

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

**DEĞİŞİK KAYNAKLI MKH'LERİN DETAYLI KARAKTERİZASYONU,
LENFOHEMATOPOEZİ DESTEKLEYİCİ ÖZELLİKLERİ VE İZOLASYONUNDA
CD271 ANTİJENİNİN ÖNEMİ**

Gözde AYDIN

**Kök Hücre Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2018**

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

**DEĞİŞİK KAYNAKLI MKH'LERİN DETAYLI KARAKTERİZASYONU,
LENFOHEMATOPOEZİ DESTEKLEYİCİ ÖZELLİKLERİ VE İZOLASYONUNDA
CD271 ANTİJENİNİN ÖNEMİ**

Gözde AYDIN

Kök Hücre Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Fatima S.F. AERTS KAYA

ANKARA

2018

DEĞİŞİK KAYNAKLI MKH'LERİN DETAYLI KARAKTERİZASYONU,
LENFOHEMATOPOEZİ DESTEKLEYİCİ ÖZELLİKLERİ VE İZOLASYONUNDA CD271

ANTİJENİNİN ÖNEMİ

GÖZDE AYDIN

Danışman: DR. ÖĞR. ÜYESİ FATİMA S. F. AERTS KAYA

Bu tez çalışması 10.07.2018 tarihinde jürimiz tarafından "Kök Hücre Doktora Programı"nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

PROF. DR. F. DUYGU UÇKAN ÇETİNKAYA
(HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ)

Üye:

PROF. DR. KAMİL CAN AKÇALI
(ANKARA ÜNİVERSİTESİ)

Üye:

PROF. DR. PETEK KORKUSUZ
(HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ)

Üye:

PROF. DR. HABİBE MELTEM ÖZGÜNER
(YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ)

Üye:

DOÇ. DR. AYŞEN GÜNEL ÖZCAN
(HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

01 Ağustos 2018



Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

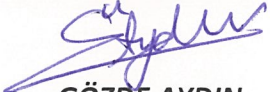
Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm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

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

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

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

06/08/2018


GÖZDE AYDIN

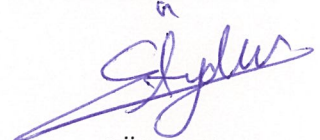
¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

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

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

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarında uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanının Dr. Öğr. Üyesi FATİMA S.F. AERTS KAYA danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



GÖZDE AYDIN

TEŞEKKÜR

Saygıdeğer tez danışmanım, Dr. Öğr. Üyesi Fatima S.F. AERTS KAYA'ya her anlamda yaptığı tüm manevi destekleri; çok başarılı, çalışkan, üretken ve aynı zamanda mütevazı bir hocanın tez öğrencisi olduğum için, çoğu deney yöntemlerini kendisinden öğrenme fırsatına sahip olduğum için kendimi bana hep şanslı hissettiren canım hocama; tez deneylerimi gerçekleştirme ve yazımı aşamalarında bana olan yardımları, her konuda deneyimlerini benimle her fırsatta paylaştığı, birçok konuda rehberim olduğu, beni her zaman dinlediği, hayatımın en zor döneminde beni motive ederek yanımda olduğu, yeri geldiğinde beni kendimden bile daha fazla düşünerek ilgisini ve desteğini eksik etmediği için, sonsuz saygılarımı, teşekkürlerimi sunuyorum.

Bana her zaman güvenen, her konuda destekleyen, inanan, yanımda olan, çok değerli mükemmel hocalarım olan Prof. Dr. Emin KANSU'ya, Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA'ya saygılarımı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Bir diğer çok değerli, çok çalışkan, başarılı, çok sevdiğim canım hocam Doç. Dr. Ayşen GÜNEL ÖZCAN'a tüm doktora süresince bana olan inancı, desteği, motivasyonları, anlayışı, tezimle ilgili tüm katkıları, tavsiyeleri ve moleküler yöntemleri öğrenmemi ve bu alanda da gelişmemi sağladığı, ayrıca tüm güzel sohbetleri için saygılarımı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Değerli hocam, Dr. Öğr. Üyesi Betül ÇELEBİ SALTİK hocama da her konuda teşekkürlerimi sunuyorum. Tez izleme komitemde bulunan saygıdeğer Prof. Dr. Can AKÇALI hocama, tezimle ilgili olan tüm bilimsel katkıları, önerileri için ve Western blot antikorlarını kullanmama izin verdiği, bana bu konuda destek olduğu, sayesinde bu yöntemi de öğrenme fırsatını sağladığı için kendisine saygılarımı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

En zor zamanlarımda yanımda olan beni hep destekleyen ve seven çok değerli annem ve anneanneme, Hacer-Özlem ablama, çok sevdiğim biricik Arzuma, İlker-Mustafa beye, Burcu, Süray, Taner'e, sevgili ve saygıdeğer Uğurlu Tunalı ve Gülseren Tunalı'ya yardımları, ilgileri ve destekleri için teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez, 261387 nolu Avrupa Birliği 7.nci çerçeve programı (FP7) ve 013D02102001 nolu Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi projesi tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

AYDIN, G. Değişik Kaynaklı MKH'lerin Detaylı Karakterizasyonu, Lenfohematopoezi Destekleyici Özellikleri ve İzolasyonunda CD271 Antijeninin Önemi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Doktora Tezi, Ankara, 2018. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH), kendini yenileyebilen multipotent hücrelerdir ve rejeneratif tedavilerin temelini oluşturmaktadır. CD271 antijeni, kemik iliğinden (Kİ) saf MKH izolasyonu için kullanılan en etkin belirteçtir. Bu tez kapsamında; CD271 antijeni kullanılarak insan Kİ'nden MKH izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır; plastiğe aderan Kİ-MKH ve CD271+ kök hücrelerin (KH), koloni oluşturma kapasitesi, immün profili, proliferatif ve farklılaşma kapasiteleri kıyaslanmıştır. Ayrıca CD271 antijeninin, fetal dokulardan saf MKH izolasyonu için kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmıştır; Kİ-kaynaklı MKH ve CD271+ KH'lerin fonksiyonu ve lenfohematopoetik desteği karşılaştırılmıştır; lenfohematopoetik farklılaşmasına desteğini anlamak için NOTCH reseptör ve ligandların ifadelerine bakılmıştır. CD271 antijeni düşük oranlarda Kİ'nde ifade edilse de, CD271+ KH'ler; Kİ'nin tüm koloni oluşturma kapasitesine sahip ve aderan Kİ-MKH'ler ile benzer bir immünofenotip, farklılaşma profili, sitokin salınımı ve NOTCH reseptör ve ligand ifadeleri göstermekte olup, benzer şekilde hematopoetik hücre desteğini sağlamaktadır. Ancak, CD271 antijeni Kİ'nden saf MKH'lerin izolasyonunda kullanılabılırken, fetal dokulardan saf MKH izolasyonu için kullanılamamaktadır. Bu sebeple; plasenta koryon (PK), plasenta amniyon (PA) ve göbek kordonundan (GK) MKH saflaştırılması için farklı izolasyon ve/veya kültür koşullarının optimizasyonu gerekmektedir. Medyuma salınan sitokin profiline ve NOTCH reseptör ile ligand ifadelerine bakıldığında, CD271+ KH'ler ve Kİ-MKH'ler birbirine yakındır. Ancak, fetal dokulardan izole edilen MKH'lerin profilleri birbirine yakın iken, Kİ'nden izole edilen MKH'lerden belirgin farklar göstermektedir. Bu farklar; *ex vivo* Hematopoetik kök hücre'lerin (HKH) çoğaltılması ve lenfohematopoetik farklılaşmaya olan desteği bakımından büyük önem taşıdığı için, klinik açıdan tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: CD271, Mezenkimal Kök Hücre, Hematopoetik Kök Hücre, Fetal dokular, Kemik iliği

(*) Bu çalışma 261387 nolu Avrupa Birliği 7.nci çerçeve programı (FP7) ve 013D02102001 nolu Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi projesi tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

AYDIN, G. Detailed characterization of MSCs from different sources, their ability to support lymphohematopoiesis and the importance of CD271 antigen for their isolation. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Stem Cell Program PhD thesis, Ankara, 2018.

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are multipotent cells with self-renewal ability and form the basis for regenerative treatments. CD271 antigen is an effective marker for isolation of pure populations of MSCs from bone marrow (BM). Within this thesis, the efficacy of CD271 in the isolation of MSCs from BM was assessed, cells were characterized with respect to their colony forming capacity, immunophenotype, proliferative and differentiation capacities and compared to plastic adherent BM-MSCs. In addition, the use of CD271 for isolation of MSCs from fetal tissues was assessed. Functional and lymphohematopoietic support of BM-derived MSCs and CD271 + stem cells and expression of NOTCH receptors and ligands was examined to understand their role in *in vitro* lymphohematopoietic differentiation. Although the CD271 was expressed at very low levels, CD271 + stem cells contained all colony forming capacity of the BM. These cells showed similar immunophenotypes and differentiation profiles, cytokine release, NOTCH receptor and ligand expression, as well as support of *ex vivo* hematopoietic cell expansion in comparison to BM-MSCs. However, the CD271 antigen could not be used for isolation of pure MSC populations from fetal tissues. Therefore; different isolation and/or culture conditions must be optimized for the purification of MSCs from placenta chorion (PC), placental amnion (PA) and umbilical cord (UC). CD271 + stem cells and BM-MSCs showed similar cytokine secretion and NOTCH receptor and ligand expression. However, while the profile of MSCs isolated from fetal tissues displayed high similarities, they were clearly distinct from BM-MSCs and BM-CD271+ stem cells. The importance and implications of these differences, which may have great importance for their clinical use, as well as effects on the *ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells (HSCs) and lymphohematopoietic differentiation are discussed in this thesis.

Keywords: CD271, Mesenchymal Stem Cell (MSC), Hematopoietic Stem Cell (HSC), Fetal tissue, Bone marrow

(*) This study was supported by a 7th Framework Program (FP7) grant from the European Union no 261387 and a grant from the Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit Project no 013D02102001.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Mezenkimal Kök Hücre Terminolojisi ve Tarihçesi	5
2.2. Mezenkimal Kök Hücre Belirteçleri ve Tanımı	6
2.3. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları	8
2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünomodülatuar Etkileri	9
2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Hematopoetik Desteği	11
2.6. Kemik İliğinden Mezenkimal Kök Hücrelerin Prospektif İzolasyonu	12
2.6.1. STRO Antikorları	13
2.6.2. CD105	13
2.6.3. CD73	14
2.6.4. Stage-Specific Embriyonik Antijenler	14
2.6.5. D7-FIB	14
2.6.6. GD2	15
2.6.7. CD146	15
2.6.8. CD271	15
2.7. CD271 Geni ve Reseptörü	16
2.7.1. CD271 Antijeninin Organizmadaki Rolü	18

2.7.2. CD271 Antijeninin Dokulardaki Dağılımı	19
2.7.3. CD271+ Kök Hücre Özellikleri ve <i>In Vivo</i> Lokalizasyonu	20
2.8. Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücreleri	21
2.8.1. Plasenta	22
2.8.2. Göbek Kordonu	23
2.9. Hematopoetik Kök Hücreler	24
2.9.1. Hematopoez	24
2.9.2. <i>Ex Vivo</i> Hematopoetik Kök Hücre Çoğaltılması	27
2.9.3. Mezenkimal Kök Hücre/Hematopoetik Kök Hücre Ko-Kültürleri	27
2.10. Notch Reseptörleri, Ligandları ve Sinyalizasyonu	29
2.10.1. Hematopoezde Notch Sinyalizasyonunun Önemi	31
2.10.2. Lenfopoezde Notch Sinyalizasyonunun Önemi	31
2.10.3. <i>In Vitro</i> Lenfopoezi Destekleyen Hücre Hatları	32
2.11. Hipotez	33
2.12. Tez Çalışmasının Amaçları	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Materyaller	37
3.1.1. İnsan Materyalleri	37
3.1.2. Hücre Hatları	37
3.2. Hücre İzolasyonu	38
3.2.1. Kemik İliği Mononükleer Hücre İzolasyonu	38
3.2.2. Kordon Kanından Mononükleer Hücre İzolasyonu	38
3.2.3. Kemik İliğinden Plastiğe Aderan Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	39
3.2.4. İnsan Kemik İliğinden CD271+ Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü	39
3.2.5. <i>Koloni Oluşturan Ünite</i> -Fibroblastik Deneyi	40
3.2.6. Fetal Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu	41
3.2.7. Kordon Kanından CD34+ Hematopoetik Kök Hücre İzolasyonu	42
3.3. Hematopoetik Kök Hücre Koloni Oluşturan Birim Deneyleri	44
3.4. CD34+ Hematopoetik Kök ve Progenitör Hücre Kültürü ve Ko-Kültürleri	44
3.5. B ve T Hücre Farklılaşma Deneyleri	44

3.6. Hücrelerin Proliferasyon Takibi	45
3.7. Hücre Dondurulması ve Çözdürülmesi	46
3.8. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Deneyleri	47
3.9. Hücre Sayımı	48
3.10. Hücrelerin İmmünofenotiplendirilmesi	48
3.11. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR)	49
3.11.1. RNA İzolasyonu ve RNA Kantifikasyonu	49
3.11.2. cDNA Sentezi	51
3.11.3. qRT-PCR	52
3.12. Multipleks Sitokin-Array	54
3.13. ELISA	54
3.14. Western Blot	55
3.14.1. Protein İzolasyonu	55
3.14.2. Bradford Assay	56
3.14.3. Poliakrilamid Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Yüklenmesi	56
3.14.4. Protein Transferi	57
3.14.5. İmmün İşaretleme	58
3.14.6. Elektroforez Sonrası Jellerin Coomassie Blue ile Boyanması	58
3.17. NSGW41 Farelere Hematopoetik Kök Hücre Nakli	59
3.18. Mikoplazma Testleri	60
3.19. İstatiksel Yöntemler	60
3.20. Kimyasallar, Besiyeri, Tampon ve Solüsyonlar	61
4. BULGULAR	70
4.1. Kemik İliğinden Mezenkimal Kök Hücre ve CD271+ Kök Hücrelerin İzolasyonu, Üretilmesi ve Karakterizasyonu	70
4.1.1. Kemik İliği CD271+ Kök Hücrelerin Koloni Oluşturma Kapasitesi Yüksek	70
4.1.2. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin ve CD271+ Kök Hücrelerin Farklılaşma Kapasitesi Benzerdir	73

4.1.3. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler ve CD271+ Kök Hücreler Benzer İmmünojenotip Göstermektedir	75
4.1.4. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin ve CD271+ Kök Hücrelerin Proliferasyon Hızı Benzerdir	76
4.1.5. NGF, Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin ve CD271+ Kök Hücrelerin Proliferasyon Hızını Etkilememektedir	76
4.1.6. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler ve CD271+ Kök Hücreler Benzer NOTCH Reseptör ve Ligand Gen Profili Göstermektedir	77
4.1.7. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler ve CD271+ Kök Hücreler Benzer Sitokin Profili Göstermektedir	79
4.1.8. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler ve CD271+ Kök Hücreler, CD34+ Hematopoetik Kök ve Progenitor Hücre Çoğalmasını Desteklemektedir	81
4.1.9. CD271+ Kök Hücreler ile Ko-Kültür Yapılarak Çoğaltılan CD34+ Hematopoetik Kök ve Progenitor Hücreler <i>In Vitro</i> B/T Hücre Farklılaşma Potansiyeli Göstermektedir	85
4.2. Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu, Üretilmesi ve Karakterizasyonu	87
4.2.1 Fetal Doku CD271+ Hücrelerin CFU-F Kapasitesi Yoktur	87
4.2.2. Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli Düşüktür	88
4.2.3. Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücre Kültürleri Heterojen Hücre Popülasyonlarından Oluşmaktadır	90
4.2.4. Kemik İliği ve Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücrelerinin İmmünomodulator Molekül İfadeleri	92
4.2.5. Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin Proliferasyon Hızı Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerden Yüksekse	93
4.2.6. Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücreler, Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücelere Göre Yüksek Oranda IL-8 Salgılamaktadır	94

4.2.7 Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin <i>NOTCH</i> ve <i>JAG</i> İfadeleri	
Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelere Göre Daha Düşüktür	96
4.2.8. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerde ve CD271+ Kök Hücrelerde	
NOTCH1 ve NOTCH3 Protein İfadeleri Benzerdir	98
4.2.9. NSGW41 Fare Deneyi <i>In Vivo</i> Sonuçları	98
4.2.10. Mikoplazma ve Endotoksin Testleri Sonuçları	99
5. TARTIŞMA	100
5.1. CD271 Antijeni Kemik İliğinden Saf Mezenkimal Kök Hücrelerin	
İzolasyonunda Kullanılabilmektedir	100
5.2. CD271 Antijeninin Fetal Dokulardan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin	
İzolasyonundaki Önemi	102
5.3. Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin Özellikleri Kemik İliği Mezenkimal	
Kök Hücrelerden Önemli Farklılıklar Göstermektedir	104
5.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin, Hematopoetik Kök Hücrelerin İdamesinde,	
Çoğaltılmasında ve Farklılaşmasındaki Önemi	108
5.5. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler ile CD271+ Kök Hücrelerin ve Fetal	
Mezenkimal Kök Hücrelerin <i>In Vitro</i> Lenfopoiesi Destekleme Potansiyeli	110
6. SONUÇ	113
7. KAYNAKLAR	118
8. EKLER	
EK 1. Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzinleri	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACTB	Beta-aktin
ARS	Alizarin Red S
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BFU-E	Burst forming unit-erythroid
CD	Cluster of differentiation
CFU-F	Koloni oluşturan birim-fibroblast
CFU-GM	Colony forming unit-granulocyte, macrophage
CFU-GEMM	Colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte
CLP	Common Lenfoid Progenitör hücre
CMP	Common Myeloid Progenitör hücre
DMEM-LG	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EKH	Embriyonik kök hücre
(FBS)	Fetal buzağı serumu
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GK	Göbek kordonu
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor
GMLP	Granülosit-makrofaj-lenfosit progenitör
GMP	Granülosit-makrofaj progenitör
HGF	Hepatocyte growth factor
HKH	Hematopoetik kök hücre
HKPH	Hematopoetik kök ve progenitör hücre
HO-1	Heme-oxygenase-1
HUVEC	İnsan umbilikal ven endotel hücre
IDO	İndoleamine 2,3-dioxygenase
IFN- γ	Interferon gamma
ISCT	International Society for Cellular Therapy
KH	Kök hücre
Kİ	Kemik iliği

Kİ-MNH	Kemik iliği Mononükleer hücre
KK	Kordon kanı
LNGFR	Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor
M-CAM	Melanoma-associated adhesion molecule
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MEP	Megakaryosit-eritrosit progenitör
MHC	Majör doku uygunluk kompleksi
MKH	Mezenkimal kök hücre
MNH	Mononükleer hücre
MSS	Merkezi sinir sistemi
NGF	Nerve growth factor
NICD	Notch intraselüler domeyn
NO	Nitric oxide
NSG	Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency
NSGW41	NSG Kit W41/W41
NT3	Nörotrofin 3
NT4/5	Nörotrofin 4/5
ORO	Oil Red O
p75NTR	p75 Nörotrofin reseptörü
PA	Plasenta amniyon
PBN	PBS/BSA/NaN ₃
PBS	Fosfat-tampon tuz
PGE2	Prostaglandin E2
PK	Plasenta koryon
PL	Plasenta
PVDF	Polyvinylidene difluoride
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor- α

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli	5
2.2. Mezenkimal kök hücrelerin lenfoid soy kökenli bağışıklık sistemi hücreleri üzerine olan etkisi ve immünomodülatuar işlevleri	11
2.3. CD271 reseptörünün yapısı	17
2.4. Nörotrofin ailesinin üyeleri ve reseptörleri	17
2.5. Plasentanın yapısı	22
2.6. Göbek kordonunun yapısı	24
2.7. Hematopoetik hiyerarşi modeli	25
2.8. Hematopoetik kök hücre nişi	26
2.9. Mezenkimal kök hücre/hematopoetik kök hücre ko-kültürlerindeki mezenkimal kök hücrelerin etkisi	28
2.10. Notch sinyalizasyonu	30
2.11. <i>In vitro</i> CD34+ hematopoetik kök ve progenitör hücrelerden lenfoid soy kökenli hücrelerin farklılaştırılması	33
3.1. Ficoll dansite gradient santrifügasyon öncesi ve sonrası katmanlar	39
3.2. Kemik iliğinden mezenkimal kök hücre ve CD271+ kök hücrelerin izolasyonu ve yapılan deneyler	41
3.3. Fetal kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve yapılan deneyler	43
3.4. CD271+ kök hücre ile çoğaltılan CD34+ hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin B ve T hücre farklılaşması	45
3.5. Multipleks sitokin-array deney protokolü	55
4.1. Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin ve CD271+ kök hücrelerinin <i>in vitro</i> morfolojisi	71
4.2. Kemik iliğinden CD271+ kök hücre izolasyonuna ait temsili akım sitometri görüntüleri	72
4.3. Farklı hücre fraksiyonlarının inverte mikroskop görüntüleri	73
4.4. Kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücrelerin ve CD271+ kök hücrelerin farklılaşma görüntüleri	74

