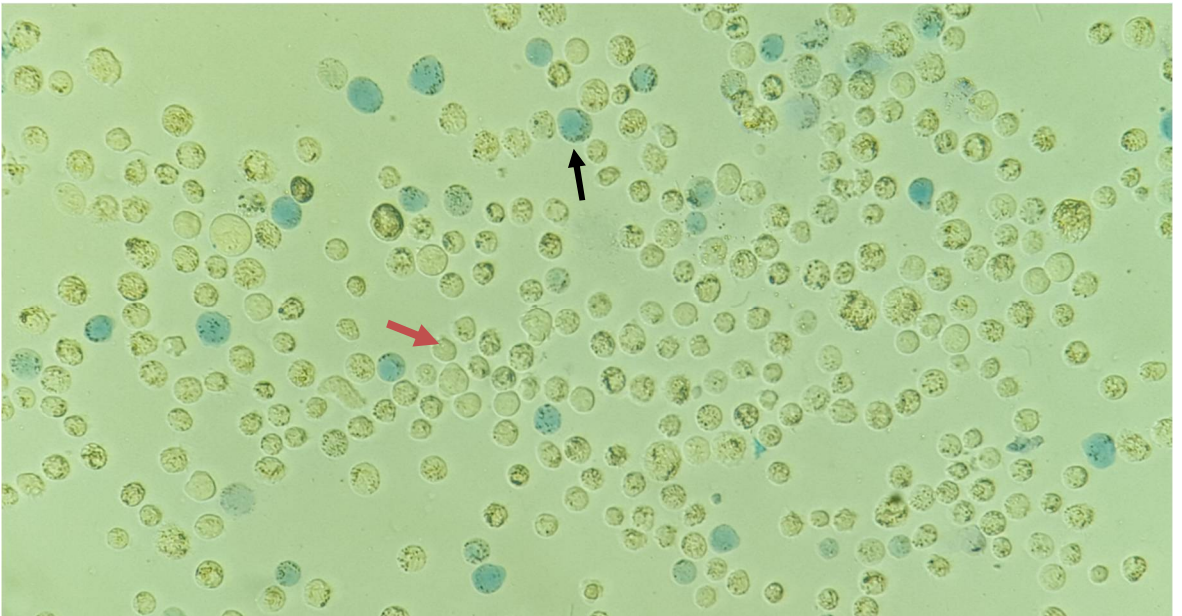
Resim.5. Kültür flaskından kaldırılmış yuvarlak kk hücreler



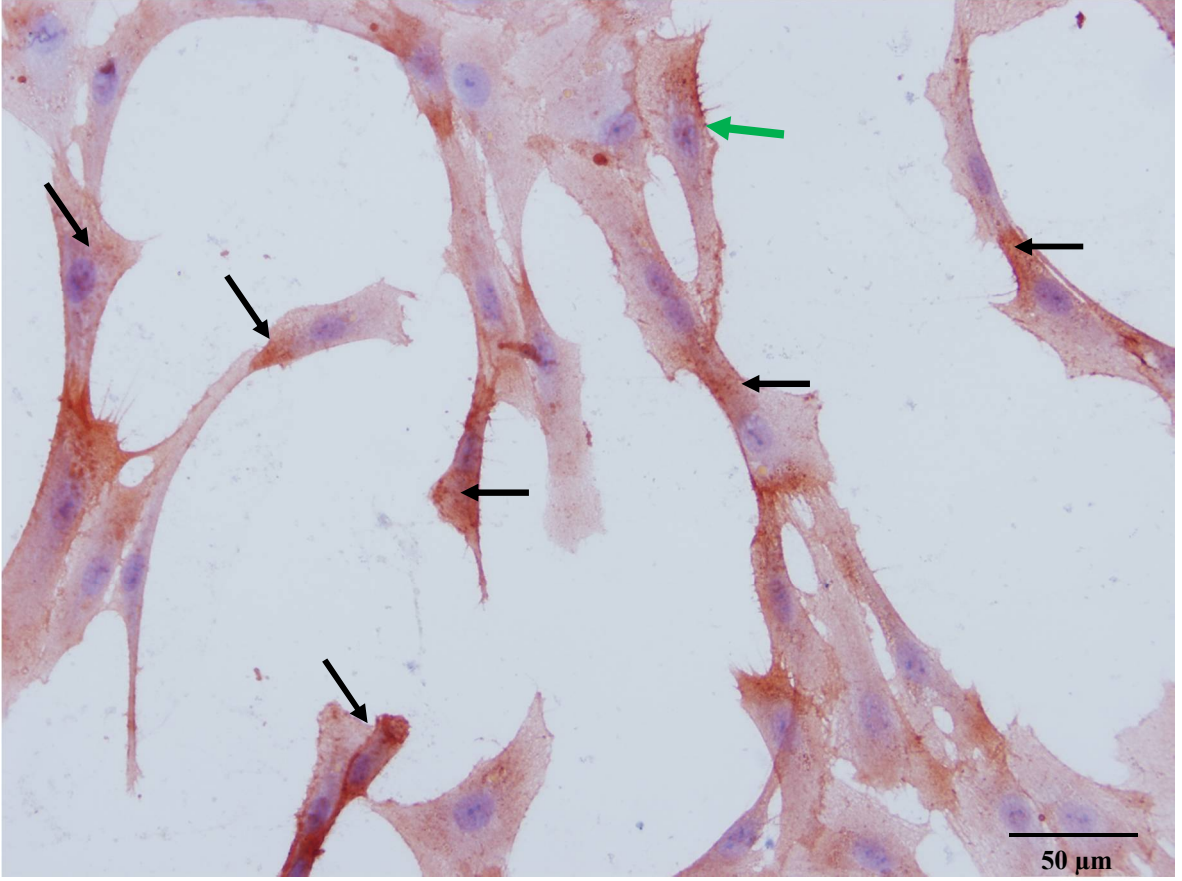
Resim.6. Saę st kgede ok ile iřaretli kk hcre kolonisi



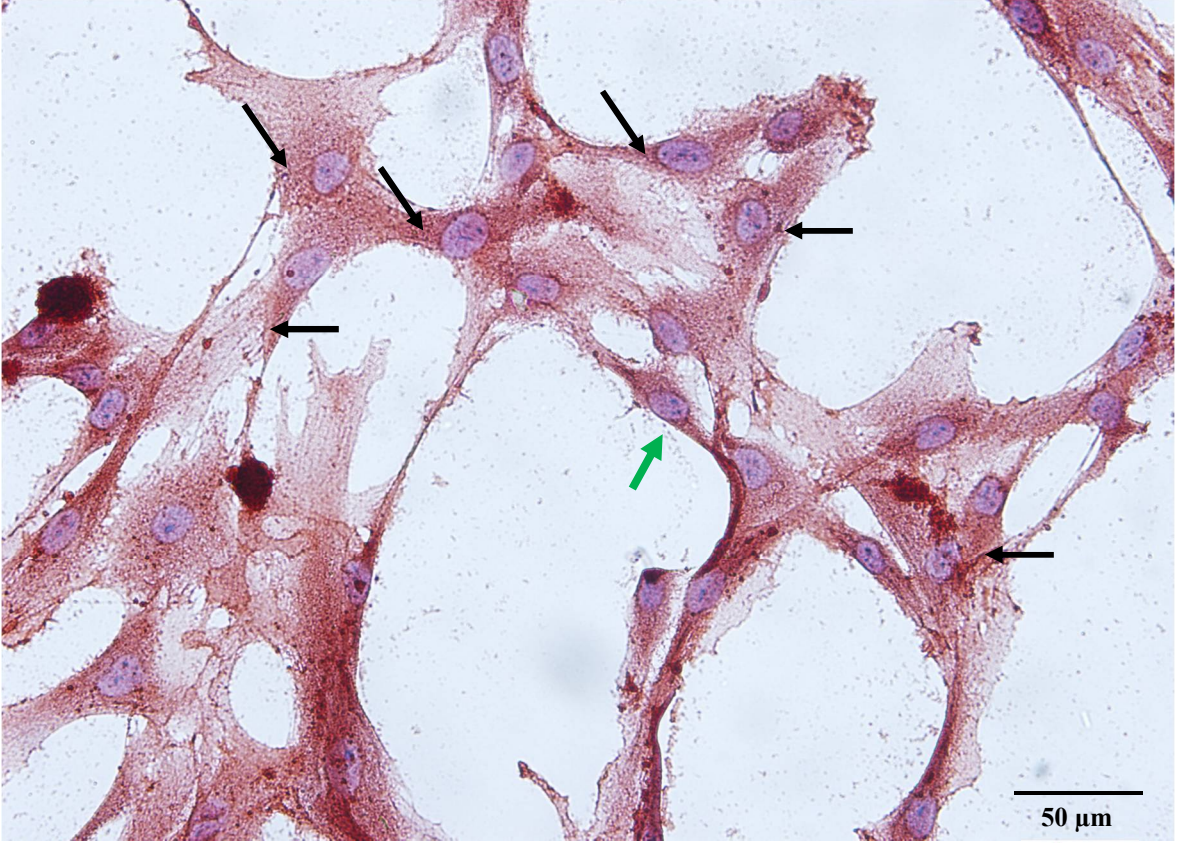
Resim.7. Thoma lamında hücre sayımı



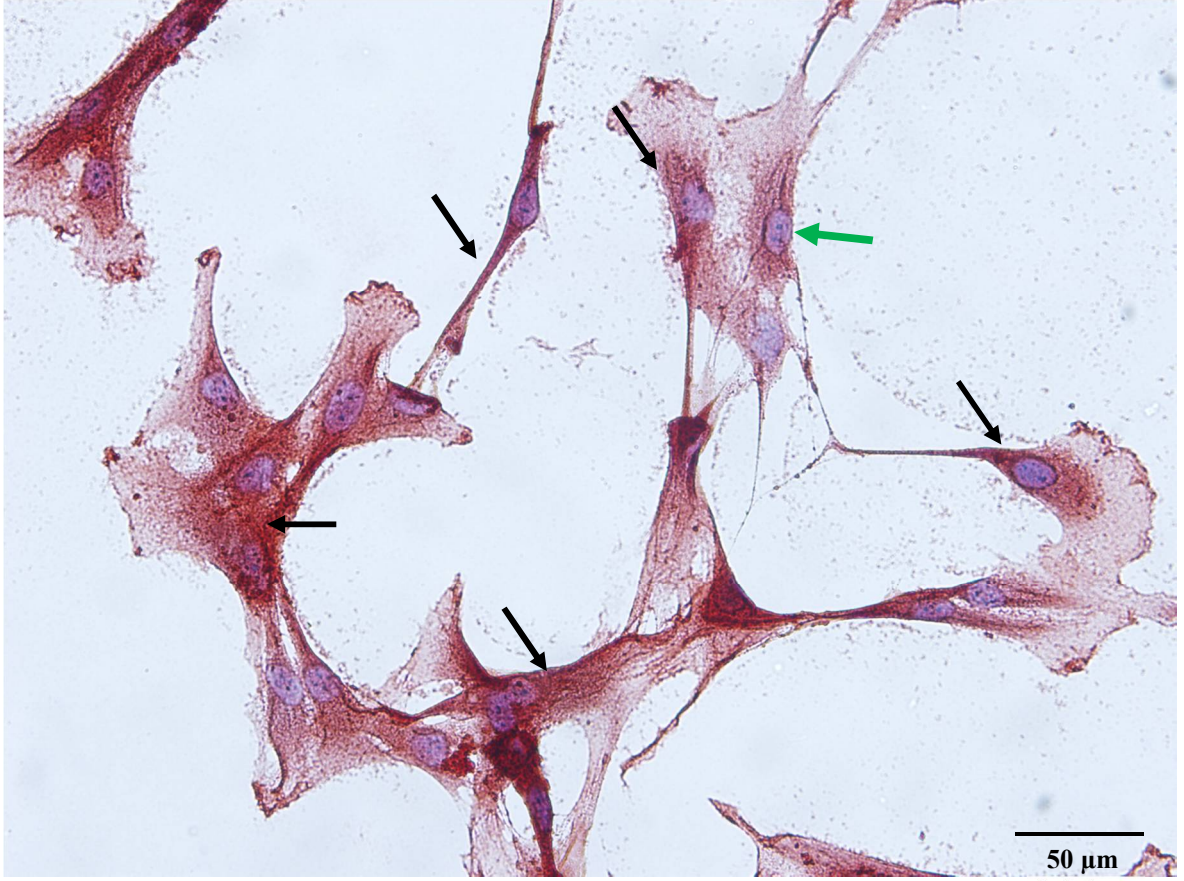
Resim.8. Trypan mavisi ile hücre canlılık oranı tayini; siyah ok:ölü hücre, kırmızı ok:canlı hücre



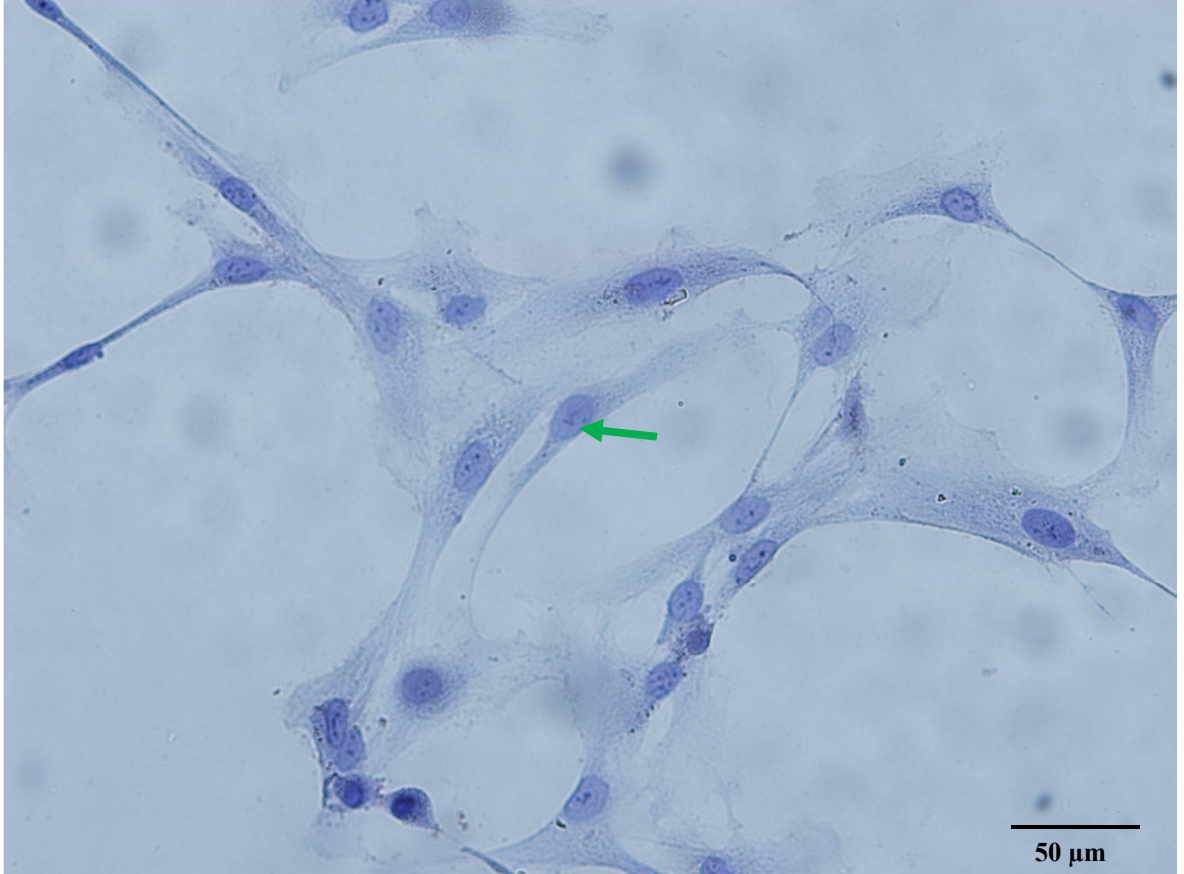
Resim.9. P1 pasajı CD44(40X büyütme)



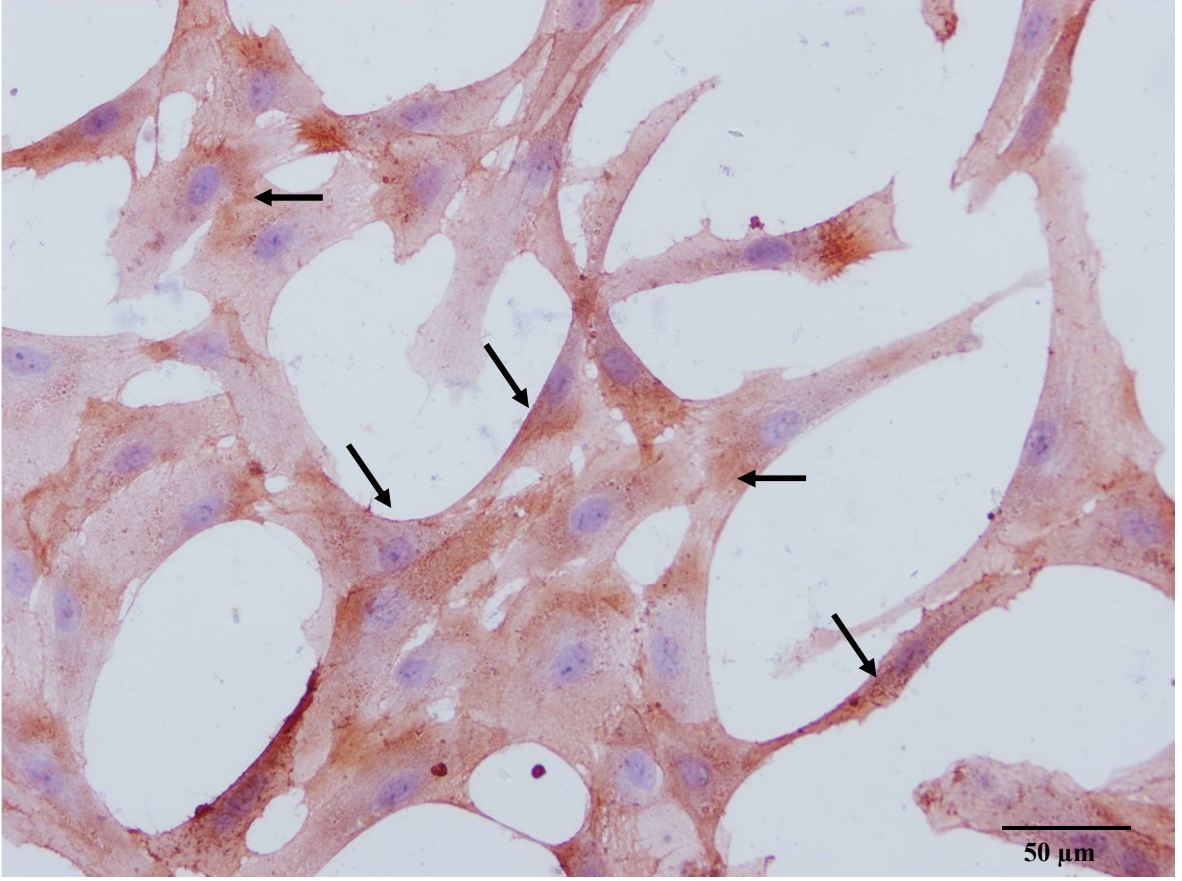
Resim.10. P1 pasajı CD105 pozitif hücreler(40X büyütme), siyah ok:pozitif hücreler, yeşil ok:çekirdek



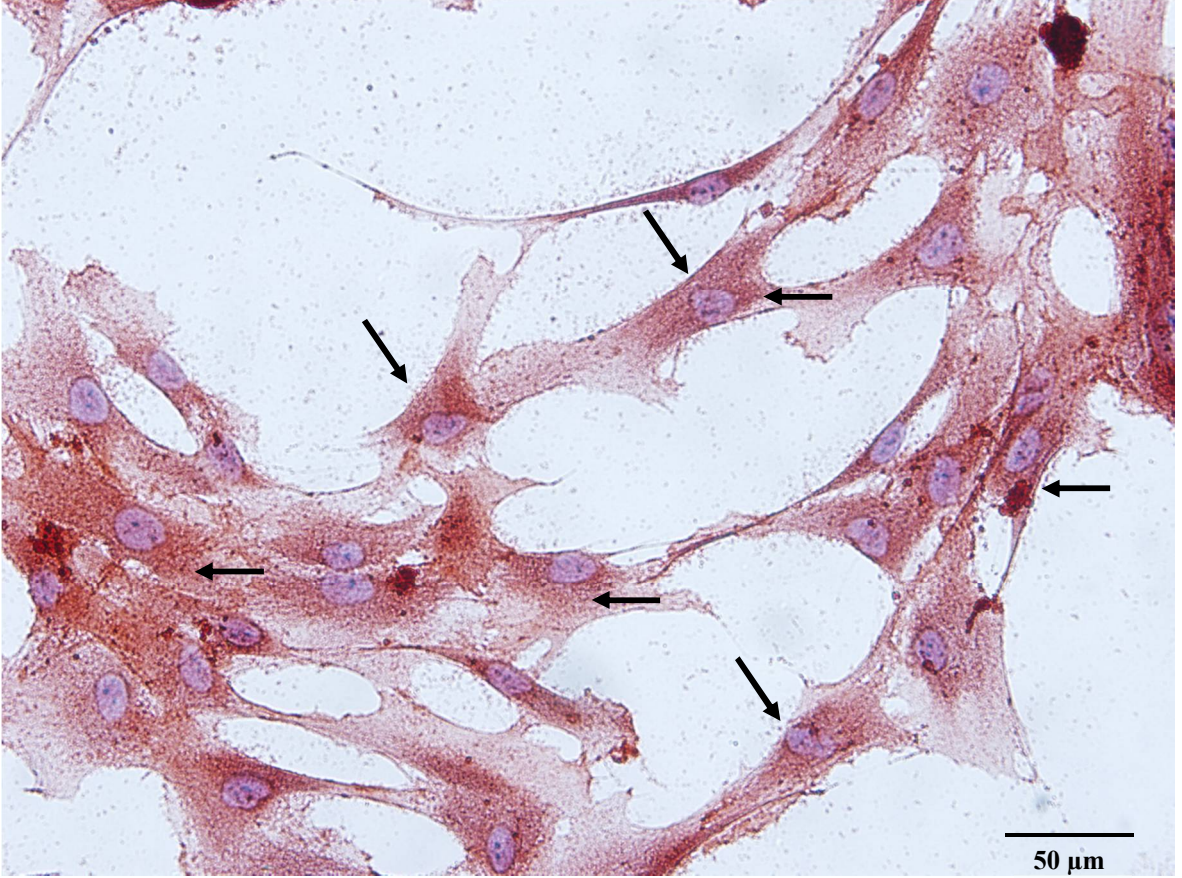
Resim.11. P1 pasajı CD90(40X büyütme), siyah ok:pozitif hücreler, yeşil ok:çekirdek