4.5.	Gerçek zamanlı hücre proliferasyon analizi (xCELLigence)	77
4.6.	Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve CD271+ kök hücrelerde NOTCH reseptör ve ligandlarının gen ifadeleri	78
4.7.	Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve CD271+ kök hücrelerde Notch reseptör ve ligandlarının ifadesi	78
4.8.	Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve CD271+ kök hücrelerde <i>HOX</i> genlerinin ifadesi (kat değişimi)	79
4.9.	Kemik iliği mezenkimal kök hücre ve CD271+ kök hücrelerin salgıladıkları ortalama sitokin düzeyleri	80
4.10.	CD34+ hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin <i>in vitro</i> çoğaltılması	81
4.11.	Üç farklı koşullarda <i>ex vivo</i> çoğaltılan CD34+ hematopoetik hücrelerin akım sitometrisi plotları – temsili örnek sonucu	83
4.12.	7 ve 10 gün süresince <i>ex vivo</i> çoğaltılan kemik iliği, periferik kan ve kordon kanı CD34+ hücrelerin sayıları	84
4.13.	7 gün <i>ex vivo</i> çoğaltma sonrası CD34+ hematopoetik hücrelerin koloni oluşturma potansiyelleri	84
4.14.	Op9 ve Op9-DL1 hücre hattı üzerinde <i>in vitro</i> çoğaltılan CD34+ hücrelerin B ve T hücre farklılaşması	85
4.15.	Op9 ve Op9-DL1 hücre hattı üzerinde B (CD10+/CD19+) ve T hücre (CD3-/CD4+/CD8+) farklılaşması	87
4.16.	Fetal doku mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli düşüktür	89
4.17.	Karışık hücre türlerini içeren fetal doku kültürlerinin akım sitometrisi analizi	92
4.18.	Fetal doku ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin gerçek zamanlı proliferasyon analizi	94
4.19.	Fetal doku ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin multipleks sitokin array sonuçları	95
4.20.	Fetal doku ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerde <i>NOTCH</i> reseptör ve ligandlarının gen ifadeleri	97

4.21.	Fetal doku ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerde NOTCH reseptör ve ligandlarının gen ifadeleri şeması	97
4.22.	Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerde ve CD271+ kök hücrelerde NOTCH1, NOTCH3 ve NOTCH4 protein ifadeleri	98



TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Negatif hematopoetik kök hücre belirteçleri, pozitif mezenkimal kök hücre belirteçleri ve biyolojik işlevleri	7
2.2. Mezenkimal kök hücre kaynakları	8
2.3. Farklı dokularda CD271 ifadeleri	20
2.4. <i>Ex vivo</i> çoğaltılan kordon kanı klinik denemeleri	29
3.1. Akım sitometrisinde kullanılan antikorların detayları	50
3.2. qRT-PCR'de kullanılan primerlerin dizileri	53
3.3. Kuyucuklara yüklenecek olan örneklerin hazırlanması	57
4.1. Pasaj 3 kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin ve CD271+ kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli	74
4.2. Pasaj 3 kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ve CD271+ kök hücrelerin immünofenotipi (%)	75
4.3. Pasajlar sonrasındaki kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ve CD271+ kök hücrelerin ikiye katlanma oranları	76
4.4. Hücre çoğaltılması sonrası hematopoetik kök hücre fraksiyonlarının sayıları, yüzdeleri ve popülasyonu ikiye katlama oranları – temsili örnek sonucu	82
4.5. 7 gün CD271+ kök hücre/CD34+ hematopoetik kök ve progenitör hücre ko-kültüründen sonra, hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin B hücre yönünde farklılaşması	86
4.6. 7 gün CD271+ kök hücre/CD34+ hematopoetik kök ve progenitör hücre ko-kültüründen sonra, hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin Op9-DL1 hücre hattı üzerinde T hücre yönünde farklılaşması	86
4.7. Farklı dokulardan izole edilmiş pasaj 3 mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli	90
4.8. Akım sitometrisi mezenkimal kök hücre immünofenotipi sonuçları (%)	91
4.9. Fetal doku ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin immünomodülatuar molekül ifadeleri (%)	93

- 4.10.** Fetal doku ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin pasaj
sonrasındaki ikiye katlanma oranları 93
- 4.11.** Fetal doku ve kemik iliği mezenkimal kök hücre kültür süpernatantlarında
saptanan IL-8 düzeyleri 96



1. GİRİŞ

Mezenkimal kök hücre (MKH)'ler; hem *in vivo* hem de uygun *in vitro* koşullarda çeşitli mezodermal hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine ve yüksek çoğalma kapasitesine sahip olan multipotent erişkin stromal kök hücrelerdir [1]. Kemik iliği (Kİ) en önemli MKH kaynaklarından biridir. Ancak Kİ'nin dışında birçok dokudan da MKH'ler izole edilebilmekte ve son yıllarda plasenta (PL) ve göbek kordonunun (GK) MKH'ler için önemli bir kaynak olduğu gösterilmiştir [2, 3]. MKH'lerin klinik kullanımı özellikle rejeneratif tıp alanında, hematopoetik kök hücrelere (HKH) olan desteği ve immün baskılayıcı etkileri bakımından araştırılmaktadır. MKH'lerin klinik kullanımları için; hücre izolasyonu, çoğaltılması ve farklılaşması protokollerinin standardizasyonunun yapılmasına büyük bir ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla, diğer hücre kontaminasyonlarından olabildiğince engellenmiş saf bir MKH popülasyonunun elde edilmesi için spesifik yüzey belirteçlerinin kullanımı araştırılmaktadır [4, 5]. Ancak farklı dokulardan saf MKH'leri elde edebilmek için bu belirteçlerin verimliliği eşit olamamakta ve dokuya göre farklı belirteçlerin tanımlanması gerekli olabilmektedir.

CD271 (p75NTR/LNGFR); Kİ-MKH'lerin prospektif izolasyonunda en çok umut vaat eden belirteçtir [6, 7]. CD271'in Kİ'nden MKH izolasyonunda kullanılan, son derece spesifik ve seçici bir belirteç olduğu gösterilmiştir [8]. Ayrıca CD271 tek başına, Kİ'nden ve diğer dokulardan taze [9], klonojenik kapasitesi çok yüksek olan, multipotent farklılaşma yeteneğine sahip homojen altpopülasyonların elde edilmesinde yüksek verim sağlamaktadır [8]. Saf MKH'lerin seleksiyonu sadece CD271 antikoru kullanılarak yapılabildiğinden, hem maliyet hem de zaman bakımından yarar sağlamaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar CD271 tabanlı yöntemlerin, klinik bakımdan da önemini vurgulamaya başlamıştır. Bu sebeple, **fetal dokular ve Kİ'nden izole edilen MKH ve CD271+ kök hücrelerin (KH'lerin) izolasyon yöntemi, başarısı, CD271 belirteçi ve bu hücrelerin detaylı karakterizasyonunun yapılması hedeflenmiştir.**

HKH'lerin *ex vivo* çoğaltılması protokollerin oluşturulması, klinik bakımdan gen tedavi ve HKH naklinde büyük önem taşımaktadır. HLA uyumlu bir Kİ veya göbek kordon kanı (KK) donörü bulunsa bile, hücre sayısı ve kalitesi her zaman yeterli

olamamaktadır [10, 11]. Bilindiği üzere; Kİ mikroçevresi veya nişinde bulunan çeşitli stromal hücreler, HKH işlevini, sağ kalımını, sessiz fazda kalmasını, çoğalmasını ve hematopoezi desteklemektedir. Kİ-MKH'ler bu HKH nişinin en önemli stromal bileşenlerindendir: HKH homingi (yuvaya dönmesi), kendini yenilemesi, çoğalması ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır [12, 13]. Kİ-MKH'ler, büyüme faktörleri ve düzenleyici sitokinler salgılayarak hücre-hücre etkileşimlerini uyarmakta ve böylelikle lenfo-hematopoetik sistemin gelişimi ve farklılaşma süreçlerinde önemli rol oynamaktadır ve bu şekilde *in vitro* hematopoetik farklılaşmayı desteklemektedirler [14]. Günümüzde, HKH'lerin *ex vivo* ekspansiyonunu artırmaya yönelik çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Yapılması planlanan bu tez kapsamında, **HKH'lerin çoğalmasını sağlayan belirlediğimiz çeşitli büyüme faktör kokteyllerini kullanarak, fetal dokular ile Kİ'nden elde edilen MKH'ler veya CD271+ KH'ler ile beraber yapılan ko-kültür deneyleri ile HKH'lerin *in vitro* çoğaltılmasının optimize edilmesi planlanmıştır.**

Daha önce yapılan bir çalışmada; CD271+ KH'leri CD133+ HKH'ler ile birlikte Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) farelere transplante edildiğinde, CD271+ KH'lerin, CD133+ hücrelerin çok yönlü engraftmanını ve lenfohematopoezi daha fazla desteklediği ve nakilden sonraki immün-yeniden yapılanmanın daha iyi olduğu gösterilmiştir [15]. Bu CD271+ KH'lerin; HKH'lerin Kİ'ne dönmesi (homingi), HKH'lerin Kİ'ndeki tutulumu ve proliferasyonu (engraftmanı) üzerine olan etkileri veya HKH'lerin engraftmanından sonraki lenfopoetik farklılaşmanın (immün-yeniden yapılanmanın) nasıl daha iyi gerçekleşmesini sağladığı veya hangi mekanizmaları kullanarak uyardığı henüz bilinmemektedir. O nedenle; önerilen tez kapsamında fetal doku, Kİ-MKH ve CD271+ KH'ler ile beraber yapılan ko-kültürler çalışmalarından sonra, çoğaltılan HKH'lerin fare kaynaklı Op9 ve Op9-DL1 hücre hatlarından oluşturulmuş besleyici tabakalar üzerinde *in vitro* koşullarda B ve T hücre yönünde lenfohematopoetik potansiyelinin de araştırılması, özellikle de CD271+ KH'lerin yukarıda bahsedilen etki mekanizmalarına nasıl etki ettiğinin öncelik olarak bu deney planıyla açıklanmaya çalışılması hedeflenmiştir.

Notch; Kİ homeostazını sağlayan HKH/MKH etkileşimlerinde rol oynayan sinyal yollarından birisidir. MKH'ler ve osteoblast'lar, HKH'lerdeki Notch

sinyalizasyonu uyararak HKH'lerin kendini yenileme kapasitesini artırmakta [16-18] ve Kİ homeostazında önemli rol oynamaktadır [19]. Notch sinyal yolları HKH nişinde, HKH kaderinin belirlenmesinde rol oynadığı için; bu yolların aktivasyonu ile HKH havuzunun çoğalmasını ve HKH'lerin kendini yenileme kapasitesini arttırmaktadır [20]. Ayrıca, Notch sinyalizasyonunun ortak lenfoid progenitör hücrelerden T hücre yönüne doğru soy kararını sağladığı gösterilmiştir [21, 22]. *In vitro* insan kaynaklı B/T farklılaşmasını destekleyen hücre hatları henüz oluşturulmadığı için, bu tez çalışmasında fetal dokular ve Kİ'nden izole edilen MKH'ler ile CD271+ KH'lerin Notch reseptör ve ligand ifade profili değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre devam çalışmaları için B ve T hücre gelişimini en iyi destekleyebilecek insan kaynaklı hücre kaynağının ortaya çıkarılması planlanmıştır.

Bu tez çalışmasının ana amaçları; 1) Fetal dokulardan ve Kİ'nden elde edilen MKH ve/veya CD271+ KH'lerin karakterizasyonunun yapılması ve fonksiyonel özelliklerinin karşılaştırması, 2) Besleyici tabaka olarak bu hücreleri kullanarak, HKH *ex vivo* çoğaltılmasının optimizasyonunun yapılması ve 3) HKH'lerin en iyi *in vitro* ve *in vivo* lenfopoetik farklılaşmasını destekleyen stromal kök hücre kaynağının belirlenmesidir.

Yukarıdaki araştırma sorularının doğrultusunda, bu tez kapsamında;

- 1) Kİ'nden izole edilen MKH ve CD271+ KH'lerin klonojenik kapasiteleri, farklılaşma potansiyeli ve immünofenotiplerinin detaylı karakterizasyonunun yapılması,
- 2) Kİ-MKH ve PL (Plasenta amniyon (PA) ve Plasenta koryon (PK) hücreler) ile GK-MKH özelliklerinin karşılaştırılması,
- 3) CD271 antijeninin PL ve GK kaynaklı MKH'lerin izolasyonu için uygun olup olmadığının değerlendirilmesi,
- 4) *ex vivo* Hematopoetik kök ve progenitör hücre (HKPH) çoğaltılmasını sağlayacak/arttıracak serumsuz kültür koşullarının optimizasyonunun yapılması,
- 5) *ex vivo* HKPH çoğaltılmasında kullanılan besleyici tabakalar için en iyi MKH kaynağının belirlenmesi,

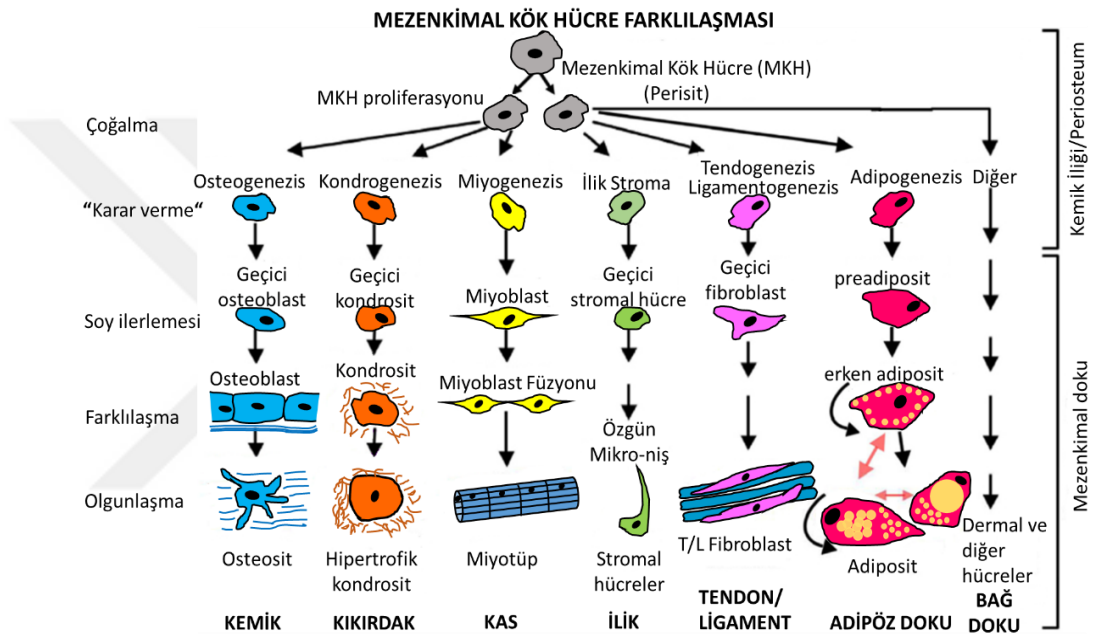
- 6) *ex vivo* koşullarda çoğaltılan HKPH'lerin, Op9 ve Op9-DL1 hücre hatlarında B/T hücre yönünde farklılaşma kapasitelerinin değerlendirilmesi,
- 7) HKPH'lerin *in vitro* B/T hücre farklılaşmasında, fare kaynaklı Op9 ve Op9-DL1 hücre hatları yerine alternatif olarak kullanılabilecek olan en iyi insan MKH kaynağının belirlenmesine dair ön deneylerin yapılması,
- 8) ve NSG Kit W41/W41 (NSGW41) immün yetmezlikli fare modelinde optimize edilmiş *in vitro* koşullarda çoğaltılan insan KK kaynaklı CD34+ HKPH'lerin *in vivo* homing/engraftman kapasitesi ile immün-yeniden yapılandırma özelliklerinin test edilmesi, öncelik olarak da nakil edilecek hücre dozunun belirlenmesine dair ön çalışmaların yapılması hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mezenkimal Kök Hücre Terminolojisi ve Tarihçesi

Mezenkimal kök hücre (MKH)'ler, hem *in vivo* hem de uygun *in vitro* koşullarda çeşitli mezodermal hücre tiplerine (örn: osteosit, kondrosit, adiposit, kas hücresi ve tenosit vb.) farklılaşabilme yeteneğine ve yüksek çoğalma kapasitesine sahip hematopoetik olmayan multipotent erişkin stromal kök hücrelerdir [1, 23, 24] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli. [25]'den uyarlanarak çizilmiştir.

MKH'ler ilk olarak Alexander Friedenstein tarafından koloni oluşturan birim-fibroblast (CFU-F) ve osteojenik kök hücreler olarak tanımlanmıştır [26, 27]. Bu hücreler plastiğe yapışma ve CFU-F oluşturma yeteneğine sahip, çoğalma kapasitesi yüksek hücrelerdir. Bu zamana kadar MKH tanımlaması için birçok terimler kullanılmıştır; örneğin "Stromal kök hücreler", 1988 yılında Owen ve diğ. tarafından; hematopoetik kompartmandan daha çok stromal kompartmanda bulunan hücreleri temsil ettiği için önerilmiştir [28]. 1991 yılında hücrelerin kompartman orijinini vurgulamak yerine; *in vitro* kendini-yenileme özelliği ve farklılaşma potansiyeli de olduğu için bu hücrelere "Mezenkimal Kök Hücre" denilmesi önerilmiştir [29]. Bu

hücrelerin kök hücreden çok progenitör hücre olabilecekleri düşünüldüğü için ise “Mezenkimal Progenitör Hücre” adlandırılması öne sürülmüştür [30]. 2000 yılında, bu hücreler iskelet sistemi hücrelerini meydana getirdiği için “iskelet kök hücreleri” terimi önerilmiştir [31], ancak bu hücreler multipotent doğasında olduğu ve potansiyel progenitör durumlarını tanımlamak için “Multipotent erişkin progenitör hücreler” terimi de öne sürülmüştür [32]. MKH’lerin *in vivo* kendini yenileyebildiğine ve farklılaşabilme yeteneğine dair doğrudan bir kanıt olmadığı için, 2006 yılında International Society for Cellular Therapy (ISCT) “Multipotent mezenkimal stromal hücre” tanımını önermiştir [33].

2.2. Mezenkimal Kök Hücre Belirteçleri ve Tanımı

ISCT minimal MKH tanımlama kriterlerini ortaya koyuncaya kadar; farklı laboratuvarların verileri; farklı izolasyon, çoğaltma ve karakterizasyon yöntemlerinden dolayı çok çeşitlilik göstermiştir [33]. Bu sorunların aşılması adına, MKH kimliğini belirlemede, deneysel çeşitliliği azaltmak ve yayınlanan verilerin şeffaflığı için araştırmacılar bir kalite kontrol basamağı önermiştir. ISCT, ayrıca MKH’leri Kİ kompartmanındaki diğer hücrelerden ayırmak için pozitif ve negatif belirteçleri belirlemiştir. Negatif belirteçler, HKH yüzeyinde ifade olan antijenlerden seçilirken; pozitif belirteçler çoğu hematopoetik hücre yüzeyinde olmayan antijenlerden seçilmiştir (Tablo 2.1).

İlk belirtilen Kİ MKH belirteçleri olarak SH2 (CD105) ve SH3 (CD73) öne sürülmüştür [5, 34]. Bu iki belirteğin yanı sıra CD90’da MKH’de ifade olmakta ve bu üç molekül (CD73, CD90, CD105) ISCT tarafından MKH’leri tanımlamada kullanılan primer belirteçler olarak belirlenmiştir [33]. ISCT, MKH’ler için negatif belirteçleri; CD11b, CD14, CD19, CD79a, CD34, CD45 ve HLA-DR olarak belirlemiştir. Ancak, ISCT bu kriterlerin çeşitli uyarılara ve koşullara göre değişebildiğini öne sürmüştür. Örneğin; HLA-DR, sitokin stimülasyonundan sonra MKH tarafından ifade edilebilmekte, ancak normal durumlarda ifade edilmemektedir [33, 35]. ISCT’ye göre CD34, MKH’ler için bir negatif belirteçtir. Ancak, bazı çalışmalar CD34 negatif durumunun hücre kültürü koşullarından kaynaklı olabileceğini ileri sürmüştür [36-38]. Çeşitli araştırmacılar; adipöz dokudan MKH izolasyonu yapıldığında hücrelerin de

CD34'ü ifade ettiğini; ancak kültür sırasında CD34 ifadesini kaybettiğini göstermiştir [39-41]. MKH'ler tarafından CD34 ifadesi; genellikle MKH tanımlanmasında kullanılan STRO-1 antikoruna ile desteklenmektedir. STRO-1; immünojen olarak CD34+ Ki kullanılarak geliştirilmiştir [42]. CD34'ün MKH'ler için negatif bir belirteç olarak kullanımıyla ilgili olan tartışma, belirteçlerin MKH kaynak dokusuna bağlı olarak değişme olasılığını arttırdığını ileri sürmektedir. Negatif HKH belirteçleri, pozitif MKH belirteçleri ve biyolojik işlevleri Tablo 2.1'de sunulmuştur.

Tablo 2.1. Negatif hematopoetik kök hücre belirteçleri, pozitif mezenkimal kök hücre belirteçleri ve biyolojik işlevleri.

Negatif HKH belirteçleri	Uzaklaştırılan hücreler
CD34 [43]	Primitif hematopoetik ve endotel hücreler [44]
CD45 [43]	Lökositler [45]
CD11b ve CD14 [43]	Monositler ve makrofajlar [46]
CD79 α ve CD19 α [47]	B hücreler [48]
HLA sınıf II [47]	Antijen sunucu hücreler ve lenfositler [33]
Pozitif MKH belirteçleri	Biyolojik rolü
CD73/5'-Nükleotidaz [43]	AMP'nin katalizasyonu ile ekstraselüler Adenozin üretimi [49]
CD90/Thy1 [50]	Yara tamiri, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri [51]
CD105/Endoglin [43]	Vasküler homeostazis, TGF β R-I ve TGF β R-II ile etkileşerek TGF- β işlevini düzenler [52]

CD105 (Endoglin), aslında Transforming growth factor beta (TGF- β) reseptörü III olarak da bilinmektedir ve MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasında TGF- β sinyalizasyonunda rol oynamaktadır [53]. CD73 bir ekto-5'-nükleotidazdır ve Ki stromal etkileşimlerde [34], MKH göçünde [54], adaptif immünitinin modülasyonunda rol oynadığı bilinmektedir [55]. CD90'nın (Thy1) hücre-hücre etkileşimlere aracılık ettiği [56, 57], monositlerin ve lökositlerin endotelial ve fibroblastlara adezyonu [58] ile CD34+ hücrelerin stromaya yapışmasında rol oynadığı

öne sürülmüştür [59]. MKH'ler aynı zamanda perisit hücre belirteçi olan CD146'yı da ifade etmektedir [60, 61].

Kültüre edilen MKH'ler, CD73, CD90, CD105 pozitifdir [43, 62]; ancak örneğin hem deri fibroblastlar [63, 64], hem de diğer *in vitro* plastik adheran özellik gösteren hücre tipi olan insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) CD105 ve CD73 pozitifdir [65, 66]. Dolayısıyla, CD105 ve CD73 ifadesi adheran kültürde MKH kimliğini kanıtlamada tek başına yeterli değildir. MKH belirteçleri olarak ayrıca STRO-1 [42] ve CD106 da [67] belirtilmiştir. Ancak bu iki belirteçin de kültür sırasında ilerleyen pasajlarda ifadesi azalmaktadır [62, 68].

2.3. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları

Kİ en önemli MKH kaynaklarından biridir ve Kİ aspirasyonlarındaki MKH'lerin CFU-F deneylerindeki sıklığı %0.001–0.01 olarak bulunmuştur [69]. Ancak Kİ dışında birçok dokudan da MKH izole edilebilmektedir. Örneğin, GK'dan ve adipöz dokudan çoğalma kapasitesi son derece yüksek ve çok sayıda MKH elde edilebilmektedir [70–72]. Hangi dokulardan MKH elde edilebildiği daha detaylı bir şekilde Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Mezenkimal kök hücre kaynakları.

MKH kaynakları	Referanslar
Adipöz doku	[73, 74]
Akciğer	[75]
Karaciğer	[76]
İnsan plasenta	[77]
Sinoviyum	[78]
Amniyon sıvısı	[79, 80]
Göbek kordon kanı	[81, 82]
Dental pulpa	[83, 84]
İskelet kası	[85]
Fetal Kemik iliği ve akciğer	[79]
Periosteum	[86]
Kıkırdak	[87]
Timus ve dalak	[88]
Dolaşım sistemi	[89]

2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünomodülatuar Etkileri

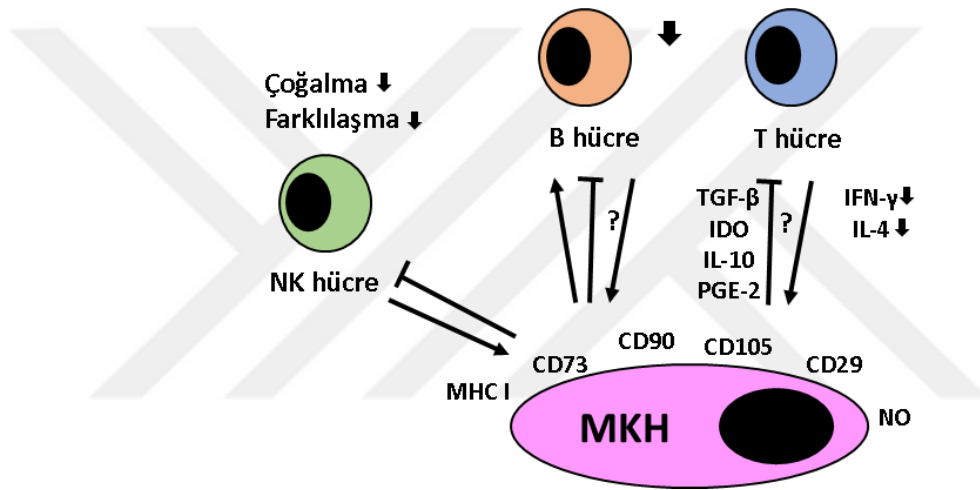
MKH'ler hücreler arası etkileşimler ve salgıladıkları biyoaktif moleküller aracılığıyla multipotent farklılaşma kapasitesi, immünomodülatuar ve anti-inflamatuar özellikleri sayesinde, hasarlı dokuların rejenerasyonu bakımından çok önemli bir klinik potansiyel taşımaktadırlar [90-93]. MKH'ler; terapötik ilaç yerine geçebilmektedir [94] ve immünomodülatuar ile rejeneratif etki göstermektedirler [95]. Ayrıca, ekzojen MKH'ler salgıladığı biyoaktif faktörler ile dokularda yer alan spesifik yerli kök hücrelerin üretimini de stimüle edebilmektedir [96, 97]. MKH'ler rejeneratif ve multipotansiyel kapasiteye sahip olduğundan, MKH terapisi ile ilgili birçok klinik çalışma devam etmektedir. Ancak, MKH'ler halen en çok immünomodülatuar özelliklerinden dolayı klinikte kullanılmaktadır. Sonrasında ise Rejeneratif Tıp kavramının gündeme gelmesiyle de birçok hastalığın ya da hasarlı doku veya organın rejenerasyonu için de hızla kullanılmaya başlanmıştır [98].

MKH'ler doğal ve edinsel bağışıklık sistemi üzerine immün düzenleyici özellikler göstermektedir. Bu özellikleri ilk *in vitro* koşullarda gösterildikten sonra; hem *in vivo* hayvan modellerinde, hem de insanlar üzerinde gösterilmiştir [96, 99, 100]. Otolog ve allojenik MKH'ler; alloantijenler, mitojenler [101], agonist olan anti-CD3 ve C28 antikoru [101-103] ile *in vitro* uyarıldığında T-lenfosit çoğalmasını baskılamaktadır. MKH'lerin sitotoksik T hücre çoğalmasını baskılayarak, sitotoksik T hücrelerinin etkilerini inhibe ettiği gösterilmiştir [104]. Bu inhibisyonun kısmen hücre-hücre etkileşim mekanizmaları ve TGF β , Hepatocyte growth factor (HGF), prostaglandin E2 (PGE2), İndoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), Nitric oxide (NO) ve Heme-oxygenase-1 (HO-1) gibi çözünür anti-proliferatif faktörler aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir [105, 106]. MKH'lerin; inflamasyonda önemli rol oynayan T hücrelerini regülatur hücre yönünde polarize ettiği gösterilmiştir [107]. *In vitro* insan MKH'ler; CD4+ T hücreleri, CD25+/FoxP3+ regülatur T hücreler yönünde farklılaştırmaktadır [108]. Bu farklılaşma, otoimmün ve inflamatuvar hastalık deneysel modellerinde de gösterilmiştir [109]. MKH'lerin matür dendritik hücrelerle inkübasyonu sonucunda; *in vitro* antijen sunan hücrelerin uyarıldığı ve indirekt olarak T hücre çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir [110, 111]. MKH'lerin; B lenfosit aktivasyonu, farklılaşması ve sitokin ifadesini baskıladığı da gösterilmiştir [112, 113].

İnsan MKH'lerinin *in vitro* koşullarda, anti-Ig antikorları, çözünür CD40 ligandı ve sitokinlerle aktive olan B hücre çoğalmasını baskıladığı, B hücrelerini G0/G1 hücre döngüsü fazında bloke ederek; B lenfosit farklılaşmasını, antikor üretimini ve kemotaktik davranışını inhibe ettiği de bilinmektedir [112]. MKH'ler, IL-2 ve IL-15 ile uyarılan dinlenme evresinde olan NK hücrelerinin çoğalmasını ciddi bir şekilde inhibe ederken, sitokinlerle uyarılmış aktif NK hücrelerinin ise proliferasyonunu kısmen etkilemektedir [114, 115]. Bunlara ek olarak; *in vitro* IL-2 ile uyarılan NK hücreleri (taze izole edilmeyen NK hücreleri) etkili olarak allojenik ve otolog MKH'leri lize edebilmektedir [115].

MKH'lerin hem *in vitro* hem *in vivo* koşullarda duruma göre pro- veya anti-inflamatuar fenotip göstererek, doğal bağışıklık sistemi komponentleri ile etkileşime girdiği ve doku homeostazı ile inflamasyonu modüle ettiği gösterilmiştir [96, 116]. *In vitro* koşullarda; MKH'ler pro-inflamatuar sitokinlere maruz bırakıldığında, MKH'ler immün süpresif fenotip özelliği kazanarak, hem anti-inflamatuar hücre yönünde polarizasyonu, hem M2 makrofaj oluşumunu uyarmaktadır. Monositlerin insan veya fare Kİ-MKH'leri ile ko-kültürü, M2 makrofaj üretimini sağlamaktadır [100, 117]. Bu süreçte, hücrelerel kontakt ve çözünür faktörler (PGE1 ve kinurenin) rol oynamaktadır [117, 118]. MKH'ler salgıladıkları CCL2, CCL3, CCL12 gibi kemokinleriyle, monositleri ve makrofajları inflamasyon bölgesine çağırarak yara iyileşmesini de uyarmaktadırlar [119]. MKH'lerin makrofaj polarizasyonu üzerine olan etkisi; MKH'lerin Treg'lerin ortaya çıkmasını desteklemesi ile ilişkilidir. MKH-polarize M2 makrofajlar, TGF- β ile beraber IL-10 ve CCL18 gibi immün süpresif sitokinler üreterek, Treg'lerin oluşumunu teşvik etmektedir [120]. M1 makrofajları tarafından üretilen pro-inflamatuar sitokinler; MKH'leri aktive edebilir ve monositlerin anti-inflamatuar M2 profili yönünde farklılaşmasını tetikleyen mediyatörleri salmasını sağlamaktadır [96, 100]. Ancak, MKH'ler sadece inhibisyon değil, alıcıda inflamatuvar ortamda bağışıklık-düzenleyici etki de göstermektedir [103]. Interferon gamma (IFN- γ) ve/veya Tumor necrosis factor- α (TNF- α) varlığı, MKH'lerin bağışıklık baskılayıcı özelliklerini etkileyebilmektedir [113]. İnflamatuar çevrede bulunan MKH'ler aktive olup bağışıklık baskılayıcı/immün süpresif fenotipi (MKH2 tipi) kazanıp yüksek düzeyde çözünür faktör (IDO, PGE2, NO, TGF- β) salgılayarak T hücrelerin çoğalmasını baskılamaktadır.

İnflamatuar uyarılar olmadığında, MKH'ler pro-inflamatuar fenotipi (MKH1 tipi) kazanarak, bölgesel salgıladıkları kemokinlerle T lenfositleri uyarabilmektedir [121, 122]. Bu iki fenotip arasındaki denge sayesinde doku homeostazı veya gerekli doku tamiri kontrol edilmektedir. MKH'lerin immüdüzenleyici mekanizmaları henüz net anlaşılmamasına rağmen, lokal nişlerden salgılanan anti-proliferatif/anti-inflamatuar parakrin mediyatörlerle (HGF, İnsulin-like growth factor, PGE2, NO, IDO vb.) ilişkili olarak MKH'lerin terapötik etki gösterdiği kanıtlanmıştır [96, 107, 108, 123]. MKH'lerin lenfoid soy kökenli bağışıklık sistemi hücreleri üzerindeki rolleri ve etki ettiği farklı hücre tipleri aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin lenfoid soy kökenli bağışıklık sistemi hücreleri üzerine olan etkisi ve immünomodülatuar işlevleri. MKH'ler CD29, CD73, CD90, CD105, MHC I (Majör doku uygunluk kompleksi) yüzey antijenleri ile karakterizedir. Oklar aktivasyon veya indüksiyonu göstermektedir. T barlar; işlev veya aktivasyonun inhibe edilmesini göstermektedir. NO; immünsüpresif mikroçevre yaratılmasında rol oynamaktadır.

2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Hematopoetik Desteği

Kİ mikroçevresi; makrofajlar, fibroblastlar, adipositler, osteoblastlar, endotelial hücreler, retiküler hücreler ve multipotent MKH olmak üzere farklı hücre komponentlerinden oluşmaktadır. Bütün bu hücreler HKH'ler ve diğer nişteki hücreler ile; kaderinler, integrinler, kemokinler ve sitokinler gibi çok sayıda moleküller

aracılığıyla etkileşime girerek, hematopoezi ve homeostazı düzenlemektedir [124, 125]. MKH'ler HKH nişinin en önemli stromal bileşenlerinden biridir: HKH homingi, kendini yenilemesi, çoğalması ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır [12]. Kİ-MKH'ler, büyüme faktörleri ve düzenleyici sitokinler salgılayarak hücre-hücre etkileşimleri uyarmakta ve böylelikle lenfo-hematopoetik sistemin gelişimi ve farklılaşma süreçlerinde önemli rol oynamaktadır; Kİ-MKH'lerin *in vitro* hematopoetik farklılaşmayı desteklediği de daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [14]. IL-1 α ile uyarılmış MKH'ler hematopoezde önemli rol oynadığı bilinen Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) ve Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) ifadelerinde bir artış göstermektedir ve anti-inflamatuvar özellik kazanmaktadır [126]. MKH'ler uzun-sürelili kültürlerde, CD34+ HKPH'lerin idamesini desteklemektedir. Deneysel hayvan modellerinde MKH'lerin salgıladıkları sitokinlerle ve faktörlerle hematopoezi ve HKH'lerin engraftmanını desteklediği gösterilmiştir [81, 127]. Hayvan modeli çalışmaları, MKH naklinin Kİ mikroçevresindeki hematopoezi destekleyici kapasiteyi arttırabildiğini göstermiştir [128]. Maymunlarla yapılan bir çalışmada; otolog CD34+ HKH'lerin MKH'ler ile birlikte nakil edilmesi sonucunda hematopoetik engraftmanın arttığı [129] ve aynı şekilde, Kİ-MKH ve CD34+ HKH'lerinin NOD/SCID fareye birlikte nakil edilmesiyle; MKH'lerin doz bağımlı olarak engraftmanı arttırdığı gösterilmiştir [130]. MKH'lerin engraftmanı arttırıcı özelliğine dayanan ve bu amaçla yapılan ilk klinik deneme; otolog HKH nakli yapılan meme kanseri hastalarında yürütülmüştür. Çeşitli hastalıklardan dolayı yapılan allojenik HKH alıcılarına, kültürde çoğaltılan MKH infüzyonunun güvenli olduğu ortaya çıkarılmıştır. Çoğu hastada kısa sürede hematopoetik engraftman gözlenmiştir [131]. Hastalara CD34+ HKH naklinden 24 saat sonra 1-2x10⁶ MKH/kg nakil edilmiş ve hızlandırılmış hematopoetik engraftman gözlenmiştir [132]. Bu sonuçlar, MKH'lerin Kİ mikroçevresinin önemli hücreleri olduğunu ve *in vitro* koşullarda HKH çoğaltılması ve *in vivo* koşullarda da engraftman için çok önemli rol oynadığını göstermektedir.

2.6. Kemik İliğinden Mezenkimal Kök Hücrelerin Prospektif İzolasyonu

Kİ-MKH'lerin prospektif izolasyonu için önerilen belirteçler çok büyük önem taşımaktadır. Kök hücrelerin doğrudan belirlenmesinde ve Kİ'nden saf ve homojen bir

popülasyonun elde edilebilmesi için özel belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. *In vivo* koşullardaki MKH'leri tanımlayacak olan belirteçler henüz tamamen ortaya çıkarılmamıştır [133], fakat insan Kİ'nden doğrudan MKH izolasyonu yapabilmek için birçok aday belirteç önerilmiştir [134-136]. Kİ-MKH'leri tanımlayan tek bir hücre yüzey belirteçi henüz bilinmemektedir; ancak doğrudan izolasyonda kullanılabilecek, tüm CFU-F potansiyelini içeren hücreleri elde etmeyi sağlayan aday belirteçlerden bazıları aşağıdaki bölümde tartışılacaktır.

2.6.1. STRO Antikorları

STRO-1; insan Kİ'nden kısmi olarak CFU-F'leri izole etmede kullanılan ilk antikordur [42]. STRO-1, MKH'lerin dışında insan eritroblastları ve sıçanlarda Kİ CD34+ hücrelerin %20'sinde de ifade edilmektedir [137]. STRO-2; yüksek derecede çoğalma ve çoklu soy farklılaşma yeteneğine sahip Kİ stromal hücrelerin büyük bir kısmını belirlemektedir [138]. STRO-3; STRO-1+ insan Kİ-MKH'leri ile immünize edilen fareden geliştirilmiştir. STRO-3 monoklonal antikorunun kültüre edilmemiş Kİ-MKH'ler için iyi bir belirteç olduğu gösterilmiştir [138]. STRO-4; immünojen olarak seçilen koyun CD106 (VCAM-1) MKH'lerinin fareye aşılması ile elde edilmiştir. STRO-4 ile izole edilen hücreler çoğunlukla plastik aderan özelliğine göre izole edilen CD29, CD44, CD166 ile reaktivite gösteren hücre popülasyonunu yansıtmaktadır. Uyarıcı kültür koşullarında STRO-4+ MKH'ler 3'lü soy farklılaşması yaparak osteoblast, adiposit ve kondrositlere farklılaşabilmektedir [139].

2.6.2. CD105

CD105 (SH2/endoglin) stromal Kİ progenitör hücreleri tarafından ifade olmaktadır [140, 141] ve MKH'lerin eldesinde kullanılmaktadır [142]. Çoğaltılan Kİ-MKH'lerinin çoğu CD95 pozitifdir ve kültür sırasında CD105 ifadesi sabit kalmaktadır. CD105 negatif hücre fraksiyonuna kıyasla daha yüksek çoğalma ve CFU-F kapasitesine sahiptir [143]. Ancak örneğin, bu belirteç de spesifik değildir ve endotelial hücre [144] ile pre-B hücrelerinde de ifade olmaktadır [145].