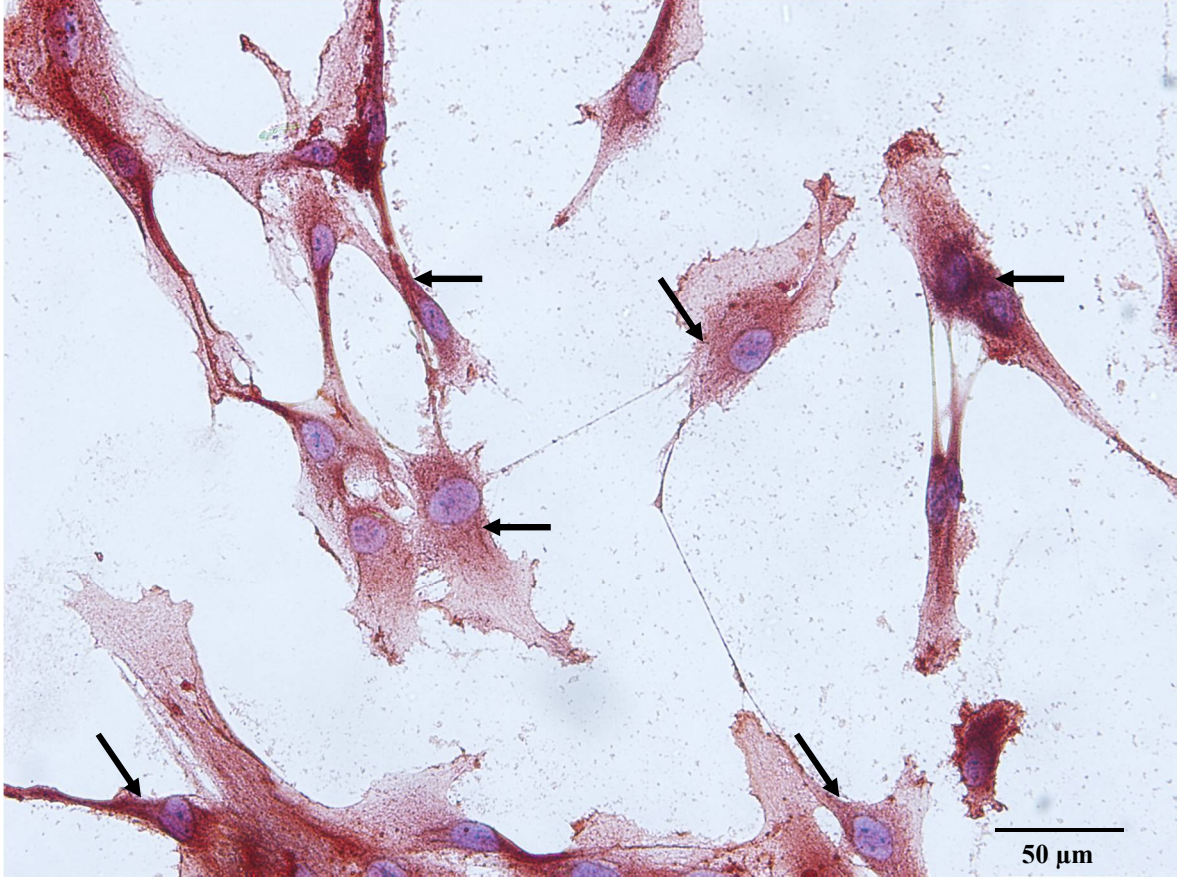
Resim.12. P1 pasajı CD19 negatif hücreler(40X büyütme), yeşil ok:çekirdek



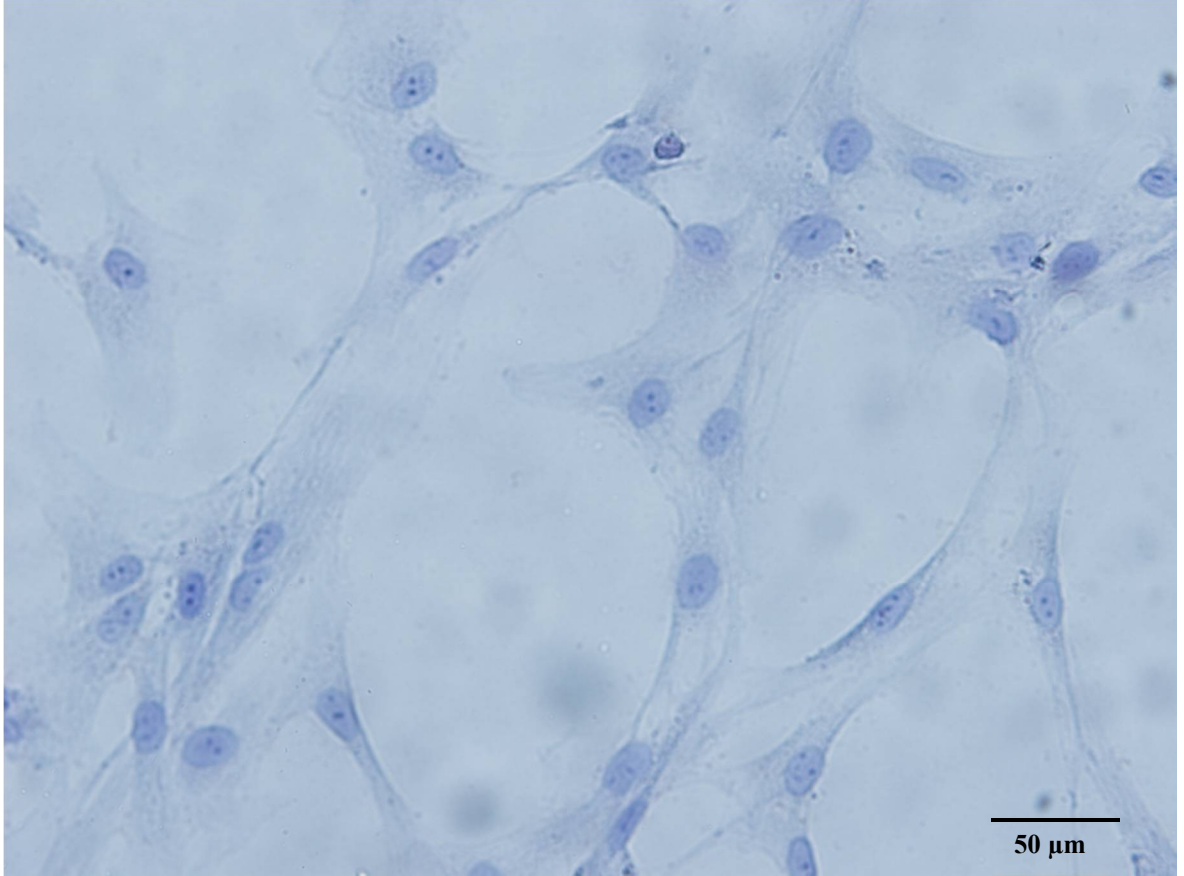
Resim.13. P3 pasajı CD44(40X büyütme), siyah ok:pozitif hücreler



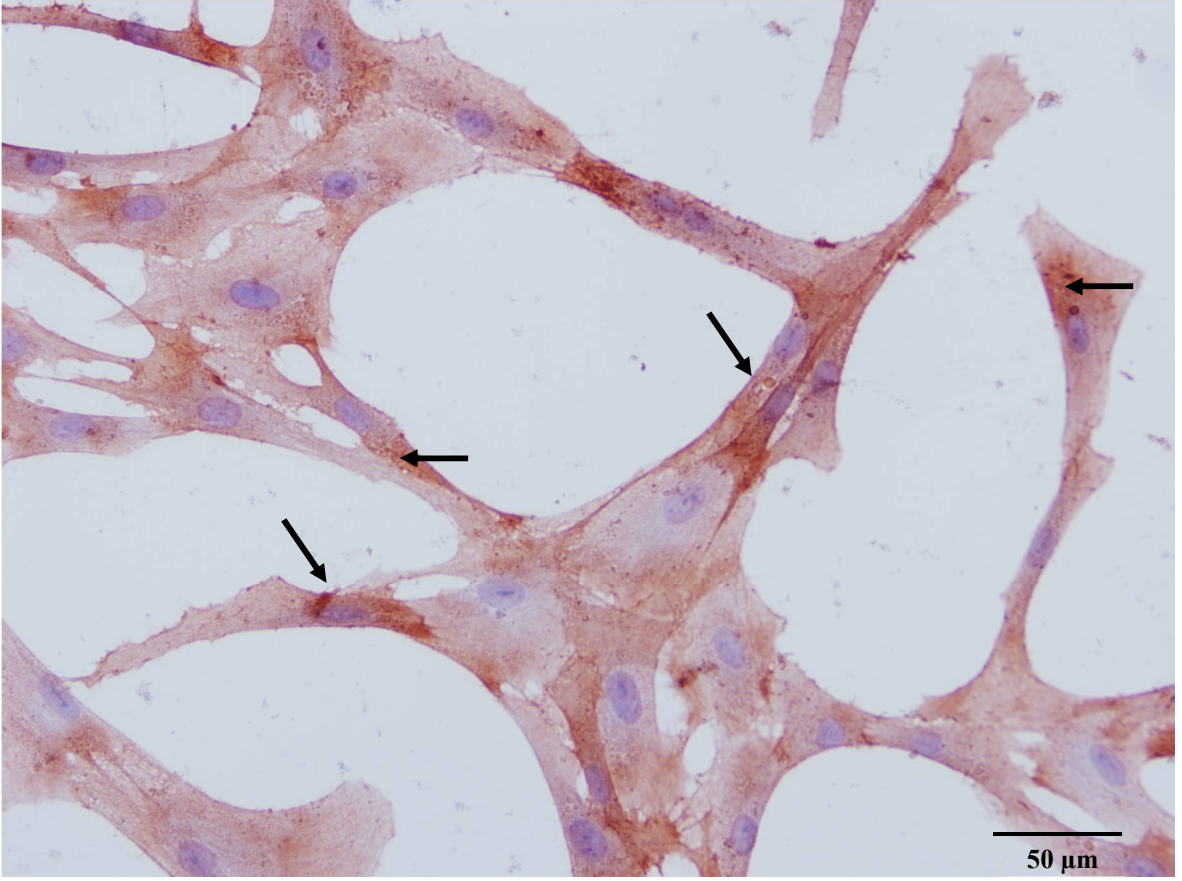
Resim.14. P3 pasajı CD105(40X büyütme), siyah ok:pozitif hücreler