2.6.3. CD73

CD73 (ecto-5-nucleotidase/SH-3/SH-4) insan MKH yüzey epitoplarını tanımaktadır. Ayrıca CD73; lenfositlerde, endotelial hücrelerde, düz kas hücrelerinde, epitelyal hücreler ile fibroblastlarda da ifade olmaktadır [146, 147] ve B lenfositlerinin aktivasyonunda, Kİ'nde sinyal transdüksiyonunda ve stromal etkileşimler ile MKH'lerin farklılaşmasında rol oynamaktadır [34]. Ancak halen günümüze kadar, CD73'ün de spesifik olarak *in vivo* MKH'leri saptamasında yeterli bir belirteç olabileceğine dair henüz bir kanıt bulunmamaktadır [36]. Bu bilgiler ışığı altında; STRO, CD105 ve CD73 Kİ dışında çeşitli aderan ve non-aderan hücre tiplerinde de bulunduğundan, MKH'lerin selektif olarak seçilmesinde yeterli spesifik bir belirteç olmadığı net bir şekilde görülmektedir.

2.6.4. Stage-Specific Embriyonik Antijenler

SSEA-1; embriyonik kök hücrelerin (EKH) tanımında kullanılan intraselüler bir antijendir. Erişkin fare Kİ'nde ve MKH kültürlerindeki en primitif MKH'leri belirlemektedir. SSEA-1+ Kİ-MKH'ler, saf bir popülasyon ve *in vivo* koşullarda farklı MKH tiplerine farklılaşabilme yeteneğindedir [148]. SSEA-4; EKH'lerde kullanılan önemli bir yüzey belirteçi olup erişkin Kİ-MKH'leri de tanımlamaktadır. SSEA-4+ Kİ-MKH'ler adipositlere, osteoblastlara ve kondrositlere farklılaşabilmektedir [149]. Ancak görüldüğü üzere MKH'lerden daha çok EKH belirteçi olarak kullanılmaktadır.

2.6.5. D7-FIB

D7-FIB antikoru; işlevi henüz tam bilinmeyen fibroblast-spesifik bir moleküldür. D7-FIB+ hücreler CFU-F kapasitesi yüksek; CD45 ifadesi düşük, CD271+ ifade eden özgün bir popülasyonu temsil etmektedir ve MKH'lerin progenitör hücreleri olarak tanımlanmaktadır [141]. Bu hücre popülasyonu Kİ mononükleer hücrelerin (Kİ-MNH) %0.01'ini oluşturmaktadır. Bu antijen diğer Kİ hücrelerinde minimal ko-ifade gösterdiğinden, Kİ-MKH belirteçlerinden olan STRO-1, CD73 veya CD105'den daha uygun olduğu görülmektedir [141].

2.6.6. GD2

Neural ganglioside GD2; MKH'ler için progenitör hücrelerin belirlenmesinde kullanılan yeni bir belirteçtir. Martinez ve diğ., GD2'nin sadece taze Kİ'nden izole edilen MKH'ler tarafından ifade olmadığını, aynı zamanda *in vitro* doku kültüründe de çoğaltılan MKH'lerde ifade olduğunu, akım sitometrisi ve immünohistokimya yöntemleri ile göstermiştir [150].

2.6.7. CD146

CD146 (M-CAM, Melanoma-associated adhesion molecule); mezenkimal öncül hücresi olduğu düşünülen perisitlerin belirlenmesinde ve izolasyonunda kullanılan bir belirteçtir. Multipotent MKH'lerin, bu antikor kullanımı ile birçok farklı insan dokularından elde edildiği gösterilmiştir [151]. CD146'nın, *in vivo* koşullarda MKH aktivite özelliğini gösteren hücreleri [152] ve erişkin Kİ'nde primer MKH'lerin *in situ* lokalizasyonunu temsil ettiği düşünülmektedir [60].

2.6.8. CD271

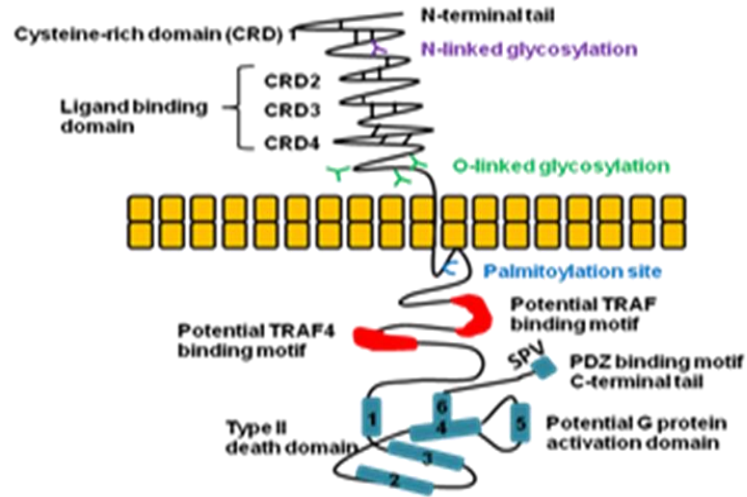
CD271 (p75 Nörotrofin reseptörü, p75NTR veya Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor, LNGFR); Kİ'nden [141, 153], adipöz dokudan [39, 154], trabeküler kemikten [62] ve amniyon sıvısından [155] MKH eldesinde kullanılmıştır. CD271 antikoru, MKH izolasyonunda CD73, CD90, CD105 gibi birçok belirteç ile birlikte kullanılmıştır ve CD271+/CD146+ MKH üzerindeki CD146 ifadenmesinin *in situ* lokalizasyondaki MKH'leri temsil ettiği [60] ve donör yaşı ile bağlantılı olduğu da gösterilmiştir [156]. İstenmeyen hücreleri uzaklaştırarak daha saf haldeki insan Kİ-MKH'lerinin zenginleştirilmesi için önerilen belirteçlerden olan özellikle; CD271 ve W8-B2/MSCA1 türler arasında da yüksek derecede korunma avantajı gösterdiği için, taze MKH'lerin izolasyonunda araştırmacılara kullanım imkanı sunmaktadır. CD271, ayrıca sığır [157] ve domuz Kİ'nden MKH izolasyonunda da kullanılmaktadır [81]. Halen CD271, insan Kİ-MKH'lerinin pürifikasyonunda kullanılan en spesifik belirteç olarak bilinmektedir. CD271, immünosüpresif ve lenfohematopoetik engraftmanı destekleyici nitelikte olan multipotent MKH'lerin seçici olarak izolasyonunda [15] ve çoğaltılmasında kullanılmak üzere önerilmektedir [133]. Ancak CD271, özellikle Kİ ve

yağ dokusundan MKH izolasyonu için önerilirken; örneğin GK gibi diğer dokulardan MKH izolasyonu için kullanılmasında başarılı olamamaktadır [133].

CD271 (LNGFR/p75NTR) genel bir nöral krest kök hücre belirteçidir [158]. CD271'in erken evre osteojenik kapasiteyi belirleyici bir yüzey belirteçi olduğu da düşünülmektedir [159] ve dental pulpa kök hücre kültürlerinde ise bu hücrelerin köklülük özelliğini koruyarak farklılaşmayı önlediği de düşünülmektedir [160]. Tek başına CD271 kullanılmasının, %100 pürifiye insan MKH'lerinin pozitif seleksiyonu için yeterli bir belirteç olmadığı da düşünülmektedir. CD271; çok düşük düzeyde de olsa eritroid soy progenitor hücrelerde ve CD45+ hematopoetik hücrelerde de ifade olmaktadır [60, 161]. CD271, hematopoetik olmayan CD45- popülasyonundan CD73+/CD105+ hücrelerin elde edilebilmesi [150] ve yüksek saflık düzeyindeki Kİ-MKH'lerin izolasyonu için önerilmiştir [161, 162]. Yakın zamanda yapılan bir çalışma; $lin^{-}/CD45^{-}/CD271^{+}/CD140a(PDGFR-\alpha)^{düşük/-}$ hücrelerinin; son derece yüksek MKH ve CFU-F aktivitesine sahip olduğunu, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda farklılaşma kapasitesine sahip olduğunu, mezenkimal soy ile ilgili ve HKH'leri destekleyici özellikte olan genleri yüksek derece ifade ettiğini, nakilde kullanılmak üzere CD34+ HKPH'lerin *ex vivo* çoğaltılmasını da çok iyi desteklediğini göstermiştir [163]. Bu bakımdan pozitif seleksiyon belirteçi olarak CD271 belirteçinin yanında; CD140a'nın da negatif seleksiyon belirteçi olarak kullanılması ile *in vivo* koşullardaki daha saf gerçek MKH'lerin elde edilmesinin mümkün olabildiği gösterilmiştir.

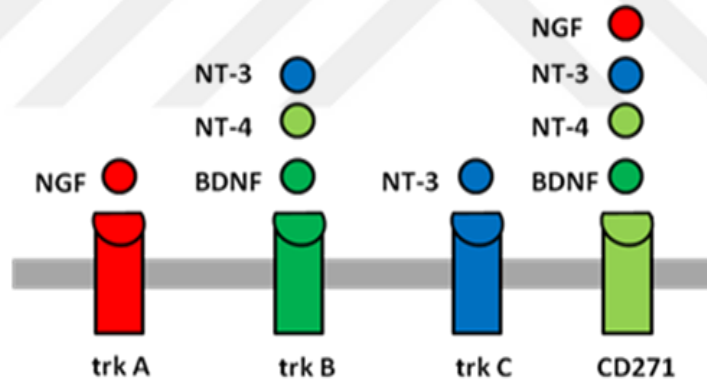
2.7. CD271 Geni ve Reseptörü

CD271; transmembran proteinlerden olan Tumor necrosis factor receptor (TNFR) süperailisinin 16. üyesidir. TNFR ailesi üyeleri nörotrofinlere bağlanan ekstraselüler altünitelerinde benzer bir homoloji göstermektedir [164, 165] ve sitoplazmik ölüm altünitesi bulunmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. CD271 reseptörünün yapısı [166].

CD271, diğer TNFR reseptörlerden başka; pro-nörotrofinlere ve matür nörotrofinlere bağlanabilmekte ve böylelikle sinir sisteminde yer alan hücrelerin büyümesini, farklılaşmasını veya ölümünü etkileyebilmektedir [167] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Nörotrofin ailesinin üyeleri ve reseptörleri. trkA: Tirozinkinaz A; trkB: Tirozinkinaz B; trkC: Tirozinkinaz C; NGF: Nerve Growth Factor; BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor; NT3: Nörotrofin 3; ve NTF4/5: Nörotrofin 4/5.

CD271 geni, insan kromozomunun 17q12-17q22 bölgesinde yer almaktadır [168]. CD271 reseptörü veya nörotrofin reseptörü yokluğu ise; genel olarak sinir sistemi ile ilgili fenotipik bozukluklara yol açmaktadır. CD271 reseptörü olmayan farelerde; perinatal sensory ve sempatik sinirlerde kayıp gözlenmiştir [169], fare

doğduktan 1 ay sonra lethal fenotip gözlenmiştir. Neonatal değil, erişkin farede; bunların dışında dalakta apoptoz ve iskelet kaslarının da distrofiye uğradığı görülmüştür [170].

P75NTR knockout-allellerini taşıyan fare modelinde; P75^{NTR-KO-KO} farede; nörolojik defektler gözlenirken, wildtype'a göre fare vücut büyüklüğünün de daha az olduğu görülmüştür [171]. NGFR^{-/-} farede; duyu innervasyon azalmıştır ve periferik duyu sinir sisteminde hasarlar gözlenmiştir [172].

p75-NTR-deficient fare'de; merkezi sinir sistemi (MSS) çok önemli ölçüde azalmış hippocampal nöroenez ve küçük granüler hücre tabakası ve dentate gyrus ile yeni bölünen hücrelerin ölümünde artış saptanmıştır [173]. Ayrıca davranışlarında spesifik farklılıklar saptanmıştır [174] ve MSS'de büyük aksonal hasarlar gözlenmiştir.

p75NTR delesyonu; dorsal root ganglia'da sensory sinirlerinin (motor sinirlerin değil) büyük oranda kaybına ve bazal önbeyin hipokampus ve korteksinde kolinerjik sinirlerde artışa yol açmaktadır [173]. Başka bir çalışmaya göre; hipokampus ve kortekste kolinerjik bazal forebrain projeksiyonlarında bir azalma ve trigeminal, sempatik ve dorsal root ganglia'da büyük oranda sinir hücre kaybı meydana gelmektedir [175]. Diğer bir çalışmada ise; p75NTR yokluğunun; bazal önbeyin kolinerjik nöron büyüklüğüne ve kolinasetiltransferaz aktivitesinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir [176].

2.7.1. CD271 Antijeninin Organizmadaki Rolü

Nerve growth factor (NGF) ve nerve growth factor reseptörü (NGFR) etkileşimleri, sempatik ve duyu sinirlerinin sağkalımında ve idamesinde önemli rol oynamaktadır [177]. CD271'in ligandları; NGF, BDNF, NT3 ve NT4/5'tir (Şekil 2.4). CD271, hem hücre sağkalımını hem de hücre ölümünü uyaramaktadır. Bu hücre kaderinin belirlenmesi, CD271'in farklı reseptör partnerleriyle etkileşime girmesine bağlı olarak değişmektedir [167]. Tirozin kinaz nörotrofin reseptörü ifadenmesinin eksikliğinde CD271; Jun N-terminal kinaz aktivasyonu, sitokrom C salınımı ve Kaspaz 3, 6, 9 aktivasyonu ile apoptoz ve hücre ölümünü uyaramaktadır [164]. Apoptozun aksine, NGF bağlanması durumunda TrkA downstream sinyali arttırılarak hücre

proliferasyonu uyarılmaktadır [167]. Bu nedenle, CD271'in etkileri; çapraz-bağlama yeteneğine ve ko-reseptörlerinin koordinasyonuna bağlı olarak değişmektedir [167].

2.7.2. CD271 Antijeninin Dokulardaki Dağılımı

CD271 hem nöral hem de nöral olmayan dokularda ifade olmaktadır. NGF; duyu ve sempatik nöronların kültür koşullarında hem sağkalımını hem de farklılaşmasını düzenlenmekte ve nöral gelişimde de rol oynamaktadır. CD271'in normal gelişim sırasında nöral dokularda ve doğumdan sonra periferik sinirlerde, otonom ganglia da ifade edildiği gösterilmiştir [166]. Periferik sempatik ve duyu nöronların altpopülasyonları değişik düzeyde reseptör ifadesi göstermektedir [178]. Sinir sisteminin dışında, CD271 insan Ki stromasında [179, 180], Ki'nde [15, 134, 181], trabeküler kemik boşluğunda [62], adipöz dokuda [39] ve insan PL'sinde [155] ifade olmaktadır. CD271 ayrıca, miyoblastlarda ve gelişen mezenkimal dokularda [180, 182], foliküllerde, limbbud fibroblastlarda, böbrekte, akciğer ve testislerde tespit edilmiştir [183].) Bunun dışında CD271 ifadeleri; endotelial hücrelerde, perivasküler fibroblastlarda, dental pulpa hücrelerinde, prostatta, epitelyal hücrelerde ve B hücrelerde bulunmuştur [178, 182]. CD271 ifadesi; malign tümörlerde normal doku dağılımı ile paraleldir [182]; ancak CD271'in bu hücreleri nasıl etkilediği henüz bilinmemektedir. Farklı dokulardaki CD271 ifadeleri Tablo 2.3'te özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Farklı dokularda CD271 ifadeleri [8].

Hücre Kaynağı	CD271
Kemik iliği	Pozitif
Adipöz doku	Pozitif
Göbek kordon kanı	Negatif
Göbek kordonu	Düşük/Negatif
Plasenta	Pozitif/Negatif
Trabeküler kemik boşluğu	Pozitif
Dermis	Pozitif
Periferik kan	Negatif
Dental pulp	Pozitif
Sinoviyal membran	Negatif

2.7.3. CD271+ Kök Hücre Özellikleri ve *In Vivo* Lokalizasyonu

CD271 antikorunu kullanılarak manyetik boncuk yöntemi ile doğrudan saflaştırılmış, homojen bir MKH popülasyonu izole edilebilmektedir [153]. Elde edilen CD271+ fraksiyonu yüksek CFU-F kapasitesine ve osteoblast ile adiposit farklılaşma potansiyeline sahiptir. CD271+ hücrelerin plastik aderan kapasitesi kullanılarak izole edilmiş MKH'lere kıyasla; daha yüksek çoğalma kapasiteleri ve farklılaşma yetenekleri vardır. CD271⁺/CD45^{-/low} hücrelerin; *in vivo* MKH'leri temsil ettiğine dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır [60] ve CD73, CD90, CD105, CD146 dahil birçok MKH belirteçlerini de ifade etmektedir [62]. CD271+ Kİ-MKH'leri; HKH'ler ile birlikte verildiğinde immün-yeniden yapılanma ve lenfohematopoezi destekleyici etkilerinin daha fazla olduğu gösterilmiştir [15].

CD271 stromal hücreler, fetal Kİ'nde hematopoetik aktivite başlamadan önce damarların adventitiasından köken almakta olup Kİ boşluğunda yayılı halde bulunmaktadır [179]. Anti-CD271 antikorları kullanılarak, Kİ stromal kompartmanında bulunan MKH benzeri hücreler tespit edilmiştir. İki farklı anti-NGF reseptör antikorları olan Me20.4 ve Me821, insan Kİ stromal hücrelerini boyamaktadır. Bu şekilde, CD271+ hücrelerin uzun dendritik uzantıları ile oval nükleusa ve az sitoplazmaya sahip

olduğu, sinüs epitelyal hücrelerinin abluminal kenarında yer alarak hematopoetik hücrelerle sıkı bir etkileşim halinde bulunduğu ve hematopoetik hücreler için bir destek yapısı oluşturduğu gösterilmiştir. Elektron mikroskopi ile bu hücreler incelendiğinde; mitokondri, endoplazmik retikulum ve yoğun cisimler içeren, az sitoplazmaya sahip, uzun uzantıları olan fibroblast-benzeri hücreler olduğu açığa çıkarılmıştır. CD271+ hücreler; alkalın fosfataz, retikülin, kollajen, vimentin, TE-7 ve CD13 pozitif ve endotelyal (vWF, CD34, Pal-E), nöral (CD56, nörofilament) ve lökosit belirteçleri (CD45, CD68) bakımından negatiftir [179].

Yine başka bir çalışmada da immün-elektron mikroskopi kullanılarak insan Kİ CD271+ hücrelerinin yıldız şeklinde uzun ve kıvrık dendritik uzantılara sahip olduğu ve dendritik uzantılar yaparak hematopoetik hücrelerin işlevini düzenlediği kompleks bir lakuna sistemi ilişkisi kurdukları gösterilmiştir [180]. Diğer CD271+ hücreler, uzunlamasına iğsi iplik hücre morfolojisi göstermektedir. CD271+ dendritler birbiriyle ve hematopoetik hücrelerle yakın kontakt halindedir [60] ve matür plazma hücreleri, adipositlerin çevresinde ve Kİ sinuzoidlerinde de gözlenmiştir. CD271'in Kİ stromasındaki dağılımı, NGF'nin erken hematopoezde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. İnsan Kİ'nde kapiller endotelyum ve büyük damarların etrafında yer alan perivasküler hücrelerin CD271+/CD146+ hücreler olduğu; trabeküler kemiğin yüzeyine yakın bölgelerdeki kemiği kaplayan, yani endosteal nişteki hücrelerin ise öncelikli olarak tek başına özellikle CD271'i ifade ettiği saptanmıştır [60]. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada da; kalça kemiği tepesindeki (iliac crest'teki) Kİ'ne kıyasla, uzun kemiklerdeki yağlı Kİ'nde daha fazla sayıda MKH ile CD271+ KH'lerin bulunduğu ve insan femurunun intrameduller boşluğunun bir MKH deposu olduğu tespit edilmiştir [184].