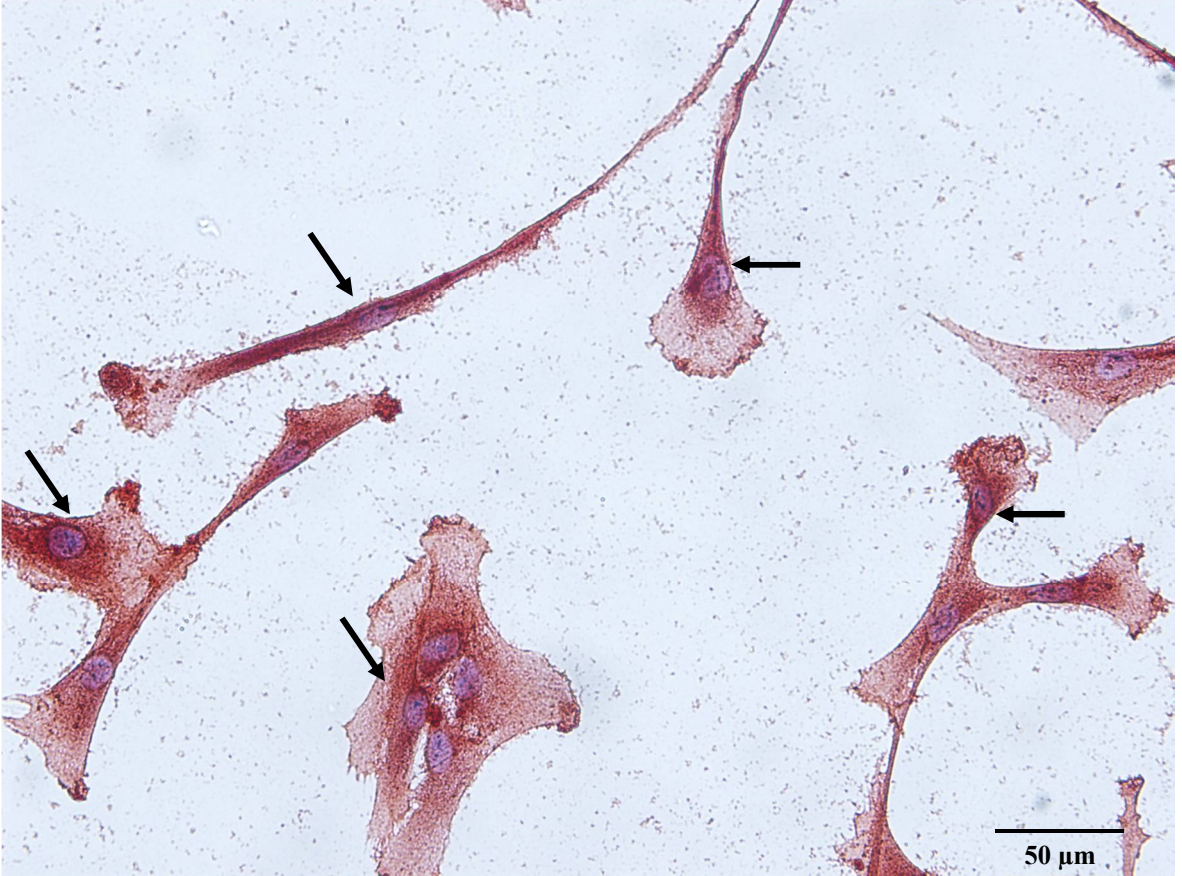
Resim.15. P3 pasajı CD90(40X büyütme), siyah ok:pozitif hücreler



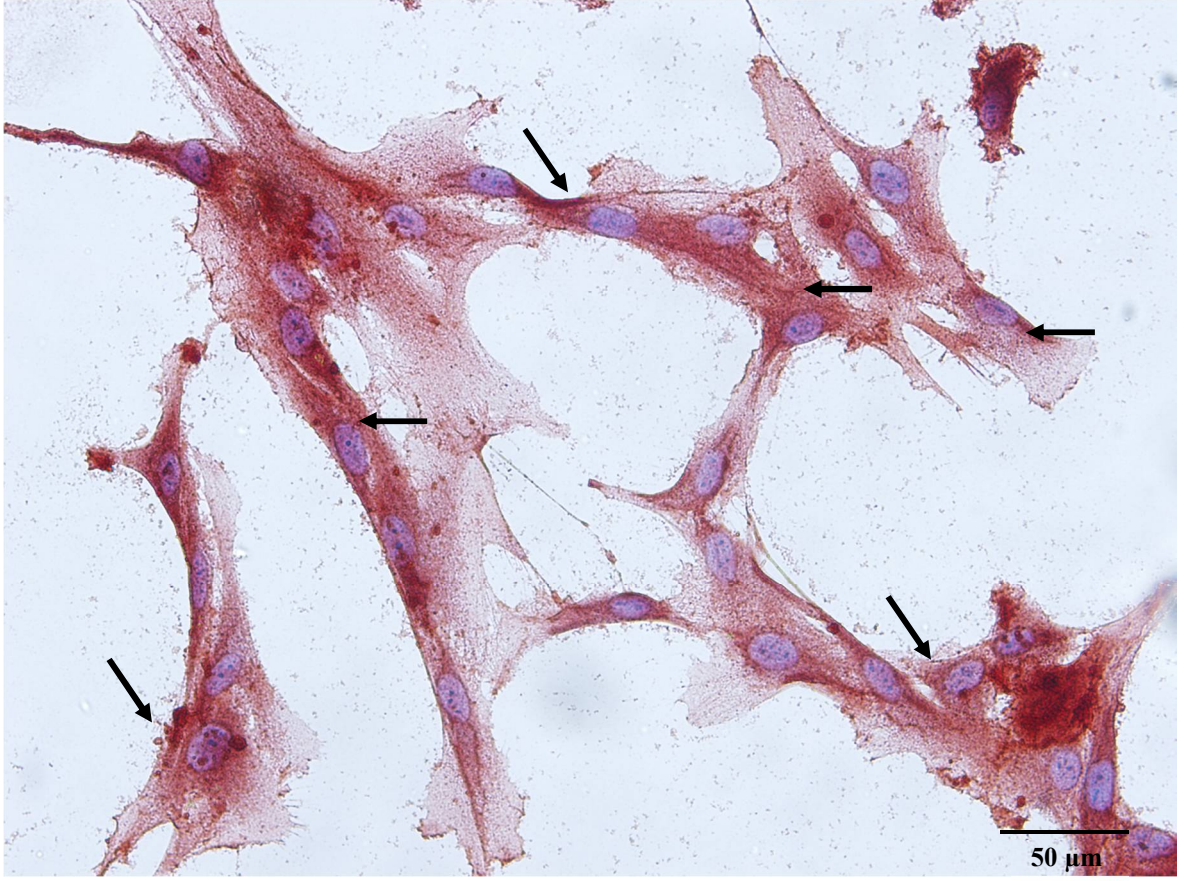
Resim.16. P3 pasajı CD19(40X büyütme)



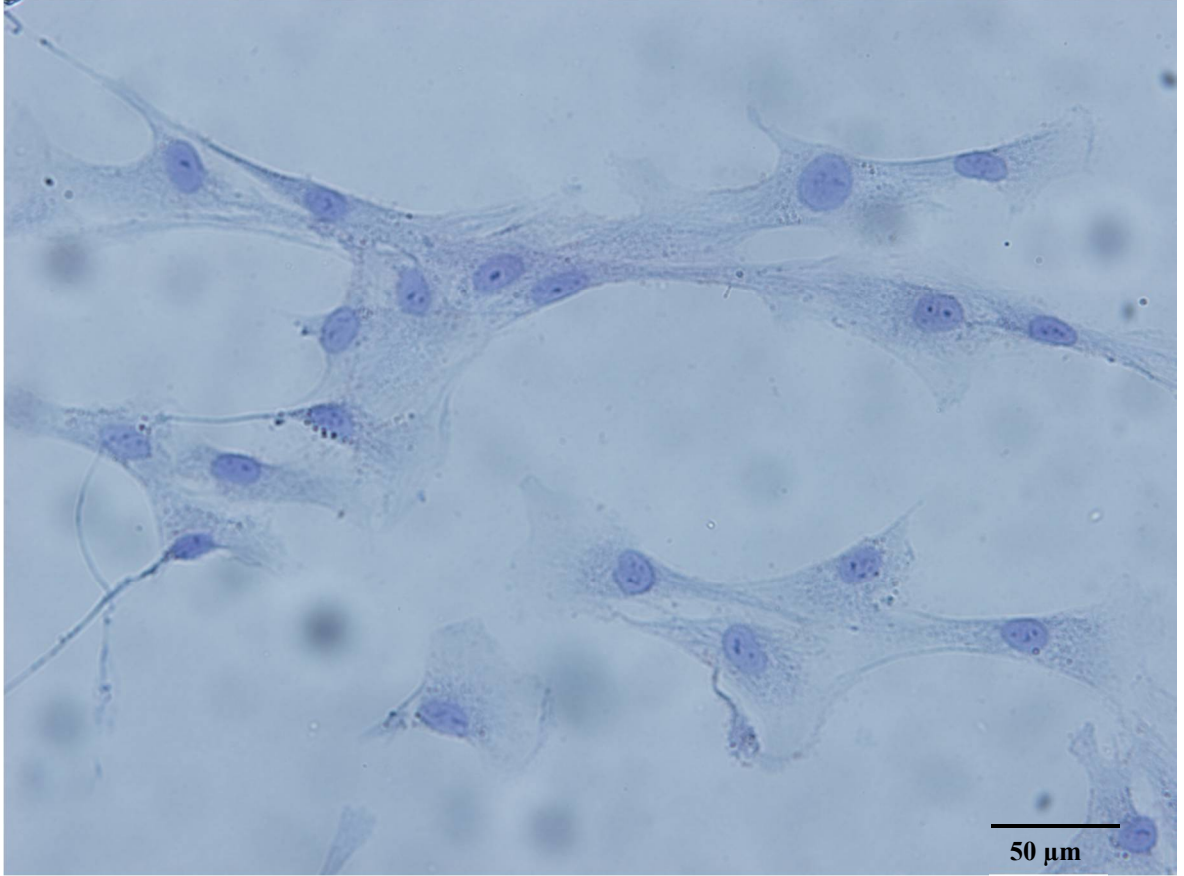
Resim.17. P5 pasajı CD44 (40X büyütme), siyah ok:pozitif hücreler



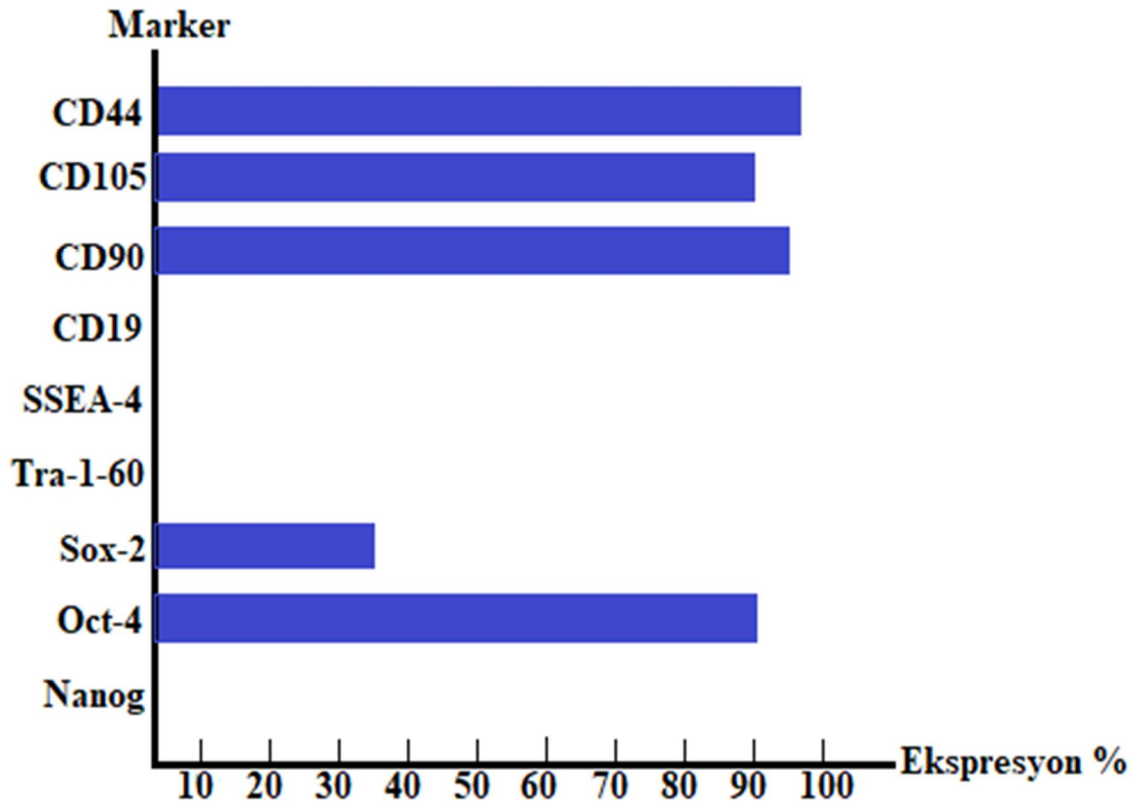
Resim.18. P5 pasajı CD105 (40X büyütme), siyah ok:pozitif hücreler



Resim.19. P5 pasajı CD90 (40X büyütme), siyah ok:pozitif hücreler



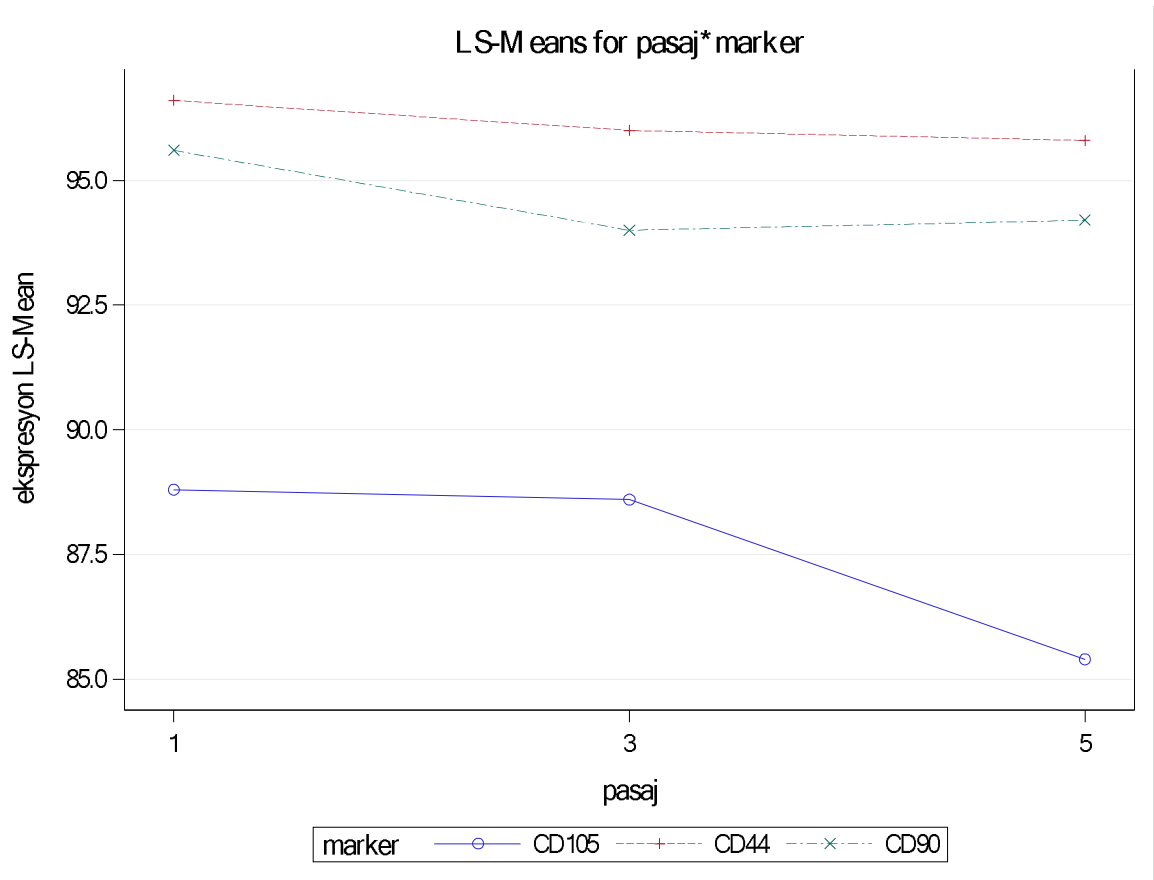
Resim.20. P5 pasajı CD19 (40X büyütme)



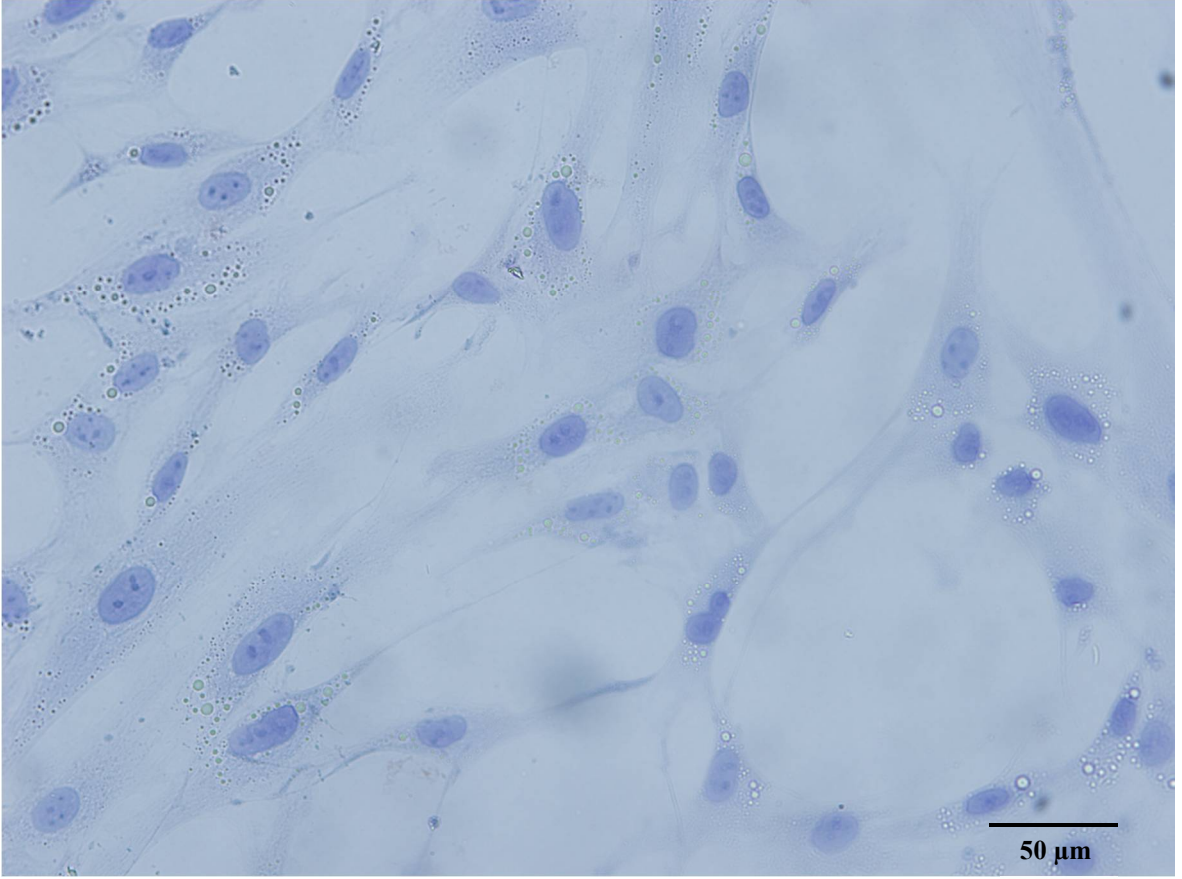
Tablo.2. Hücre yüzey markırları yüzde ortalamaları

İstatistiksel Analiz

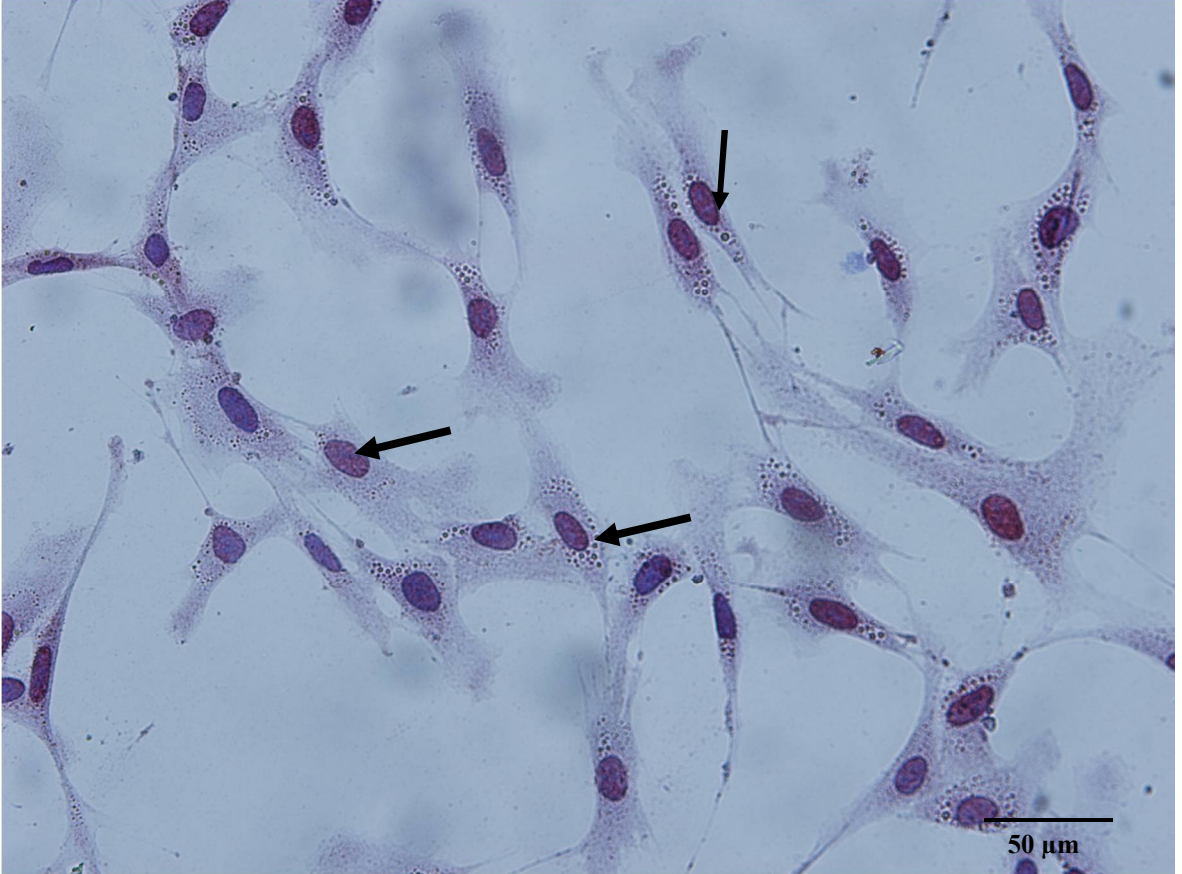
Doğrusal karma model kullanılarak yapılan analizde markır-pasaj etkilesimi anlamlı bulunmadı ($p=0.14$ ve $p=0.55$). Pasajlara göre ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir farklılık görülmedi.