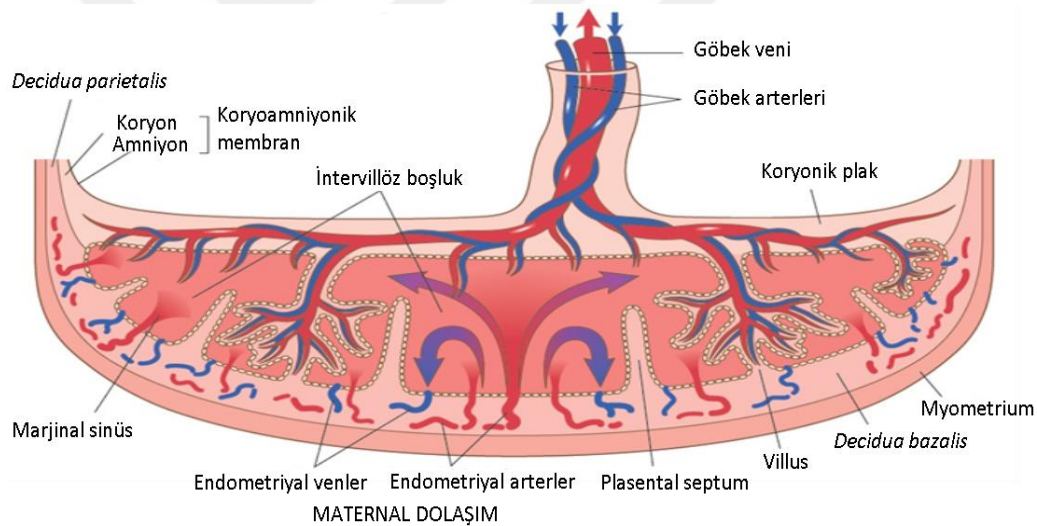
2.8. Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücreleri

Kİ aspirasyonu ile MKH eldesi kolay olsa da, invazif ve anestezi gereken bir yöntemdir ve etik sorunlar taşımaktadır. Ayrıca yaşın artmasına bağlı olarak Kİ-MKH sayısında, çoğalmasında ve farklılaşma potansiyelinde farklılıklar olduğu da gösterilmiştir [156, 185]. Bunun yanı sıra, kişiler arası çoğalma etkinliği, farklılaşma potansiyeli ve *in vitro* yaşam süresinde de farklılıklar görülmektedir. Son yıllarda

yapılan çalışmalar PL ve GK'nın, MKH'ler için önemli bir kaynak olduğunu göstermiştir. Fetal kaynaklı GK ve PL, non-invasif olarak elde edilebilen KI'ne alternatif bir MKH kaynağı olarak kabul edilmektedir. Ayrıca etik sorunlar da teşkil etmemektedir [186]. İlk kez 2007 yılında, Soncini ve diğ. amniyondan ve koryondan MKH izolasyonu yapmıştır [155].

2.8.1. Plasenta

PL; fetüsü saran amniyon, allantois koryon, koryon membranı ve parankim villusları ile GK'dan oluşmaktadır (Şekil 2.5) ve hem fetal hem de maternal dokuları içermektedir [187]. Koryon, ilk basit avasküler epitelyum (trofoblast) olarak gelişmektedir. Amniyon, koryon gibi avasküler, ektodermden köken almış bir membrandır ve embriyoyu gelişim sırasında çevrelemektedir [188].



Şekil 2.5. Plasentanın yapısı [189].

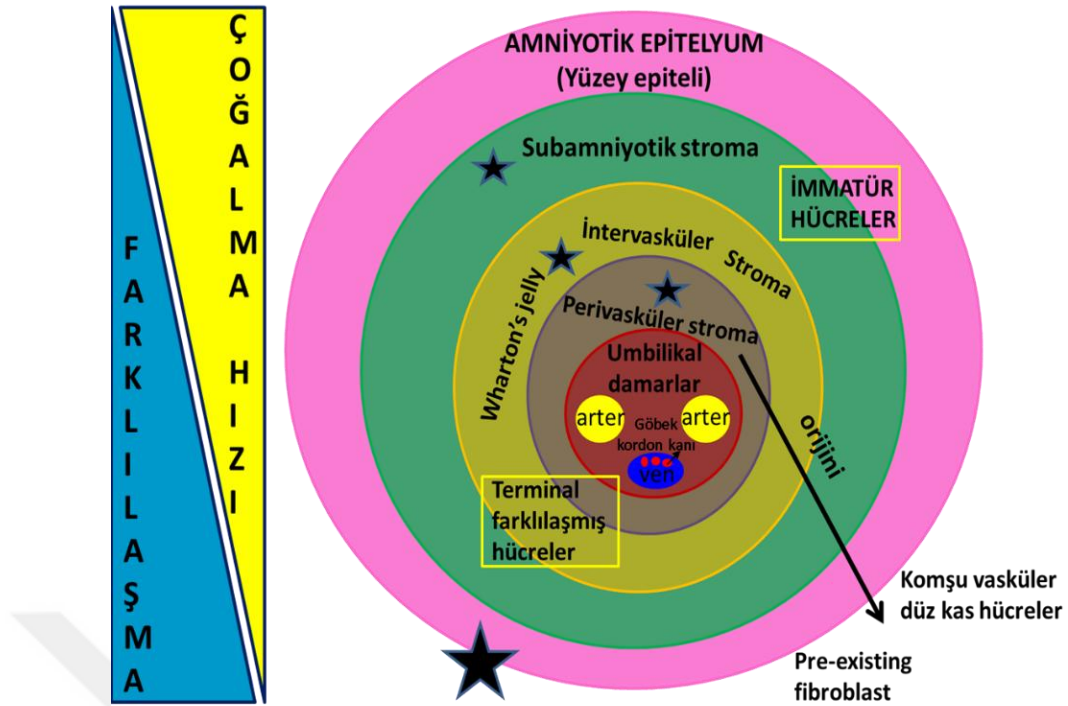
Son zamanlarda PL'nin çok önemli bir MKH ve HKH kaynağı olduğu gösterilmiştir [190]. Koryonik membrandan izole edilen hücreler sadece MKH özelliği göstermektedir [191]. PL'nin en büyük kısmı parankim villuslarından oluşmaktadır. Villuslar, PL parankiminde bebek ve anne arasındaki besinler ve atıkların fonksiyonel transfer ünitesidir [192]. Desidua kısmı maternal endometriyumdaki köken almaktadır. PL'nin fetal kısmı; plasental disk, amniyotik, koryonik membranlar ve kordondan oluşmaktadır [193]. PL'den kök hücre eldesi; non-invasif bir yöntemdir ve

çok sayıda hücre elde edilebilmektedir [194]. İnsan PL dokularından enzimatik parçalama yöntemleri ile MKH elde edilmektedir. Elde edilen hücreler uygun kültür koşullarında çoğaltılabilmekte ve endotel veya nörolojik hücrelere de farklılaşabilmektedir [77]. PL dokusu kaynaklı mezenkimal hücreler işlevsel özellikleri bakımından Kİ-MKH'lere benzer karakteristik göstermektedir. Ayrıca, PL stromal hücreler *in vitro* CD34+ KK HKH'lerini desteklemek üzere "besleyici tabaka" olarak kullanıldığında, Kİ-MKH'lere kıyasla, daha iyi sonuç verebildiği de gösterilmiştir [195].

2.8.2. Göbek Kordonu

GK, iki umbilikal arter, bir ven ve bu damarları çevreleyen spesifik bir embriyonik mukoz dokudan oluşan Wharton's jelly (WJ)'i içermektedir [196] (Şekil 2.6). WJ, myofibroblast benzeri stromal hücrelerden, kollajen fibrillerden ve proteoglikandan oluşan mukoz veya jelatinimsi bir bağ dokusu yapısına sahiptir [197]. GK-MKH'ler bütün GK'lerden başarılı bir şekilde kolaylıkla izole edilmekte ve kültür koşullarında çoğaltılmaktadır [198]. GK-MKH'lerin, immün düzenleyici potansiyelinin yüksek olduğu ilk kez 2008 yılında ileriye sürülmüştür [199].

GK stromal kök hücreleri fibroblast-benzeri hücrelerdir [200]. Kültür koşullarında GK kök hücreleri immünmodülatuar özellikler göstermektedir ve Kİ-MKH'lerle benzer yüzey belirteçlerine sahiptir [201]: GK-MKH'ler CD105, CD73, CD44, CD90, CD71, STRO-1, CD106, CD166, ICAM-1 ve CD29'u ifade etmektedirler. GK-MKH'ler; CD45, CD34, CD14, CD11 gibi hematopoetik belirteçleri; CD80, CD86, CD40 gibi ko-stimülatuar molekülleri ve CD31, CD18, CD56 gibi adezyon moleküllerini ifade etmemektedir [201].



Şekil 2.6. Göbek kordonunun yapısı. Yıldızlar, kök hücrelerin bulunduğu yerleri temsil etmektedir.

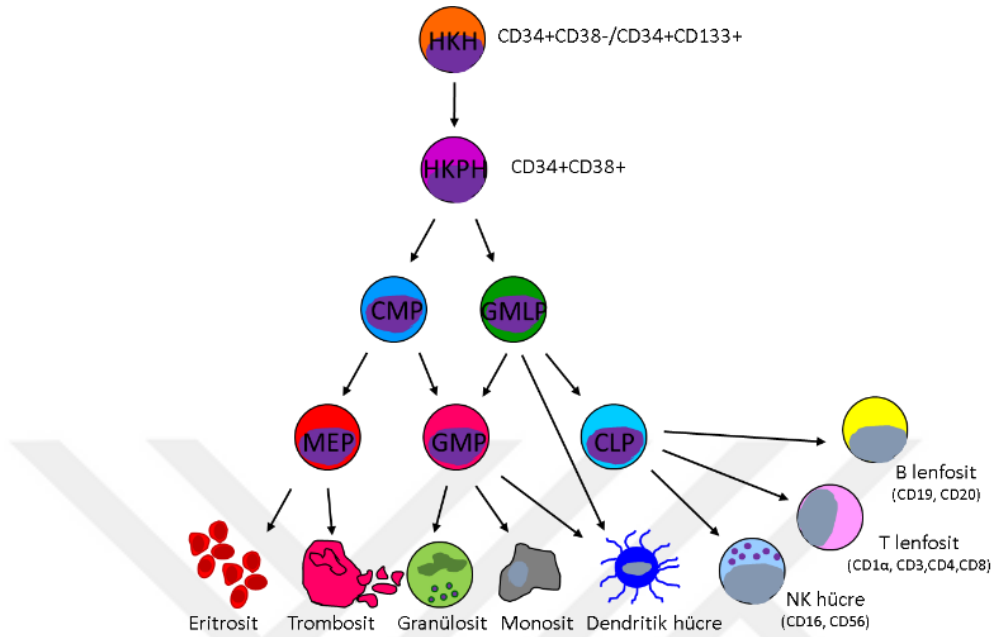
2.9. Hematopoetik Kök Hücreler

2.9.1. Hematopoez

Hematopoez, hayat boyunca organizmanın ihtiyaç duyduğu olgun kan ve bağışıklık sistemi hücrelerinin yapılma sürecine denmektedir. Yaşlanan ve hasarlı kan hücrelerini dengelemek amacıyla günde yaklaşık 10^{12} kan hücresi yapılmaktadır [202]. Herhangi bir enfeksiyon, yabancı antijen, hipoksi gibi durumlarda vücudun ihtiyaçlarını karşılamak için kan hücre yapımı artmaktadır. Bu sürekli artan ihtiyacı, dinamik olarak erişkin Ki'nde az sayıda bulunan ($1 \text{ HKH}/10^4 \text{ Ki}$ hücresi) Hematopoetik Kök hücreler (HKH), çeşitli düzenleyici mekanizmalarla karşılamaktadır [203]. HKH'ler, bütün yaşam süresince hem çoğalma hem farklılaşma hem de kendi havuzlarının yenilenmesinden sorumlu hücrelerdir [204].

Hematopoez aşamaları, HKH belirteçleri ve HKH'lerin olgun kan hücrelerine soy farklılaşması aşağıdaki şekilde sunulmuştur (Şekil 2.7). HKH'ler ile HKPH'ler Ki'nde bulunan, tüm yaşam boyunca kan (eritrosit, platelet) ve bağışıklık sistemi hücrelerinin

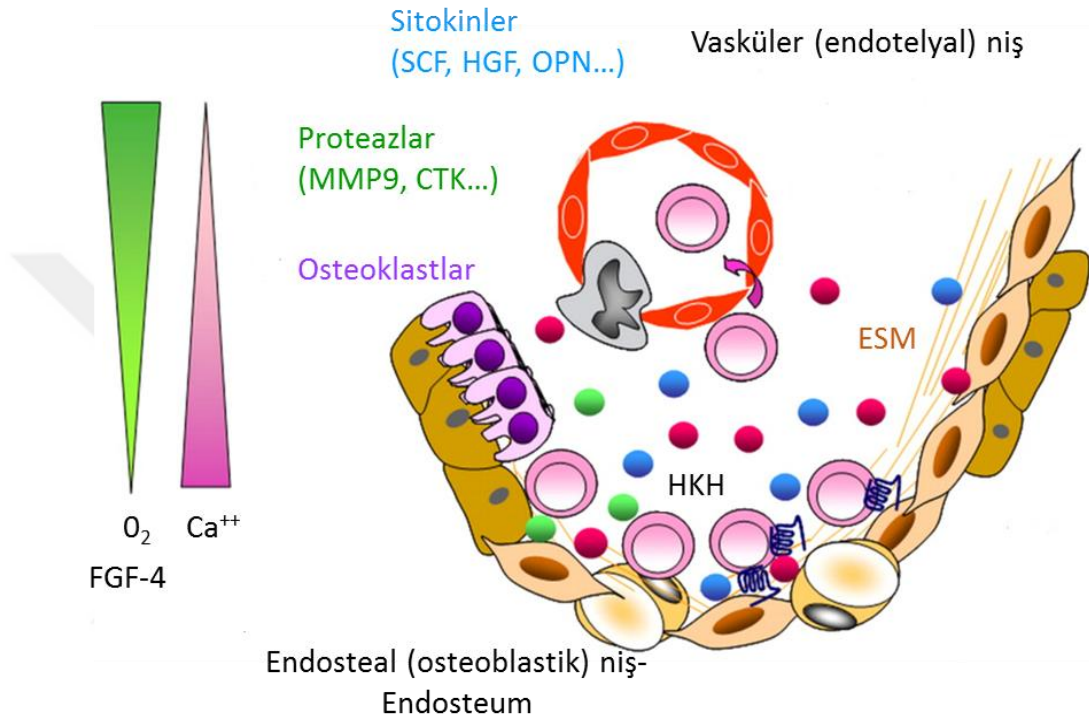
(granülosit, makrofaj, dendritik hücre, T-, B- ve NK hücre) yapımından sorumlu olan kendini yenileme özelliğine sahip erişkin kök hücrelerdir [205].



Şekil 2.7. Hematopoetik hiyerarşi modeli. HKH: Hematopoetik Kök Hücre (CD34+CD38- veya CD34+CD133+), HKPH: Hematopoetik Kök ve Progenitor Hücre, CMP: Common (ortak) Miyeloid Progenitor hücre, CLP: Common (ortak) Lenfoid Progenitor hücre. GMLP: Granülosit-makrofaj-lenfosit progenitor; MEP: Megakaryosit-eritrosit progenitor, GMP: Granülosit-makrofaj progenitor.

HKH ve HKPH'ler, Kİ'nde özelleşmiş niş bölgelerinde bulunmaktadır. Nişten gelen sinyaller, HKH'nın kendini yenilemesinde ve farklılaşmasını düzenlemede büyük rol oynamaktadır [204, 206, 207]. HKH'ler Kİ'nde özelleşmiş nişler olan ya endosteal nişte ya da vasküler nişte bulunmaktadır [208]. HKH niş konsepti ise ilk olarak 1978 yılında Schofield tarafından öne sürülmüştür [209]. Nişte bulunan hücreler ve çeşitli komponentler Şekil 2.8 üzerinde detaylıca açıklanmıştır [210]. HKH'ler nişle çok yakın ilişki içerisinde bulunarak hematopoezi düzenlenmektedir. Niş hücreleri çok sayıda sitokin ve büyüme faktörleri (SCF, TPO, G-CSF, CXCL12, Osteopontin, Ang-1, TGFβ) salgılayarak HKH'lerin kendini yenilemesini ve farklılaşmasını düzenlemektedir [208].

HKH ve HKPH'ler düzenli olarak, Kİ'nden çıkıp dolaşıma katılmakta (egresyon) ve sonrasında tekrar hematopoetik dokulara dönüş yapmaktadır (homing) [206]. HKH'lerin mobilizasyonu, dolaşıma girip çıkması, kemokin CXCL12 (SDF-1) ve reseptörü CXCR4 ile düzenlenmektedir. CXCL12/SDF-1 Kİ stromal hücrelerinden salgılanmaktadır ve HKH'lerin Kİ'ne homing'ini sağlamaktadır [211].



Şekil 2.8. Hematopoetik kök hücre nişi. Kİ'nde, HKH'ler özelleşmiş endosteal niş ve vasküler nişlerde bulunmaktadır. Bu nişler; 1) stromal hücrelerden köken alan fibroblast, osteoblast, adipositik hücreler, 2) hematopoetik kökenli hücreler ve 3) endotelial hücrelerden oluşmaktadır. Farklı niş bölgelerinde adezyon moleküllü etkileşimleri, ekstraselüler matriks (ESM) ve çeşitli çevresel komponentler (Ca^{++} , O_2 , proteazlar) ile sitokin ve kemokinler bulunmaktadır [210].

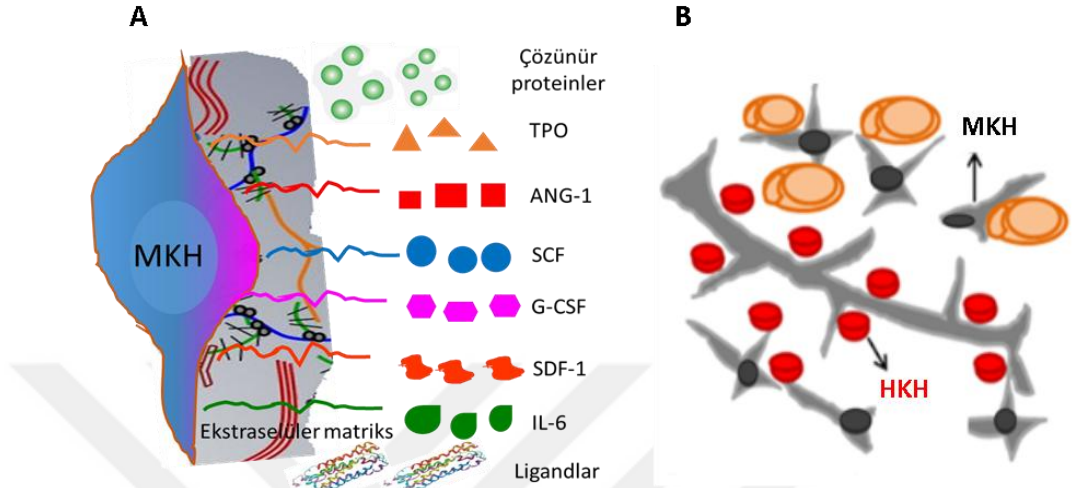
2.9.2. *Ex Vivo* Hematopoetik Kök Hücre Çoğaltılması

HKH naklinin en önemli sınırlayıcı faktörü HKH'lerin yeterli sayıda olmamasıdır. KK naklinde bazı durumlarda çift KK kullanılabilir. Ancak, periferik kan veya Kİ naklinde bu yapılamamaktadır. Son 35-40 yıldır HKH'leri *ex vivo* çoğaltabilmek için çok sayıda araştırma yapılmıştır [212]. *Ex vivo* kültürün en büyük sorunu ise, kültür sırasında hücrelerin kendini-yenileme kapasitesini zaman içerisinde kaybetmesidir [213]. Bu sebeple, HKH'lerin kendini yenileme kapasitesini koruması ve kaliteli hücre çoğaltılmasının yapılması en temel hedeflerden biri haline gelmiştir [214]. Bu amaçla, birçok çoğaltma yöntemleri (ko-kültürler, 3D sistemler, küçük moleküller vb.) geliştirilmiştir [215]. Örneğin; insan HKH'lerin *ex vivo* çoğaltılmasını desteklemek için birçok farklı sitokinler kullanılmaktadır [216]. Bunların en önemlileri; Stem cell factor (SCF), Fms-related tyrosine kinase 3 ligand (Flt3-L) ve Thrombopoietin'dir (TPO) [217]. Ancak bu sitokin kombinasyonlarıyla, çoğunlukla en fazla 2-4 kat HKH çoğaltılması yapılabilmektedir ve kademeli olarak HKH potansiyelinde ve rekonstitüsyon kapasitesinde bir kayıp da gözlenmektedir [218, 219]. Ayrıca, SCF, TPO, Flt3-L insan KK HKH'lerini çoğaltmada tek başlarına yeterli değildir. Yapılan çalışmalar sonucunda, serum içermeyen kültür koşullarına bu sitokinlere ek olarak Angiopoietin-like 5 (ANGPTL5) veya IGF-binding protein 2 hormonlarının (IGF-BP2) eklenmesi sonucunda, hücre çoğalmasında yaklaşık 11 kat daha fazla artış tespit edilmiştir [220, 221]. Bu yüksek düzeydeki artış HKH'lerin klinik uygulamaları açısından önem taşımaktadır.