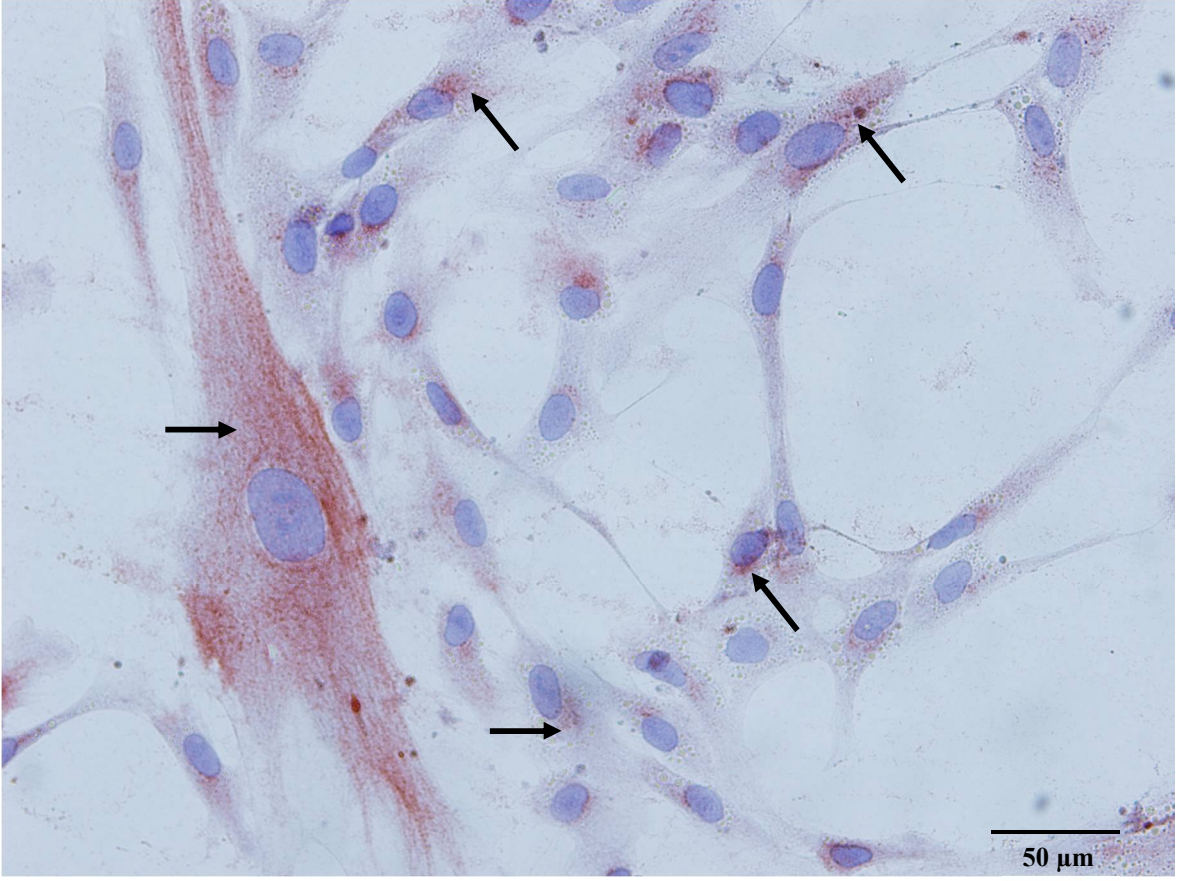
Tablo.3. Pasajlar arası yüzey markırları istatistiksel analizi



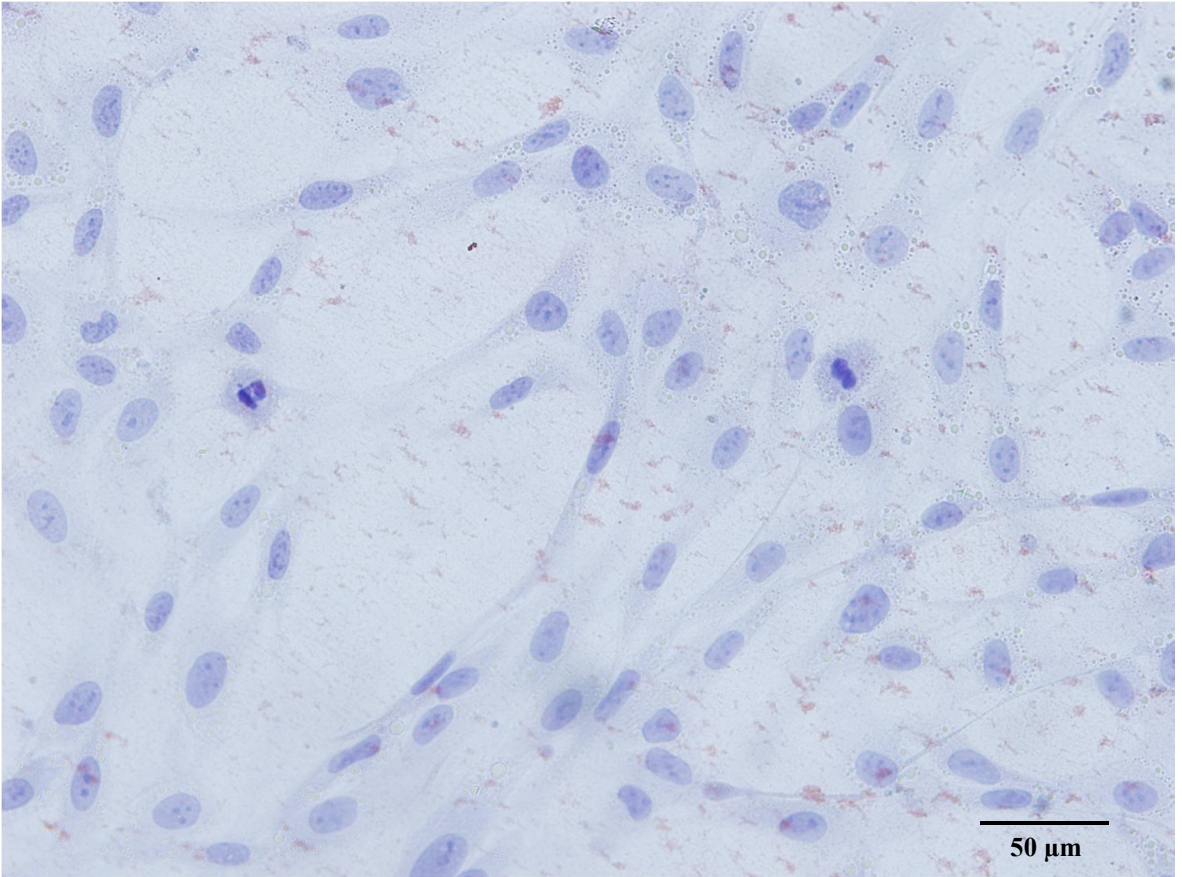
Resim.21. Nanog ekspresyonu negatif (40X büyütme)



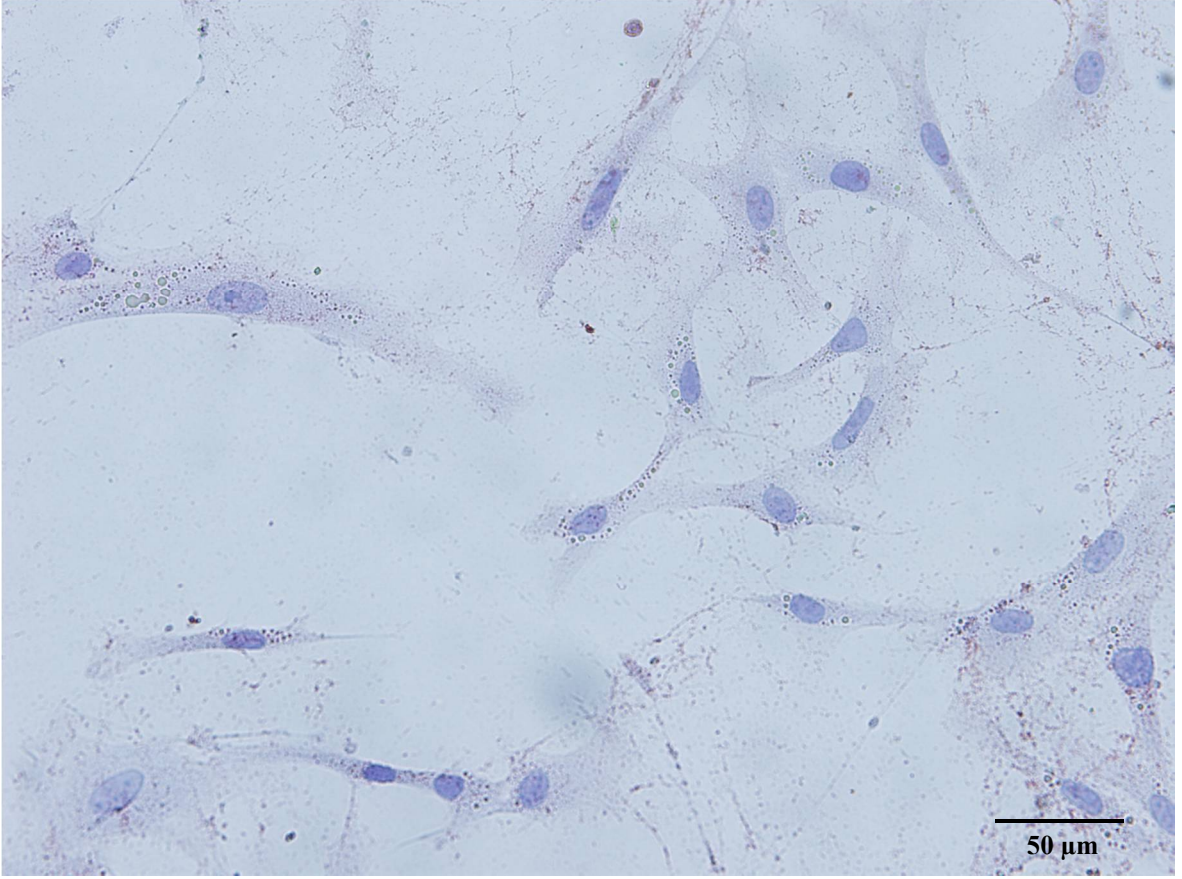
Resim.22. Oct-4 ekspresyonu %91 pozitif (40X büyütme)



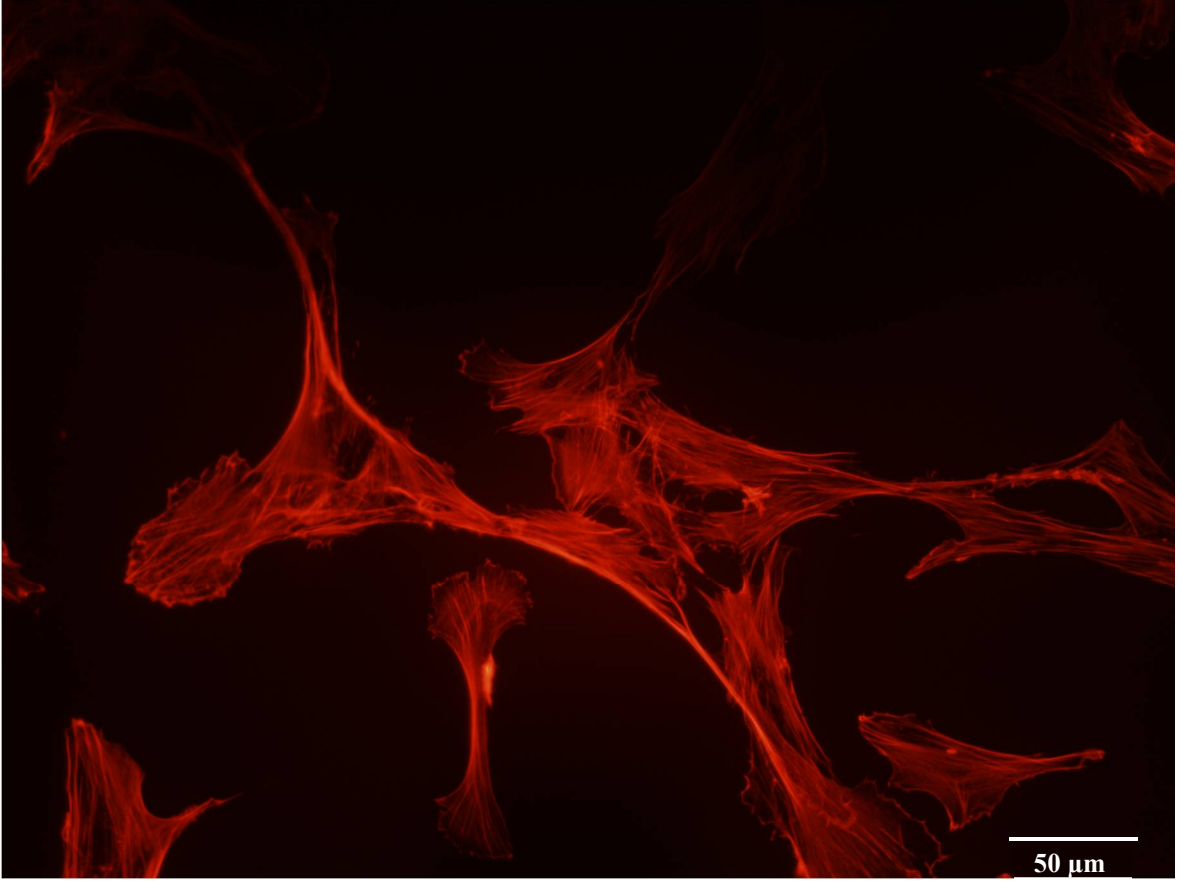
Resim.23. Sox-2 %36 pozitif (40X büyütme)



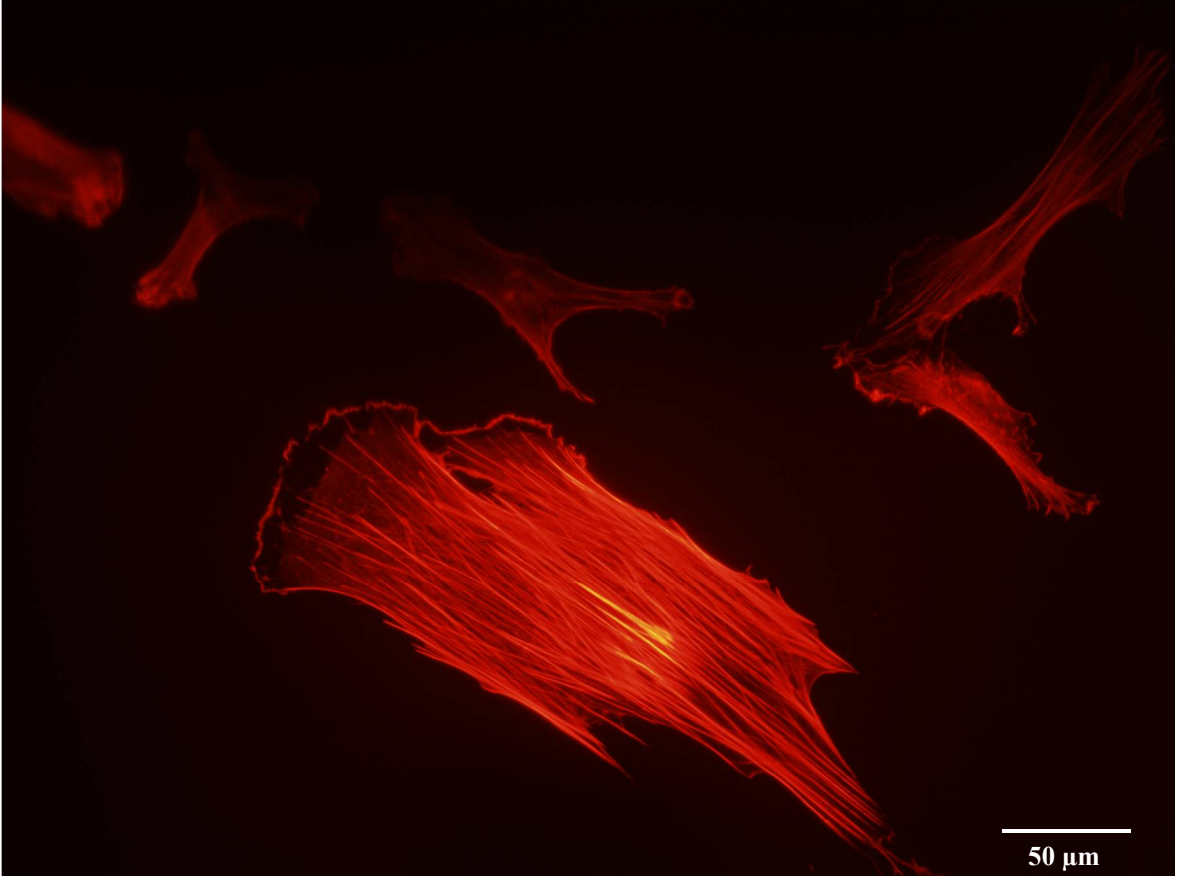
Resim.24. SSEA-4 negatif (40X büyütme)



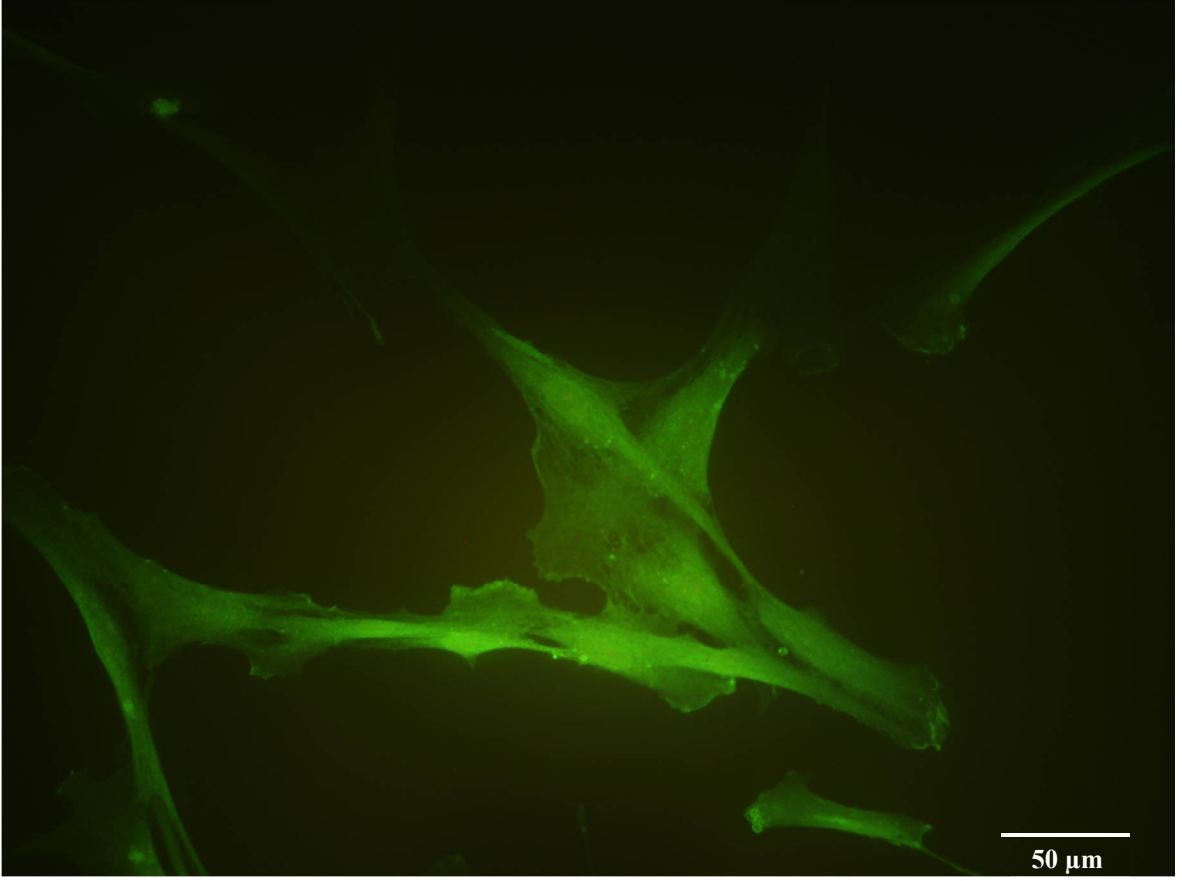
Resim.25. TRA-1-60 negatif (40X büyütme)



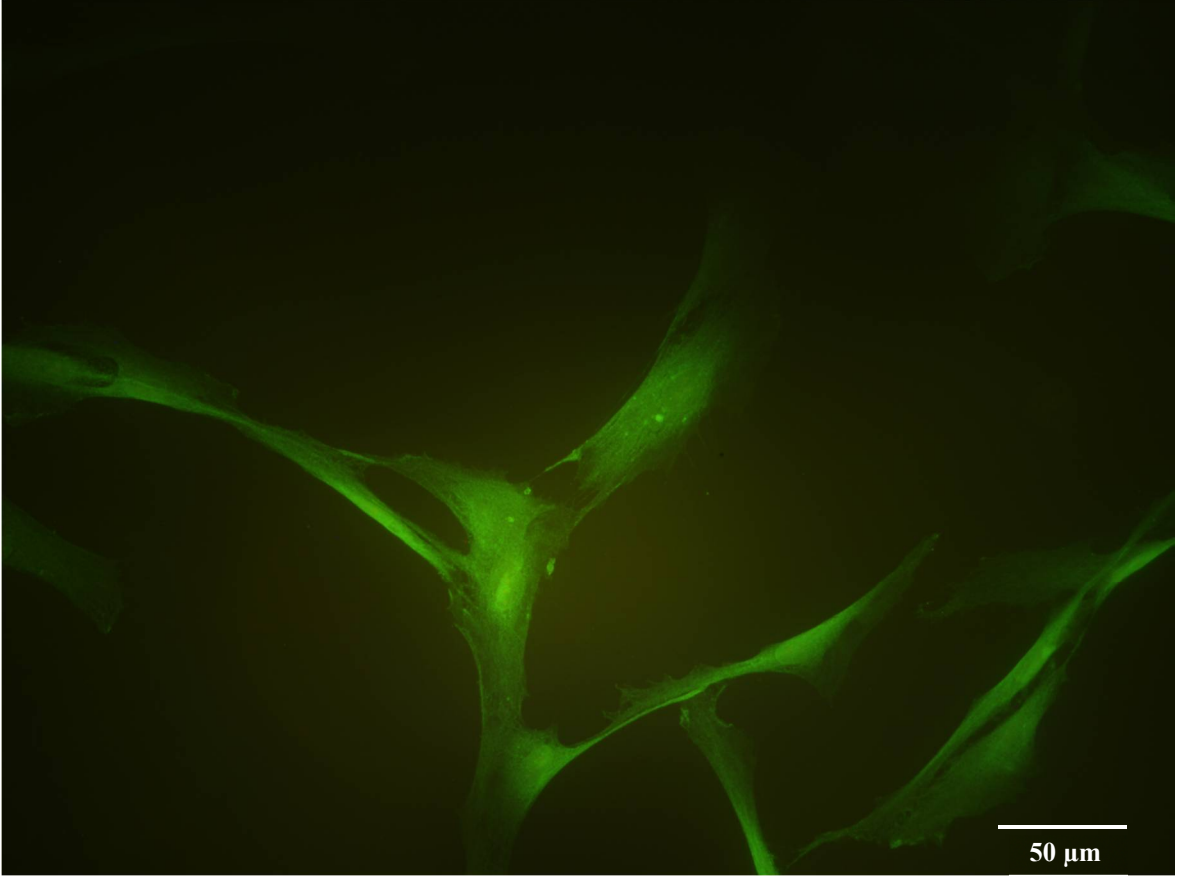
Resim.26. Hücredeki aktin filamentleri kırmızı çizgiler şeklinde görülüyor