2.9.3. Mezenkimal Kök Hücre/Hematopoetik Kök Hücre Ko-Kültürleri

In vitro MKH-HKH ko-kültür deneylerindeki amaç; HKH'lerin *in vivo* koşullarda bulunduğu hematopoetik nişe benzeyen bir ortam yaratılmaya çalışılmasıdır. Bu amaçla, KK-HKH'lerin *ex vivo* çoğaltılmasında; kültür besiyerine ilave edilen sitokinlerin yanında MKH'lerden oluşturulan bir besleyici tabaka kullanılmaktadır [222]. KK-HKH'lerin MKH besleyici tabaka üzerinde çoğaltılması ile HKH'lerin çoğalması artmakta ve apoptoz oranı azalmaktadır. KK-HKH'leri; SCF, bFGF, LIF ve Flt3-L ile zenginleştirilmiş serumsuz besiyerinde; stroma hücrelerinin varlığında HKH çoğalmasının daha iyi olduğu ve hücrelerin daha az farklılaştığı gösterilmiştir [223].

Ko-kültür sırasında görülen “cobblestone” bölgeler; MKH’lerin sadece basit bir besleyici tabaka olarak davranmadığını göstermektedir [224]. MKH’ler hem salgıladıkları sitokinlerle hem de direkt MKH-HKH hücre etkileşimi ile HKH’leri etkilemektedir [225] (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Mezenkimal kök hücre/hematopoetik kök hücre ko-kültürlerindeki mezenkimal kök hücrelerin etkisi. A: MKH’ler salgıladıkları sitokinler, çözünür proteinler ve ligandlarla HKH’leri etkilemektedir. B: MKH’ler HKH’ler ile hücre etkileşiminde bulunmakta ve HKH için bir matris yapısı da sağlamaktadır.

Kİ-MKH’lerin *in vitro* hematopoezi destekleme yeteneğine sahip olduğu, HKH’ler için iyi bir platform sağladığı daha önceki çalışmalarda öne sürülmüştür. NOD/SCID farelerde yeniden kan ve bağışıklık sistemi yapımı deneylerinde, HKH’ler ile MKH’lerin birlikte nakil edilmesi sonucunda hematopoez ve rekonstitüsyonun hızlanabildiği gösterilmiştir [226]. Sadece Kİ-MKH değil, PL ve GK-MKH’ler de KK-HKH çoğalmasını desteklemekte ve besleyici tabaka olarak kullanılmaktadır [195, 227]. Ancak, en uygun sitokin kombinasyonları ve optimal hücre kültür koşulları için halen optimizasyon çalışmaları devam etmektedir. Aşağıda, farklı şekillerde *ex vivo* çoğaltılan KK’lerin klinikte kullanımına dair tablo özet halinde verilmiştir (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. *Ex vivo* çoğaltılan kordon kanı klinik denemeleri [228].

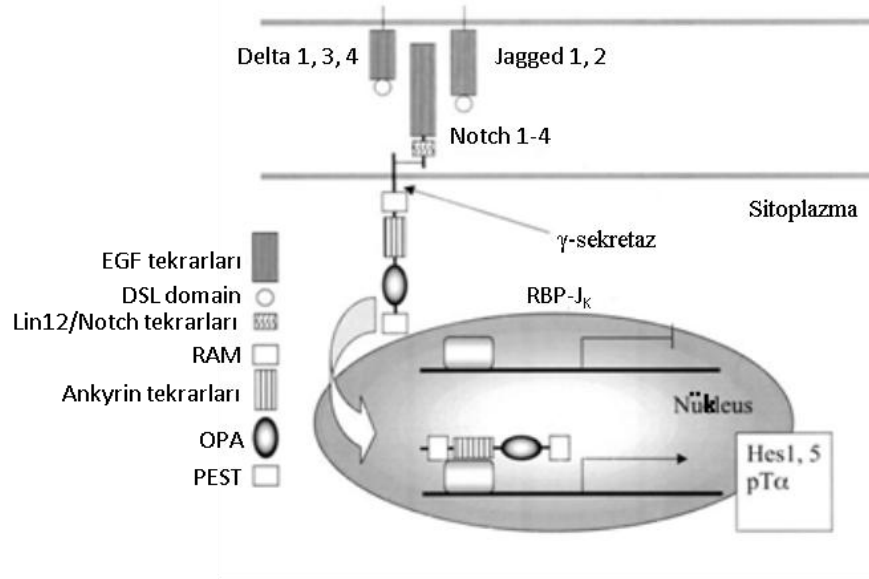
Kültür tipi	n	Kültür günü	TNC kat çoğalması	CD34+ kat çoğalması	Sitokinler
Sıvı kültür	37	10	56	4	SCF, TPO, G-CSF
	35	14	23	2,3	SCF, TPO, G-CSF
	10	21	219	6	SCF, FL, IL-6, TPO, G-CSF
	5	16	660	160	Notch ligand Delta1, SCF, FL, IL-6, TPO, IL-3
Stromal ko-kültür	6	14	12	12	SCF, TPO, G-CSF
Biyo-reaktör	27	12	2,4	0,5	PIXY321, FL, EPO
	2	12	2,2	1,6	PIXY321, FL, EPO

TNC: Total nucleated cells

2.10. Notch Reseptörleri, Ligandları ve Sinyalizasyonu

Notch; çok geniş yelpazede hücre kaderi kararında rol oynayan tek-geçişli bir transmembran reseptör proteindir. Memelilerde 4 adet Notch reseptörü (Notch1-4) ve beş adet Notch ligandları (Jagged-1, Jagged-2, Delta-1, Delta-3, Delta-4) tanımlanmıştır (Şekil 2.10) [229]. Notch reseptörüne ait her bir domeyn, farklı Notch sinyal transdüksiyonunda rol oynamaktadır [230, 231].

Notch reseptörleri ligandları tarafından uyarıldığında, intraselüler domeyn'i gamma-sekretaz tarafından proteolitik yıkıma uğramakta ve Notch intraselüler domeyn'i (NICD) nükleusa transloke olmaktadır [230]. NICD, nükleusta RBP-Jk'ye (memelilerde CBF-1 ve CSL olarak da bilinir) bağlanmakta ve transkripsiyonel bir düzenleyici olarak davranıp [22]; Hes1, Hes5, pTa genlerini etkilemektedir [231, 232].



Şekil 2.10. Notch sinyalizasyonu. Notch reseptörleri, ligandları tarafından uyarılmakta; Notch-IC γ -sekretaz tarafından yıkıma uğratılmakta ve nükleusa geçmektedir. Notch-IC RBP-J κ bağlanarak, transkripsiyonel represörden aktivatöre dönüştürmekte ve ilgili genlerin ifadesi düzenlenmektedir [229].

Notch reseptör zincirleri hücre yüzeyinde heterodimerik reseptörler oluşturmadan önce; Golgi'de furin-benzeri proteazlar tarafından yıkıma uğramaktadırlar. Bu reseptörler; ekstraselüler alt birim (NEC) ile değişken sayıda epithelial growth factor (EGF) benzeri tekrarlardan, takibinde LIN domeynlerinden oluşmaktadır. Transmembran ve sitoplazmik (NTM) alt ünitesi; sitoplazmik RAM domeyni, devamında ankirine tekrarlarından, 2 adet nükleer lokalizasyon sinyalinden ve sadece Notch1 ile Notch2'de olan transaktivasyon domeyninden ve protein stabilizasyonunda rol oynayan PEST dizisinden oluşmaktadır (Şekil 2.10). Notch 1,2 ve 3; DLL1 ve JAG1/2 tarafından aktive edilebilmektedir [233].

2.10.1. Hematopoezde Notch Sinyalizasyonunun Önemi

Notch; Kİ homeostazını sağlayan HKH/MKH etkileşimlerinde rol oynayan sinyal yollarından birisidir. MKH ve osteoblastlar hem Notch reseptörlerini hem de Notch ligandlarını ifade etmektedirler [234]. MKH'ler ve osteoblastlar, HKH'lerdeki Notch sinyalizasyonu uyararak HKH'lerin kendini yenileme kapasitesini artırmakta [16, 17] ve Kİ homeostazında önemli rol oynamaktadır. Kİ-MKH'ler bazal durumda; Notch-1, 2, 3, 4 [235] ve Jag-1, DLL-3, DLL-4 ifade etmektedir [234]. MKH'lerdeki Notch ifadesi dinamiktir ve diğer hücreler ile ko-kültür sonrası değişiklik gösterebilmektedir. Jag-1, Jag-2 ve DLL1, Notch-1-4'e; DLL3, Notch-1'e ve DLL4 ise Notch-1 ile Notch-4'e bağlanmaktadır [234]. Jag2; timüs stromal ve timüs hücrelerinde, Jag1 ise sadece timüs stromal hücrelerinde ifade olmaktadır [236].

Sitokinlerin yanı sıra, Notch sinyal yolları HKH nişinde, HKH kaderinin belirlenmesinde rol oynadığı için; bu yolların aktivasyonu ile de HKH havuzunun çoğalmasını sağlanmaktadır. Notch-1 over-ifadelenmesi HKH'nın kendini yenileme kapasitesini arttırmaktadır [20]. Delaney ve diğ., immobilize Notch ligandı Delta1 ile SCF, Flt3-L, IL-6, TPO ve IL-3 kullanarak, insan KK HKH ve HKPH'leri çoğaltabildiğini, çoğaltılan CD34+ hücreler NOD/SCID fareye nakil edildiğinde immünrekonstitüsyon sağlandığını ve nakil sonrası nötrofil gerikazınımı ve engraftmanın çok kısa sürede gerçekleştiğini göstermiştir [17]. Delta-1 ise, düşük dozda uygulandığında KK HKH'lerinin çoğalmasını sağlamaktadır, yüksek dozda ise apoptozu uyarmaktadır [237]. Notch ligandlarından Jag-1'in de *in vivo* HKH sayısını arttırdığı gösterilmiştir [238]. Ayrıca, Kİ sinüzoidal endotelial hücrelerin salgıladığı Jag-1'in, HKH'lerin kendini yenilemesini arttırdığı da gösterilmiştir [239].

2.10.2. Lenfopoezde Notch Sinyalizasyonunun Önemi

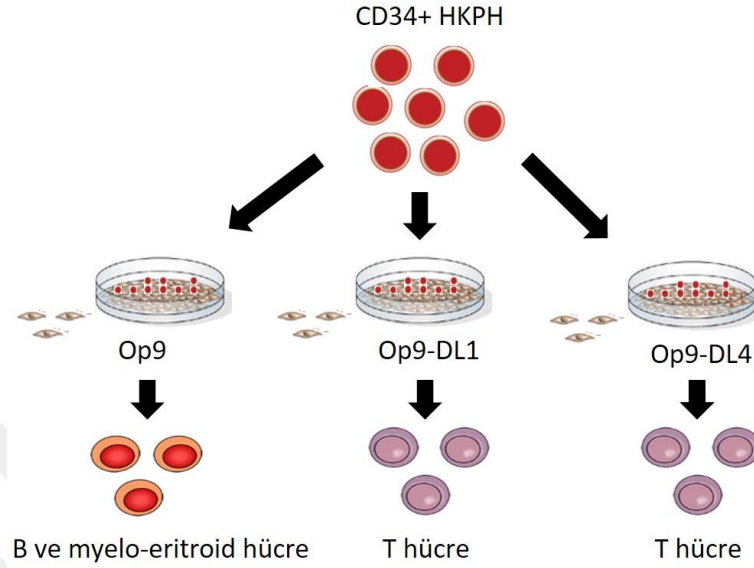
İmmatür T hücreleri; TCR (T hücre belirteçi) ve kendi-MHC molekülleri arasındaki ilişkiden doğan hücre içi sinyalinin gücüne ve uzunluğunun süresine bağlı olarak; pozitif seleksiyona uğrayarak CD4 veya CD8 soylara farklılaşmaktadır [240, 241]. Timusta T hücre olgunlaşmasının tamamlanmasından sonra; naif CD4+ veya CD8+ T hücreleri periferik lenfoid organlara göç ederek; efektör T hücrelerine farklılaşmaktadır [242]. Notch; olgunlaşmış T hücrelerinde eksprese olmakta, hücre

kaderi etkilemekte ve T hücre aktivasyonu ile farklılaşmasını düzenlemektedir [243]. Notch sinyalinin, ortak lenfoid progenitör hücreden soy kararını T hücre yönünde sağladığı gösterilmiştir [21]. B ve T hücre soy kararında özellikle Notch-1 aktivasyonu önemli bir rol oynamaktadır [22]. Notch-1 overifade eden farede; CD4+ ve CD8+ T hücreleri artmıştır ve B hücre azalmıştır [244]. Notch-1^{-/-} farelerde; daha küçük bir timus, total timosit hücre sayısında 5 kat azalma ve T hücre gelişiminin engellendiği saptanmıştır [245]. Notch-1 aktivasyonu; αβTCR-ifade eden T hücre soylarını arttırmaktadır; düşük Notch 1 düzeyinde ise γ TCR-ifade eden T hücre soyları artmaktadır [246]. Notch sinyali, T hücrenin yaşamı boyunca hem timustaki gelişiminde hem de farklılaşması/aktivasyonunda önemli roller oynamaktadır. Notch'un B hücrelerin gelişimi için de önemli olduğu düşünülmektedir. Örneğin; Notch-2 periferde B hücre aktivasyonunda ve Notch-1 ise plazma hücrelerine terminal farklılaşmada rol oynamaktadır [247]; periferik lenfoid organlarda; naif CD4+ T hücreler Notch-1,2 ekprese ederken, Notch-3 ve Notch-4 ifade etmemektedirler [248]. T hücreleri aynı zamanda Notch ligandlarından Jagged-1 [249], Jagged-2 [250] ve Delta-1 ifade etmektedir [251].

2.10.3. *In Vitro* Lenfopoezi Destekleyen Hücre Hatları

Timik epitel hücreleri üzerinde ifade olan Notch reseptörlerinin ligandlarıyla etkileşimi ve timik epitel hücreleri tarafından üretilen IL-7'nin IL7-Reseptörü ile sinyalizasyonu sonucunda timopoez gerçekleşmektedir. DLL4 ligandı; timik epitel hücreleri tarafından ifade edilmektedir ve T hücre yönünde olan farklılaşmayı desteklemektedir [252]. DLL4'ün, DLL1'e kıyasla T hücre farklılaşmasını daha iyi desteklediği ve Op9-DL4'ün timustaki timik epitel hücrelerine karşılık geldiği gösterilmiştir [253]. Notch1-DLL4 etkileşimi; Notch1-DLL1'e kıyasla T hücre gelişiminde daha büyük rol oynamaktadır [254]. Op9 stroma hücreleri fare K1 stromasından elde edilen bir hücre hattıdır ve Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) kodlayan genindeki osteopetrotik mutasyon sebebi ile işlevsel M-CSF üretememektedir [255]. Op9-DL1 hücre hatları; Op9 hücrelerinin DLL1 kodlayan retroviral ile transdüksiyonu sonucu geliştirilmiştir [256]. OP9 hücre hatları; B hücre

ile myelo-eritroid hücrelerin, Op9-DL1 veya Op9-DL4 hücre hatları ise; *in vitro* T hücre geliştirilmesinde kullanılmaktadır (Şekil 2.11) [255, 257].



Şekil 2.11. *In vitro* CD34+ hematopoetik kök ve progenitör hücrelerden lenfoid soy kökenli hücrelerin farklılaştırılması.

2.11. Hipotez

Önerilen çalışmanın gerekçeleri ve köken aldığı hipotezler;

CD271 belirteçi kullanılarak farklı dokulardan etkin bir şekilde saf MKH'ler elde edilir

MKH araştırmalarında; hücre izolasyonu, çoğaltılması ve farklılaşması protokollerinin standardizasyonunun yapılması büyük bir ihtiyaçtır. Gerçek MKH popülasyonunun izole edilmesinde, çeşitli spesifik yüzey belirteçleri [STRO-1, CD146, fibroblast antijen (D7-FIB), CD73, CD105, CD271 (LNGFR) vb.] kullanılmaya başlanmıştır. Ancak bu belirteçler her dokudan hücrelerin izolasyonunda verimli olamamaktadır ve elde edilen sonuçlar değişiklik gösterebilmektedir. MKH'lerin prospektif olarak izolasyonunda en yaygın kullanılan ve en çok umut vaat eden belirteç CD271'dir. Bu belirteç ile yapılan izolasyon çalışmalarının etkinliği, CD271'in Ki'nden MKH izolasyonunda kullanılan, son derece spesifik ve seçici bir belirteç

olduğunu göstermektedir. Ayrıca CD271 tek başına, Kİ'nden ve diğer dokulardan taze, klonojenik kapasitesi çok yüksek olan, multipotent farklılaşma yeteneğine sahip homojen altpopülasyonların elde edilmesinde büyük başarı/verim sağlamaktadır. Dolayısıyla MKH'lerin seleksiyonu sadece CD271 antikoru kullanılarak yapıldığında, hem maliyet hem de zaman bakımından yarar sağlamaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar CD271 tabanlı yöntemlerin, çeşitli konularda klinik bakımdan da önemini vurgulamaya başlamıştır. Bu tez çalışmasında; Kİ'nden izole edilen MKH ve CD271+ KH'lerin izolasyon yöntemi, başarısı ve bu hücrelerin detaylı karakterizasyonunun yapılması hedeflenmiştir. Hipotezimiz sonucunda CD271 antikoru kullanılarak, erişkin Kİ'nden CFU-F kapasitesi ve farklılaşma yeteneği yüksek olan saf kök hücre popülasyonlarının elde edilebileceği gösterilmiştir. Bunun dışında CD271'in PL ve GK dokularından da MKH izolasyonundaki etkinliği üzerine çalışılmıştır. CD271'in bu dokulardan MKH izolasyonu için de kullanılabileceği hipotezi gündeme getirilmiştir. Ancak, CD271'in Kİ'nden MKH izolasyonundaki başarısı, etkinliği bilinirken; GK gibi diğer fetal dokulardan MKH izolasyonu için kullanılmasında başarılı olunamamıştır [133]. Yaptığımız çalışmalar sonucunda bizde bu sonuçla paralel olarak; CD271 belirteçinin PL ve GK dokularından MKH izolasyonu için etkin bir belirteç olmadığını göstermiş bulunmaktayız.

CD271+ KH'ler ve HKPH ko-kültürleri, lenfohematopoezi destekler ve artırır.

CD271+ KH'ler CD133+ hematopoetik hücreler ile birlikte, NOD/SCID farelere transplante edildiğinde bu CD271+ KH'lerin, standard yöntemlerle ve plastik adheran kapasitesi kullanılarak izole edilmiş MKH'lere kıyasla; daha yüksek *in vivo* çoğalma kapasitesi sağladığı ve CD133+ hücrelerin çoklu-soy engraftmanını-uyarıcı etkilerinin olduğu, lenfohematopoezi daha fazla desteklediği ve HKPH naklinden sonra immün-yeniden yapılanmayı olan iyileştirici etkisinin daha fazla olduğu gösterilmiştir. Önerilen çalışmada yapılacak MKH-HKPH ko-kültürlerinden sonra HKPH çoğalmasının ve lenfohematopoezin arttırılacağı düşünülmüştür. Bu hipotezi test etmek için, ko-kültürlerde çoğaltılan HKPH'ler, Op9 ve Op9-DL1 hücre hatları ile ko-kültür yapılarak B ve T hücre yönünde farklılaştırılmıştır. *In vitro* insan kaynaklı B/T farklılaşmasını destekleyen hücre hatları olmadığı için, bu tez çalışmasında farklı dokulardan izole

edilen MKH'lerden en iyi B ve T hücre gelişimini destekleyecek hücreler belirlenmeye çalışılmıştır. Bu hipotezi test etmek ve araştırmak için ise, B/T hücre gelişiminde önemli rol oynadığı bilinen Notch ligand ve reseptörlerinin gen ifadelerine bakılmıştır ve farklı dokulardan izole edilen MKH'lerin sonuçları birbiriyle kıyaslanmıştır.

CD271+ KH'ler ile HKPH ko-kültürleri, CD34+ HKPH çoğaltmasını artırır

HKPH'lerin *ex vivo* çoğaltılması, klinik bakımdan kök hücre naklinde ve rejeneratif tıp'ta çok büyük önem taşımaktadır. Kİ nakli bekleyen hastalar için HLA-uyumlu HKPH'lerin sağlanması gerekmektedir. Ancak bazı durumlarda donör bulunsa bile, hücre sayısı ve kalitesi yeterli olamamakta ve yeterli miktarda hücre sayısının sağlanamaması, hastalar için sorun teşkil etmektedir. Kİ mikroçevresinde bulunan farklı stromal hücreler/MKH'ler; HKPH işlevini, sağkalımını, sessiz fazda kalmasını, çoğaltmasını ve hematopoezi desteklemektedir. Dolayısıyla, HKPH'lerin *ex vivo* çoğaltılmasının stromal hücreler ile yapılan ko-kültürler ile arttırılabileceği düşünülmüştür. Bu hipotezimizi araştırmak amacıyla bu tez çalışmasında; farklı koşullar altında, hücrelerin çoğaltılmasını sağlayan, optimize ettiğimiz farklı büyüme faktörü kokteylleri kullanarak, farklı hücre gruplarının karşılaştırılması planlanmış, CD271+ KH ve Kİ-MKH'ler ile CD34+ hücreler ko-kültür edilerek hücre çoğaltılması çalışmaları yapılmıştır.

2.12. Tez Çalışmasının Amaçları

CD271+ KH'lerin karakterizasyonunun ve HKPH'ler ile ko-kültür çalışmalarının yapılması, ko-kültür koşullarının *in vitro* lenfematopoez üzerine olan etkilerinin araştırılması, HKPH *ex vivo* çoğaltılmasını sağlayan en iyi kültür koşullarının belirlenmesi ve kültür koşullarının optimizasyonunun yapılması hedeflenmiştir. Ayrıca, CD271+ KH'lerin immünmodülatuar kapasitelerinin incelenmesi ve ko-kültürlerde HKPH'nin *in vitro* B/T hücre yönünde farklılaşmasındaki ve destek verici nitelikteki rolünün incelenmesi hedeflenmiştir. Hangi doku kaynaklı MKH'nin, *ex vivo* HKPH çoğaltılması ile *in vitro* B ve T hücre gelişimini daha iyi desteklediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla;

- 1) CD271+ KH'lerin detaylı karakterizasyonunun yapılması ve bu hücre grubu özelliklerinin Kİ-MKH'ye (Kontrol grubu) kıyasla aydınlatılması;
- 2) Placenta-Amnion (PA-MKH), Placenta Koryon (PK-MKH) ve GK-MKH özelliklerinin Kİ-MKH'ye (Kontrol grubu) kıyasla karşılaştırılması;
- 3) Kİ'nden MKH izolasyon yönteminin ve CD271 belirteci kullanılarak yapılan prospektif izolasyonun etkinliğinin değerlendirilmesi;
- 4) CD271 antijenin PL ve GK kaynaklı MKH'lerin izolasyonu için uygun olup olmadığı;
- 5) *ex vivo* HKPH çoğalmasını sağlayacak/arttıracak serumsuz kültür koşullarının optimizasyonunun yapılması ve en iyi kültür besiyerinin ve en iyi MKH kaynağının belirlenmesi;
- 5) CD271+ KH ve Kİ-MKH ile CD34+ HKPH kokültürlerinin, *in vitro* ve *in vivo* lenfohematopoezi (B/T hücre farklılaşma sistemlerinin gelişimi üzerine olan etkilerine dair) destekleyici rollerinin olup olmadığının anlaşılması;
- 6) *In vitro* B ve T hücre farklılaşmasında kullanılan Op9 hücre hatları yerine alternatif olarak hangi insan kaynaklı stroma hücrelerinin kullanılabileceği;
- 7) Kİ-MKH, CD271+ KH, PA-MKH, PK-MKH ve GK-MKH'lerden salgılanan çözünür faktör ve sitokin seviyelerinin incelenmesi;
- 8) Kİ-MKH, CD271+ KH, PA-MKH, PK-MKH ve GK-MKH'lerde NOTCH reseptör ve ligandlarının ifadenin RT-PCR ve Western Blot ile analiz edilmesi;
- 9) Bu hücre gruplarında; immünomodülatuar fenotiplerinin anti-HLA-G ve FAS-L antikoru kullanılarak akım sitometri yöntemi ile incelenmesi;
- 10) İmmün yetmezlikli fare modelinde (NSGW41), *in vitro* sonuçların *in vivo* ile karşılaştırılması yapılarak, kültür koşullarının ve *ex vivo* çoğaltılan insan KK CD34+ hücrelerinin *in vivo* homing/engraftman kapasitesi ile immünyeniden yapılandırma özelliklerinin test edilmesi planlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. İnsan Materyalleri

Kemik iliği

Kİ örnekleri (n=30); HKH nakli amacıyla sağlıklı donörlerden toplanmış olup 3-5 ml'lik Kİ örnekleri çalışılmak üzere, hemen H.Ü. Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi laboratuvarına steril bir şekilde getirilmiştir. Bu çalışma için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulundan onay alınmıştır (GO13/156-17 ve GO15/268).

Plasenta, göbek kordonu ve kordon kanı

İnsan kaynaklı; PL (n=10), GK (n=10) ve KK'ler (n=30) son trimesterde sezeryan ile sağlıklı yeni doğanlardan, H.Ü. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim dalı ameliyathanesinde Doç. Dr. Özgür Özyüncü tarafından toplanmış ve çalışılmak üzere 2 saat içerisinde H.Ü. Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi laboratuvarına steril bir şekilde getirilmiştir. HKH'leri elde etmek amacıyla, GK'dan 50 IU/mL Heparinli Fosfat-tampon tuz (PBS) içeren steril şişeye 80 ml'ye kadar KK toplanmıştır. Bu çalışma için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulundan onay alınmıştır (GO13/156-17).

3.1.2. Hücre Hatları

Op9 hücre hattı, Op/Op osteopetrozis fare modelinden oluşturulmuş bir stromal hücre hattıdır. Bu Op9 hücreler M-CSF ifade etmedikleri için *in vitro* ko-kültür sistemlerinde, embriyonik kök hücrelerden HKH oluşturulmasını ve belirgin sitokinler eklendiğinde ise HKH'lerden B-hücre farklılaşmasını desteklemektedir. DII1 ifade eden Op9 hücreler (Op9-DL1), *in vitro* Kİ HKH'lerden T-hücrelerin geliştirilmesini desteklemektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan OP9 ve OP9-DL1 stromal hücreler Dr. Zuniga-Pflücker (Toronto, Kanada) tarafından hibe edilmiştir. Hücreler α -MEM (Gibco)/%20 Fetal buzağı serumu (FBS) (Sigma–Aldrich) ortamında kültür edilip, her haftada 1/10 oranında bölünüp pasajlanmıştır.

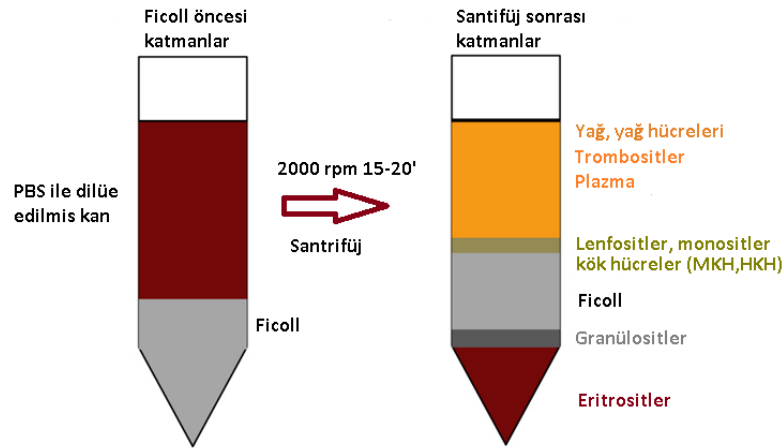
3.2. Hücre İzolasyonu

3.2.1. Kemik İliği Mononükleer Hücre İzolasyonu

Hacettepe Üniversitesi, Pediatrik Hematoloji, Kİ Ünitesi'nden gelen Kİ örneğine 1:1 oranında PBS eklenerek dilüsyon yapılmıştır. Polipropilen tüpler içerisine aynı hacimde oda sıcaklığında bulunan Ficoll eklenmiştir. Dilüe edilen Kİ örneği Ficoll üzerine yayıldıktan sonra 2000 rpm'de, 15' süresince, oda sıcaklığında frensiz santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonrası "buffy coat" kısmında yer alan mononükleer hücreler (MNH'ler) tüp içerisine toplanıp, üzerine PBS eklenerek 1500 rpm'de 5' 4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant dökülüp, pellet PBS ile karıştırıldıktan sonra tekrar yıkanıp, 1500 rpm'de 5' 4°C'de santrifüj edilip, hücrelerin Türk boyası ile sayımı yapılmıştır. Deneyler için Kİ-MNH'ler doğrudan hücre kültürü veya CD271+ KH eldesi için kullanılmıştır. Arda kalan veya kullanılmayan hücreler önce kademeli olarak Mr. Frosty ile dondurulduktan sonra -196°C'lik sıvı azot tankına alınmıştır.

3.2.2. Kordon Kanından Mononükleer Hücre İzolasyonu

H.Ü. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim dalı ameliyathanesinde toplanan KK, steril olarak H.Ü. Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne transfer edilmiştir. Gelen KK, steril şişeden 50 mL'lik polipropilen tüplere aktararak, total hacim belirlenmiştir. KK'dan 1 mL alınarak; toplam çekirdekli hücre sayısı Türk boyası ile sayılmıştır. KK örneği 1:1 oranında PBS ile dilüe edilip, 50 mL'lik tüplerde aynı hacimde eklenen Ficoll üzerine yayılmıştır. Örnekler, 2000 rpm'de 15' oda sıcaklığında frensiz santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası MNH'ler tüp içerisine toplanıp, üzerine PBS eklenerek 1500 rpm'de 5' 4°C'de 2 defa yıkanmıştır (Şekil 3.1). İkinci santrifüj sonrası KK-MNH'ler, CD34+ HKPH eldesi için kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Ficoll dansite gradient santrifügasyon öncesi ve sonrası katmanlar.

3.2.3. Kemik İliğinden Plastiğe Aderan Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

Plastiğe aderan Kİ-MKH eldesi için Kİ-MNH'lere besiyeri eklenerek $10\text{-}20 \times 10^6$ MNH'ler T-75 kültür kaplarında kültüre konmuştur. Hücre kültürü besiyeri olarak DMF10 (%52,8 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-LG), %35,2 MCDB-201, %10 ısı ile inaktive edilmiş FBS, 2 mM L-Glutamin, %1 Penisilin/Streptomisin) kullanılmıştır. Hücreler 10 mL DMF10 içerisinde, 37°C , %5 CO_2 inkübatörde kültüre edilmiştir. Medyum değişimi haftada iki kez yapılmıştır. Flaskların doluluk oranı %70-80 olduğunda, hücreler %0,25 Tripsin/1 mM EDTA ile tripsinizasyon yapılarak pasaj atlatılmış, hücre sayıları hesaplanmış ve 1×10^5 MKH olarak 10 mL DMF10 içeren taze T-75 flasklara ekilmiştir. Pasaj 3 kültür hücreleri; 1) akım sitometrisi; 2) farklılaşma deneylerinde kullanılmak üzere ve 3) Notch reseptör ve ligand gen ifadelerine qRT-PCR ile bakılmak üzere ekilmiştir. Kalan MKH'ler; %20 FBS ve %10 DMSO (Applichem, kat no A7248) içeren dondurma besiyeri ile dondurularak -196°C 'lik sıvı azot tankında saklanmıştır.

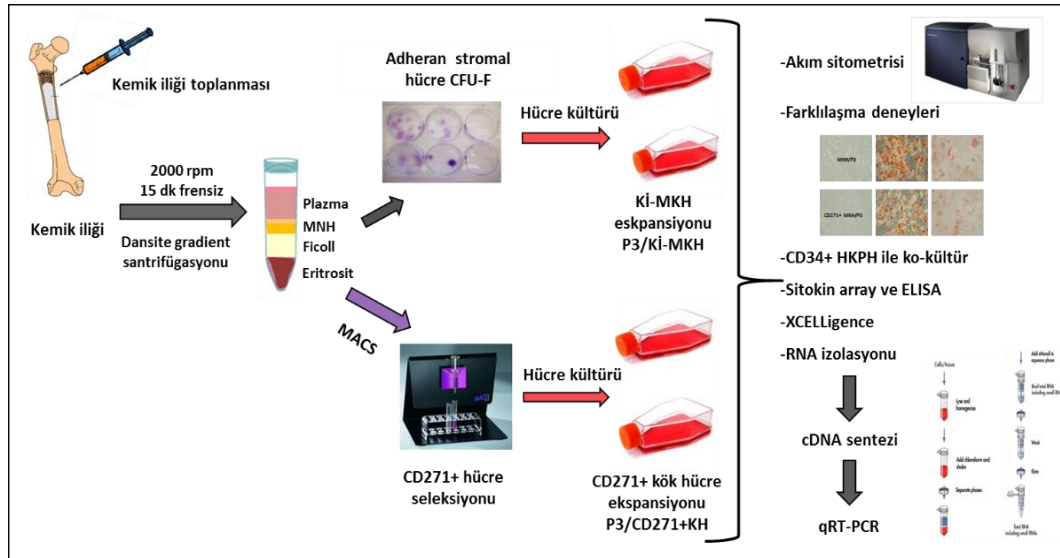
3.2.4. İnsan Kemik İliğinden CD271+ Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü

CD271+ seleksiyonu MACS, Miltenyi üreticisinin doğrultusunda, protokolde bazı değişiklikler yapılarak yapılmıştır. İnsan Kİ-MNH'leri 1500 rpm'de 5', 4°C 'de santrifüj edilmiştir. FACS için 10^6 hücre ayrılmıştır ve kalan MNH'lere her 10^7 hücre için 80 μL MACS buffer (PBS, %0,5 BSA, 2 mM EDTA), 10 μL FcR bloklama solüsyonu ve 10 μL anti-insan CD271-PE antikoru eklenerek 30' süresince MACS rotatör'de

karanlıkta inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrası; örnek iki kez soğuk MACS buffer ile yıkanarak 1500 rpm'de 5', 4°C'de santrifüj edilmiştir. Yıkama sonrası süpernatant dökülerek, 10^7 MNH'ler için; 70 µL MACS buffer, 10 µL FcR bloklama solüsyonu ve 20 µL anti-PE manyetik boncuk taşıyan antikolar eklenerek 30' süresince MACS rotatör'de 4°C'de karanlıkta inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrası örnek iki kez soğuk MACS buffer ile yıkanarak 1500 rpm'de 5' 4°C'de santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemlerinden sonra; hücre pelleti, soğuk MACS tampon ile süspansiyon haline getirilmiş ve tekli hücre süspansiyonu elde etmek üzere 30 µm'lik süzgeçten geçirilmiştir. LS kolonu MidiMACS separatörünün manyetik alanına yerleştirildikten sonra; 3 mL soğuk MACS buffer ile ıslatılmıştır. Kolonun yıkanması bittikten sonra; 3 mL hücre süspansiyonu kolona yüklenip 3 kez 3 mL soğuk MACS buffer ile yıkama yapılmıştır. Bu süreç içerisinde; manyetik işaretli CD271-PE pozitif hücreler kolon içerisinde kalmıştır ve CD271 negatif hücreler MACS tamponu ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. CD271 negatif fraksiyon toplandıktan sonra, CD271-PE pozitif fraksiyonu içeren kolon manyetik alandan uzaklaştırılarak yeni bir tüp üzerine yerleştirilmiş ve 2 kez 6 mL soğuk MACS buffer ile CD271-PE pozitif hücrelerin elüsyonu yapılmıştır. CD271+ hücreler DMF10 besi yerinde çoğaltılıp pasaj 3'te ilgili deneylerde kullanılmıştır. Hücreler; 37°C, %5 CO₂ inkübatörde kültüre edilmiştir. Yapılan deney planı aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 3.2).

3.2.5. Koloni Oluşturan Ünite-Fibroblastik Deneyi

Kİ-MNH ve CD271+ KH'lerin CFU-F sıklığını belirlemek amacıyla CFU-F deneyi yapılmıştır. Kİ-MNH'lerden 1×10^5 , 3×10^5 ve 1×10^6 hücreler alınarak; CD271+ KH'lerden 1×10^4 , 3×10^4 ve 1×10^5 hücreler alınarak, CFU-F deneyi için DMF10 içeren 6 kuyucuklu plakalara hücreler ekilmiştir. Ekimden yaklaşık 10-14 gün sonrasında, hücreler 1 kez PBS 1X ile yıkanmıştır, sonrasında 1 mL Wright boya ile boyanmıştır. İki kez su ile yıkanıp en az 50 hücreyi içeren koloniler mikroskop (Leica) altında sayılmıştır.



Şekil 3.2. Kemik iliğinden mezenkimal kök hücre ve CD271+ kök hücrelerin izolasyonu ve yapılan deneyler.

3.2.6. Fetal Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

Plasenta-Amniyondan mezenkimal kök hücre (PA-MKH) izolasyonu

Steril bir tepsi içerisinde yer alan PL'den, ilk olarak PL amniyonik (PA) zarı koryon zarından dikkatlice ayrılıp, küçük parçalara kesilmiştir. Parçalar 20 mL %0,25 Trypsin/1mM EDTA içerisine konup 37°C'de 30 dakika süresince inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı toplanıp 100 µm süzgeçten geçirildikten sonra hücreler 15 dakika süresince 0,5 µg/mL Kollajenaz (Sigma-Aldrich, kat no C9722) ve 2 mg/mL Dispaz I (Sigma-Aldrich, kat no 07D4818) ile inkübe edilip, inkübasyon sonrası 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Hücreleri içeren süpernatantlar toplanarak, T-75 flasklara ekilmiştir. PA-MKH'lerin *in vitro* çoğaltılmasında DMF10 besiyeri kullanılmıştır. Pasaj 3 PA-MKH'ler ilgili deneyde kullanılmıştır. Amniyon zarından ayrılan hücreler sadece fetal kaynaklıdır.

Plasenta-Koryondan/Parankimden mezenkimal kök hücre (PK-MKH) izolasyonu

PL'nin kalan koryon ve parankim içeren kısmı, bistüri ile küçük parçalar halinde kesilip, yukarıda bahsedildiği gibi, hücreler aynı şekilde önce Trypsin/EDTA ile, sonra

da Kollajenaz ve Dispaz I enzimleri ile inkübe edilmiştir. Elde edilen parçalar 145 mm petrilere veya T75 flasklara ekilip, DMF10 içinde çoğaltılmıştır. Pasaj 3 PK-MKH'ler ilgili deneyde kullanılmıştır. Bu hücrelerin kaynağı karışıktır: Plasenta Koryon/Parankim kısmından izole edilen hücreler hem anneye hem de bebeğe ait olan hücreleri içerebilmektedir.

Göbek-Kordonundan/Wharton's Jelly'den mezenkimal kök hücre (GK-MKH) izolasyonu

GK veni her iki tarafından küt iğneler ile kanülize edilip, içerisine 15 dakika süresince 0,5 µg/mL Kollajenaz/PBS solüsyonu al-ver yapılarak hücreler inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası; iğnelere enjektörler takılarak insan umbilikal ven endotel hücre/Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) toplanmıştır ve HUVEC besi yeri (%2 FBS, EGF, bFGF, VEGF, IGF-1, L-Askorbik Asit, hidrokortizon, heparin ve ITS içeren Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) içerisinde T-75 flasklara ekilip, çoğaltılıp pasaj 1'de dondurulmuştur. GK'ların kalan kısımlarından küçük parçalar kesilip 145 mm petrilere DMF10 besi yeri içerisinde ekim yapılmıştır. GK-MKH pasaj 3 hücreleri ilgili deneyde kullanılmıştır. GK bağından ayrılan hücreler fetal kaynaklıdır. Tüm fetal doku kaynaklı MKH izolasyon yöntemleri aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 3.3).