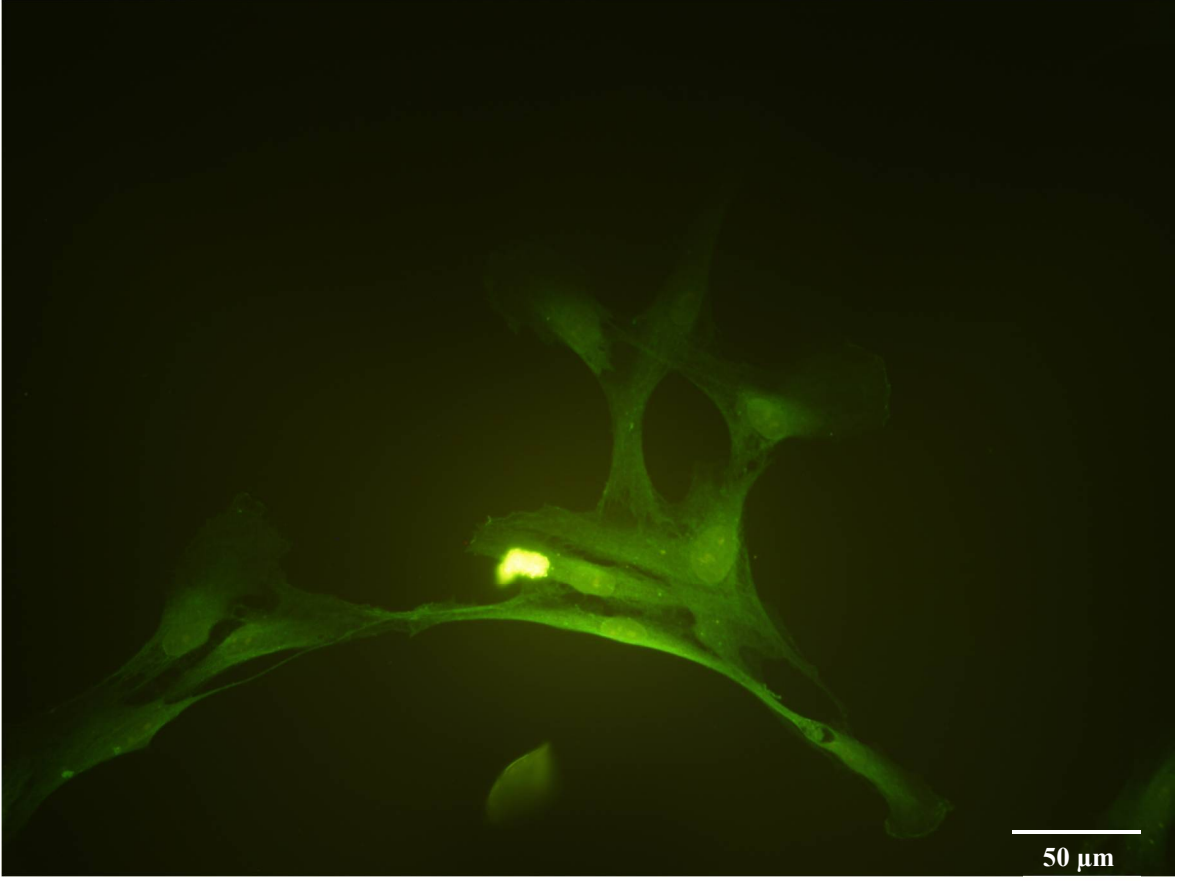
Resim.27. Hücredeki aktin filamentleri kırmızı çizgiler şeklinde görülüyor



Resim.28. CD44 ekspresyonu sekonder antikor: FITC (40X büyütme)



Resim.29. CD90 ekspresyonu sekonder antikor: FITC (40X büyütme)



Resim.28. CD105 ekspresyonu sekonder antikor:FITC (40X büyütme)

5. TARTIŞMA

Kök hücreler geleneksel olarak yetişkin kök hücelere (YKH) ve embriyonik kök hücelere (EKH) ayrılır. EKH, embriyonik blastokistlerden elde edilir ve tüm doku tiplerine farklılaşma kabiliyetine sahiptir. YKH, gelişmiş (yetişkin) veya gelişmekte olan (fetus, bebek veya çocuk) çeşitli dokulardan türetilir ve tüm dokulardaki hücre tiplerine değil; belirli dokulardaki hücre tiplerine farklılaşabilir.

Kİ ve yağ dokusu klinik kullanımda en çok kullanılan iki MKH kaynağıdır (da Silva Meirelles ve ark., 2006; Mosna ve ark., 2010; Hoogduijn ve Dor, 2013). Bununla birlikte plasenta ve umbilikal kord gibi alternatifler de vardır (da Silva Meirelles ve ark., 2006); ancak etik komplikasyonlardan ötürü geri planda kalmışlardır. Kİ ve yağ dokusundan elde edilen MKH'ler morfolojik olarak ve kültürdeki özellikleri bakımından benzerdir (Li ve ark., 2015).

Adipoz doku kaynaklı kök / stromal hücreler (ADSC), insan yağ hücrelerinin % 1 kadarı ADSC içeririrken, Kİ'nde yalnızca % 0.001-0.002 MKH içerir (Fraser ve ark., 2006). Bu çalışmada; elde etme açısından kemik iliğine nazaran daha az invaziv olan ve hücre sayısı bakımından kemik iliğine nazaran daha zengin olan yağ dokusunu (Wagner ve ark., 2005; Fraser ve ark., 2006) kullandık.

Yağ dokusundan kök hücreleri elde etmek amacıyla enzimatik veya nonenzimatik ayrıştırma yapılmasını takiben santrifüj ile yağ hücreleri ayrılır ve geriye SVF kalır. Aynı zamanda eksplant tekniği de basit ve invaziv olmayan bir kök hücre izolasyon tekniğidir (Lee ve ark., 2011). SVF endotelial hücreler, fibroblastlar, lenfositler, eritrositler, makrofajlar ve perisitleri barındırır (Oberbauer ve ark., 2015). Bu çalışmada nonenzimatik mekanik yöntem kullandık. SVF klinik uygulamalarda doğrudan kullanılan bir üründür (Rigotti ve ark., 2007; Sterodimas ve ark., 2011). İn vitro olarak kültüre hücreleri ektiğimizde kök hücreler plastiğe yapışarak diğerlerinden ayrılır (Bourin ve ark., 2013). Mezenkimal kök hücrelerin elde edilmesi sağlanmıştır ve oluşturduğumuz kültür şartlarında her pasajda kök hücreler mikroskopik olarak fibroblast benzeri, iğsi, plastiğe yapışan hücreler olarak gözlemlenmiştir.

Hücre kültür pasajlarında yüzey marker ekspresyonları CD19 negatif, CD90, CD44, CD105 pozitif olarak saptandı. Uluslararası hücresel terapi kriterlerine (ICST) göre insan kökenli MKH'lerin CD73, CD90 ve CD105 ekspresyonu açısından pozitif; CD45, CD34, CD14, CD19 ve HLA-DR molekül ekspresyonu açısından negatif olmalarının yanında bu hücrelerin plastisite ve çeşitli farklılaşma potansiyelleri gibi özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. MKH kültür pasajlarında hücre yüzey marker ekspresyon oranları bu özelliklerle uyumludur ve pasajlar ilerlemesine rağmen kök hücreler bu özelliklerini kaybetmeden korumaya devam etmişlerdir.

Yetişkin kök hücrelerinde bu pluripotens belirteçlerinin fonksiyonel rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. Dokuya spesifik MSC'lerin gelişim sırasında dokularda biriken pluripotent kök hücreler olabileceği ve dolayısıyla EKH ile ilişkili belirteçlere sahip olduğu hipotezi söz konusudur (Riekstina ve ark., 2009). Çeşitli doku kaynaklarından yetişkin insan MKH'lerindeki embriyonik kök hücre belirteçleri Oct-4, Nanog ve SOX-2'nin işlevsel rolünü belirlemek için şimdi çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Fare ve insan hücrelerindeki çalışmalar, Oct4'ün embriyonik kök hücrelerde pluripotentiği muhafaza eden homeobox proteini Nanog ve HMGbox transkripsiyon faktörü SOX-2 de dahil olmak üzere, bir transkripsiyon faktörleri ağı bileşeni olduğunu göstermiştir. Oct-4 ekspresyonunun immunositokimyasal çalışmalarda nukleusta veya sitoplazmada hem kemik iliği hem de adipoz doku kaynaklı MKH'lerde eksprese edilebildiği gösterilmiştir (Lin ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda da yağ dokusu kaynaklı MKH'lerde nükleer lokalizasyonda Oct-4 ekspresyonu gözlemlendi.

Bazı çalışmalarda MKH'lerde Sox-2 ve Nanog ekspresyonları gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda Nanog ekspresyonu açısından negatiftir. Sox-2 ekspresyonu zayıf gözlenmiş olup kültürde nadir hücrelerde güçlü eksprese edilmiştir.

Klinik kullanım açısından MKH'lerin güvenilir bir şekilde izolasyonu ve tekrarlanabilir pasajlanması önem taşır. Yağ dokusu hücre temelli tedaviler için zengin alternatif bir hücre kaynağıdır; ancak karşılaşılabilecek zorluklardan birisi kök hücre eldesinde optimal koşulları sağlayabilmektir.

Yapılan çalışmalarda intravenöz olarak verilen kök hücre sayısı kg'a ortalama 1-2 milyondur. Ancak hastalığın evresi ve terapi seansları arasındaki süreler kişiden kişiye göre değişmektedir (Squillaro ve ark., 2016; Álvaro-Gracia ve ark., 2017). Enjeksiyonla verilecek olan kök hücrelerin sayısı kadar hücrelerin transportu, kullanılan laboratuvar

malzemesinin kalitesi hücrelerin verilmeden önce ve verildikten sonraki canlılık yüzdeleri açısından önemlidir (Ikebe ve Suzuki, 2014).

Daha önce ratlarda Kİ kökenli MKH'lerle P1-P3 pasajlarında yapılan in vitro bir çalışmada osteojenik farklılaşmanın P3 pasajında daha zayıf olduğu gösterilmiştir (Sugiura ve ark., 2004). İnsanda yapılan Kİ kökenli MKH'lerde P5 pasajında bizim çalışmamıza benzer şekilde yüzey markerlarında %90'ın üzerinde pozitiflik saptanmıştır (Lo Surdo ve Bauer, 2012). Yine benzer bir şekilde insan Kİ kaynaklı MKH'lerde yapılan bir çalışmada CD44 ekspresyonu açısından düşüklük saptanmamıştır; ancak 15. Pasajdan sonra adipositlere ve osteositlere farklılaşma oranları düşmeye başlamıştır (Bonab ve ark., 2006).

MKH'ler in vitro pasajlanmanın erken evrelerinde hücresel tedavide kullanılmaktadır. Ancak ileri pasajlarda kullanımı daha fazla tartışılması gereken bir konudur.