PA-MKH, PK-MKH ve GK-MKH hücreleri pasaj 3'e kadar çoğaltılmış ve tüm fonksiyonel ve karakterizasyon için gerekli olan testler, pasaj 3 hücreleri ile yapılmıştır. Ayrıca, PK'dan da CD271+ hücre izolasyonu yapılmıştır. Protokol olarak da Kİ'nden CD271+ hücre izolasyon protokolü uygulanmıştır.

3.2.7. Kordon Kanından CD34+ Hematopoetik Kök Hücre İzolasyonu

Her 10⁸ KK-MNH'ler için; 300 µL MACS buffer, 100 µL FcR bloklama solüsyonu ve 100 µL anti-CD34 microbeads eklenerek, 30' süresince MACS rotatör'de 4°C'de inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrası örnek iki kez soğuk MACS buffer ile yıkanıp, 1500 rpm'de 5', 4°C'de santrifüj edilmiştir.

3.3. Hematopoetik Kök Hücre Koloni Oluşturan Birim Deneyleri

KK'dan MNH izolasyonu sonrasında; 10^6 MNH'ler 2 mL IMDM içerisine eklenip karıştırıldıktan sonra, karışımdan 300 μ L alınarak 2,7 mL Methocult'a (H4434, Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada) ilave edilmiştir. Küt iğne yardımı ile 35x10 mm'lik steril petri kaplarına (BDFalcon, kat no 351008), her bir petri kabına 1 mL olacak şekilde duplike ekim yapılmıştır. Colony forming unit-granulocyte, macrophage (CFU-GM), Colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte (CFU-GEMM), Burst forming unit-erythroid (BFU-E) kolonileri 10-14 gün sonra mikroskop (Leica) altında sayılmıştır. CD34+ fraksiyonundan 10^4 hücre 2 mL IMDM içerisine eklenerek aynı protokol izlenmiştir. 7 gün ko-kültür sonrasında ise; 10^4 sayıda ekilen CD34+ hücrelerden çoğalan tüm hücrelerden (10^4 kültür edilmeyen hücrelere eşdeğer olarak) 300 μ L'e alınarak 2,7 mL Methocult'a ilave edilmiştir. Hücre ekimi ve sayımı aynı şekilde yapılmıştır.

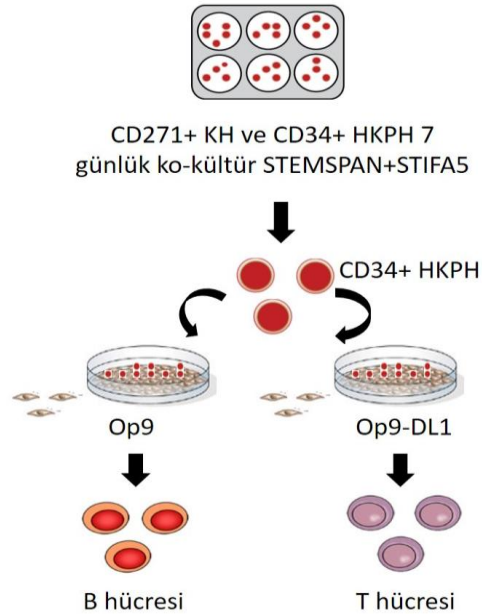
3.4. CD34+ Hematopoetik Kök ve Progenitör Hücre Kültürü ve Ko-Kültürleri

Hücre çoğaltılması kültür deneyleri için 10^4 CD34+ hücre/kuyucuk başına ekilmiştir. Ko-kültür deneyleri için, 10^4 CD34+ hücre/kuyucuk başına 6 kuyucuklu plakada kültüre edilen MKH stromal besleyici tabaka üzerine ekilmiştir. Hücrelerin kültürü, 50 ng/mL Stem Cell Factor (SCF, Immunotools, kat no 11343325), 10 ng/mL Thrombopoietin (TPO, R&D systems, kat no 288-TPN-025), 100 ng/mL Insuline-Like Growth Factor-Binding Protein 2 (IGF-BP2, R&D systems, kat no 674-B2-025), 50 ng/mL Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L, Immunotools, kat no 11343305), 100 ng/mL Angiopoietin-like 5 (AngPTL5, R&D systems, kat no 6675-AN-025) veya STIFA5 sitokin kokteyli içeren serumsuz besiyeri olan StemSpan SFEM HKH çoğaltma medyumu (Stem Cell Technologies, kat no 09650) içerisinde yapılmıştır. Hücreler; 37°C, %5 CO₂ inkübatörde, 7 gün boyunca kültüre edilmiştir.

3.5. B ve T Hücre Farklılaşma Deneyleri

Op9 ve Op9-DL1 hücre hatları OP9 medyum (α MEM, %20 FBS, %1 Pen/Strep) içerisinde *in vitro* koşullarda, steril 100 mm'lik petri kaplarında çoğaltılmıştır. 7 gün süresince StemSPAN/STIFA5 ortamında ve MKH tabakalarının varlığında veya

yokluğunda çoğaltılan CD34+ HKPH'ler, *in vitro* B hücre yönünde farklılaştırılmak için Op9 hücreler ile ko-kültür edilmiştir; T hücre yönünde farklılaştırılması için ise CD34+ HKPH'ler Op9/DL1 hücre hattı ile beraber 37°C, %5 CO₂ inkübatörde ko-kültür edilmiştir. Farklılaşma besiyeri olarak, 5 ng/mL Flt3-L ve 1 ng/mL IL-7 içeren Op9 medyumunu kullanılmıştır. Her 5 günde bir hücreler %0,25 Tripsin/1 mM EDTA ile kazıcı yardımıyla toplanmıştır. Toplanan hücrelere taze besi yeri eklenerek süzgeçten geçirilmiştir. Bu şekilde büyük Op9 hücrelerin süzgeçte kalması ve küçük hematopoetik hücrelerin de süzgeçten geçmesi sağlanmıştır. Hematopoetik hücrelere PBS eklenerek, %10'u FACS analizlerinde kullanılmıştır, kalan hücreler ise 1500 rpm'de 5' oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir ve Op9 farklılaşma besi yeri eklendikten sonra, kalan hücreler taze Op9 hücre hatları üzerine yeniden ekilmiştir. *In vitro* B ve T hücre farklılaştırılması deneyleri şekil 3.4'te özetlenmiştir.



Şekil 3.4. CD271+ kök hücre ile çoğaltılan CD34+ hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin B ve T hücre farklılaşması.

3.6. Hücrelerin Proliferasyon Takibi

Popülasyon ikiye katlamasını karşılaştırmak amacıyla, her hücre popülasyonunu pasaj atlatınca, sabit olarak 10⁵ hücre yeniden taze flasklara

ekilmiştir. Hücreler %70-80 konfluent olduğunda, tripsin yöntemi ile kaldırılmış ve Tripkan Mavi boyası ile sayılmıştır. Hücrelerin popülasyonu ikiye katlamaları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. $n = \log(KS - KÖ) / \log 2$ (KS: kültür sonundaki hücre sayısı; KÖ: kültür öncesinde ekilen hücre sayısı). Ayrıca, hücrelerin proliferasyonu, işaretleme yapılmadan gerçek zamanlı olarak xCELLigence RTCA-SP sistemi (Roche) ile analiz edilmiştir. Bu sistem ile, hücreler zeminine yerleştirilmiş mikro-elektrotlar içeren E-Plate'lere ekilmiş, elektriksel empedans ölçümü ile hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve hareketi ile ilgili kantitatif bilgi alınmıştır. CD271+ KH'ler, PA, PK ve GK-MKH'ler ile plastiğe adheran Kİ-MKH'lerin (kontrol grubu) çoğalma kapasitesi arasındaki farklılıkların incelenmesi hedeflenmiştir. Her hücre tipinden 2000 hücre E-plate'lere ekilip, E-plate sistem içerisine yerleştirildikten sonra 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır ve 10 gün boyunca hücre proliferasyonu eş zamanlı olarak takip edilmiştir. NGF'nin (Nerve Growth Factor) Kİ-MKH ve CD271+ (low-affinity nerve growth factor receptor) KH'lerin proliferasyonunu etkileyip etkileyemediğini öğrenmek amacıyla, bazı Kİ-MKH ve CD271+ KH'leri içeren kuyucuklara ayrıca 50 ng/mL NGF eklenmiştir. Tüm medyumlar 5. günde tazelenmiştir.

3.7. Hücre Dondurulması ve Çözdürülmesi

Hücrelerin dondurulması buz üzerinde ve soğuk solüsyonlarla yapılmıştır. Pelletin üzerine 1:1 oranında DMEM-LG ve 2x dondurma solüsyonu (%40 FBS-HI, %40 DMEM-LG ve %20 DMSO) yavaşça eklenerek pipetleme yapıldıktan sonra hücreler kriyotüpe aktarılmıştır. Kriyotüpler, yavaşça kademeli dondurmaya sağlayan Mr. Frosty içine yerleştirildikten sonra -80°C'ye kaldırılmıştır. Bir gün sonra hücreler uzun süreli saklama için -196°C'lik azot tankına alınmıştır.

MNH ve CD34+ hücreler MKH'lere kıyasla daha hassas hücreler oldukları için yavaş hücre çözündürme protokolü uygulanmıştır. Hücreler azot tankından alındıktan sonra hemen buz üzerine konarak laboratuvara götürülmüştür. Kriyotüplerin dışı alkolle silindikten sonra laminar akım kabininin içerisine alınmıştır. 37°C su içerisinde, içinde küçük bir buz parçası kalacak şekilde hücreler çözündürülmüştür. Sonrasında hücreler, kriyotüpten 15 mL'lik tüpe aktarılmış ve düşük hacimde (200 µL) soğuk thawing buffer eklenerek yavaşça pipetleme yapılmış, 1-2 dakika buz üzerinde

bekletildikten sonra, 400 µL thawing buffer eklenerek aynı işlem tekrarlanmıştır. En son hacim yaklaşık 30 mL oluncaya kadar git gide artan hacimlerde thawing buffer yavaş yavaş eklenerek pipetleme yapılmıştır. Sonrasında hücreler 1500 rpm'de 5' 4°C'de santrifüj edilmiş ve yapılacak olan deney için hazır hale getirilmiştir.

MKH'lere ise hızlı çözündürme protokolü uygulanmıştır. Hücreler azot tankından alındıktan sonra hemen buz üzerine konarak laboratuvara götürülmüştür. Kriyotüplerin dışı alkolle silindikten sonra laminar akım kabininin içerisine alınmıştır. 37°C su içerisinde, içinde küçük bir buz parçası kalacak şekilde hücreler çözündürülmüştür. Sonrasında, DMF10 besiyeri eklenerek kriyotüp içerisindeki hücreler 15 mL'lik tüpe alınıp, 1500 rpm'de 5' 4°C'de santrifüj edilmiş ve yapılması planlanan deney için hazır hale getirilmiştir.

3.8. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Deneyleri

MKH'lerin farklı soylara farklılaşma yeteneğini incelemek amacıyla, bu 5 farklı hücre grubu kültür koşullarında 21 gün boyunca aşağıda detaylıca bahsedilen uygun besi yeri ile farklılaşma yönünde uyarılmıştır.

Adipojenik farklılaşma

Pasaj 3 MKH'ler %90-100 konfluent olana kadar 6-kuyucuklu tabakalarda çoğaltıldıktan sonra, büyüme ortamı adipojenik ortam ile değiştirilmiştir. Adipojenik ortam; % 10FBS-HI, 1 mM Deksametazon (DEX, Sigma-Aldrich, kat no D4902), 60 mM İndometazin (IND, Sigma-Aldrich, kat no 17378), 500 mM İzobutilmetilksantin (IBMX, Sigma-Aldrich, kat no I5879) ve 5 µg/mL İnsulin (Ins, Sigma-Aldrich, kat no I3536) içeren DMEM-LG'den oluşmaktadır. Ortam 3-4 günde bir yenilenmiş ve 21. günde adipojenik farklılaşma için boyamaları yapılmıştır. Hücreler %10'luk Formol ile 10 dk oda ısısında fikse edilip, hücredeki lipitlere özgü 2 mg/mL Oil Red O (ORO) ile 10 dk, oda ısısında boyanmıştır. Kuyucuklar 3 defa distile su ile yıkanıp, Leica mikroskopta görüntülenmiştir. Hücrelerin içerdği boya miktarını ölçebilmek için, kuyucuklara 1 mL %2 İgepal CA-630 (Sigma-Aldrich, kat no 07I3021,0100) içeren İsopropanol eklenip 10 dakika inkübe edilmiştir. Örnekler kullanılabilecek kadar +4°C'de karanlıkta saklanmıştır. ORO'nun boya miktarı spektrofotometrik yöntem ile 492 nm dalga

boyunda ELISA okuyucuda (Tecan) ölçülerek, farklılaşmanın semi-kantitatif analizi yapılmıştır.

Osteojenik farklılaşma

Pasaj 3 MKH'ler %60-70 konfluent olana kadar 6-kuyucuklu tabakalarda çoğaltıldıktan sonra büyüme ortamı osteojenik ortam ile değiştirilmiştir. Osteojenik ortam; 10% FBS-HI, 100 nM Deksetazon, 10 mM β -Gliserofosfat (bGP, Sigma-Aldrich, kat no G9422) ve 0,2 mM L-Askorbik asit (L-AA, Sigma-Aldrich, kat no A92902) içeren DMEM-LG'den oluşmaktadır. Ortam 3-4 günde bir yenilenmiş ve 21. günde osteojenik farklılaşma için analiz yapılmıştır. Hücreler %10'luk formol ile 10 dk oda ısısında fikse edilmiş ve pH'ı 4,2 olan Alizarin Red S (ARS) ile boyanarak mikroskop altında kalsiyum fosfat depozitleri görüntülenerek, hücre dışı matriks kalsifikasyonu saptanmıştır. Kuyucuklardaki depozitlenmiş kalsiyumfosfatlar, 1 mL 0,6 M Hidroklorür ile 4 saat süresince oda sıcaklığında çözündürülmüş ve kalsiyum oranı Quantichrom™ Kalsiyum Analiz kiti (Bioassay Systems, DICA-500) kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile 620 nm dalga boyunda okutularak hesaplanmıştır.

3.9. Hücre Sayımı

Hematopoetik hücrelerin sayımı uygun dilüsyon yapılarak Türk boyası ile yapılmıştır. Türk boyası asetik asit içerdiği için kırmızı hücreleri patlatmakta ve kalan canlı çekirdekli hücreleri mavi boyamaktadır. MKH kültürlerinin sayımı Tripan Mavi boyası kullanılarak yapılmıştır. Tripan Mavi boyamasında; mavi hücreler ölü hücreleri göstermektedir, dolayısıyla ölü hücreler ile canlı hücreler ayırt edilebildiğinden sadece canlı hücrelerin sayımı yapılmıştır. Tüm hücre sayımları Bürker hemositometresi kullanılarak, ışık mikroskobu altında yapılmıştır. Çıkan sonuç dilüsyon faktörü ve 10^4 ile çarpılarak mL'deki ve total hücre sayısı hesaplanmıştır.

3.10. Hücrelerin İmmünofenotiplendirilmesi

Tek hücre süspansiyonu elde etmek için, adheran pasaj 3 hücreler subkonfluent olunca %0,25 Trypsin/1 mM EDTA ile kaldırılmış; adheran olmayan CD34+ hematopoetik hücreler, doğrudan PBS ile toplanmış; periferik kan veya KK

örneklerinde kırmızı hücreleri patlatmak amacıyla önceden 10' 4°C'de 1X Lizis tamponu (NH₄Cl/KHCO₃/EDTA tamponu, pH 7,4) ile muamele edilmiştir. Hücreler 2 defa PBS ile yıkanmış ve floresan işaretli antikorları içeren %2 insan AB serumu ve PBS/BSA/NaN₃ (PBN) ortamında, akım sitometri analizi için oda sıcaklığında 15' veya 4°C'de 30' süresince karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, iki kez FACS buffer ile yıkanarak 1500 rpm'de 5' santrifüj edilmiştir. Pellete 150-300 µL PBN eklenerek akım sitometrisi cihazında okutulmuştur (FACSARIA, Becton Dickinson). Tüm hücre gruplarında bakılan antijenler Tablo 3.1'de özetlenmiştir. Genel olarak immünofenotiplendirmede kullanılan antijenler şu şekildedir; stromal belirteçler (CD105, CD73, CD140b, CD166, CD90, CD44, CD106, CD146, CD200, CD271, HLA-ABC), hematopoetik belirteçler (CD45, CD34, CD31) ve immün modülatuar antijenler (HLA-G, HLA-DR) için antikorlar kullanılmıştır. Ayrıca Fas/Fas-L ifadelerine de akım sitometri yöntemiyle bakılmıştır.

3.11. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR)

3.11.1. RNA İzolasyonu ve RNA Kantifikasyonu

MKH'lerin total RNA'sı ticari kitler ile izole edilmiştir (miRNeasy minikit, Qiagen, kat no 217004). RNA izolasyonu için önceden Qiazol Lysis Reagent (Qiagen, kat no 79306) ile muamele edilmiş hücre örnekleri oda sıcaklığında çözdürülüp homojen hale getirilmiştir. RNA'ların miktar ve saflığı nanodrop cihazı (Thermo Scientific) ile ölçülmüştür. RNA'lar kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. -80°C'de muhafaza edilen, önceden Qiazol ile muamele edilmiş örnekler oda sıcaklığında çözdürülüp homojen hale getirilmiştir. Her bir tüpe 140 µL kloroform (Applichem, kat no A3633) eklenip tüpler hızlıca 15 sn çalkalanıp, oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletilmiştir.

Tablo 3.1. Akım sitometrisinde kullanılan antikörlerin detayları.

Hücre grupları	Kullanılan antikörler	Alternatif isim	Şirket	Katalog nosu
Periferik kan kemik iliği kordon kanı	CD34-APC		eBioscience	17-0349-42
	CD38-FITC		BD Biosciences BD	555459
	CD45-FITC		Biosciences	560976
	CD45-PECy7		BioLegend	304016
	CD90-FITC		BioLegend	328108
	CD106-FITC		BD Pharmingen	551146
	CD133/1-PE	AC133	Miltenyi	130-080-801
	CD140b-PE	PDGF-R	BD Pharmingen BD	558821
	CD184-P	CXCR4	Biosciences	551510
	CD184-PECy7 CD271-Alexa 647	CXCR4 LNGFR	eBioscience BD Pharmingen	25-9999-42 560326
Mezenkimal kök hücreler	CD14-PE		BioLegend	367104
	CD14-APC		BD Pharmingen	555399
	CD29-APC		BioLegend	303008
	CD31-FITC		BD Biosciences	555445
	CD34-APC		eBioscience	17-0349-42
	CD44-FITC		BioLegend	338804
	CD44-APC		eBiosciences	17-0441-82
	CD45-FITC		BD Biosciences	560976
	CD45-PECy7		BioLegend	304016
	CD73-FITC		BD Biosciences	561254
	CD73-APC		BioLegend	344006
	CD90-FITC		BioLegend	328108
	CD95-APC	FAS	BD Pharmingen	340481
	CD105-PE	TGF-R	eBioscience	12-1057-41
	CD106-FITC		BD Pharmingen	551146
	CD133/1-PE	AC133	Miltenyi	130-080-801
	CD140b-PE		BD Pharmingen	558821
	CD144-APC		BioLegend	348507
	CD146-PE		BD Biosciences	550315
	CD166-PE		BioLegend	343904
	CD178-PE	FAS-L	BD Pharmingen	564261
	CD184-PE	CXCR4	BD Biosciences	551510
	CD184-PECy7	CXCR4	eBioscience	25-9999-42
	CD200-PE		BioLegend	329205
	CD271-Alexa 647	LNGFR	BD Pharmingen	560326
	ALP-APC		R&D systems	FAB1448A
	HLA-ABC-PE		BD Biosciences	555553
	HLA-DR-PE		BioLegend	

Tablo 3.1. (devam) Akım sitometrisinde kullanılan antikorların detayları.

Hücre grupları	Kullanılan antikorlar	Alternatif isim	Şirket	Katalog nosu
Mezenkimal kök hücreler	HLA-DR-APC		BD Pharmingen	307606
	HLA-G		BD Pharmingen	347403
	SSEA4-FITC		BD Pharmingen	557577
	Rat-anti-mouse-FITC		BD Pharmingen	560126
				553443
Op9 ve Op9/DL1 ko-kültürleri	CD1α-PECy5		BD Biosciences	555808
	CD3-APC		BD Biosciences	345767
	CD4-PECy7		BD Biosciences	348809
	CD34-APC		eBioscience	17-0349-42
	CD38-FITC		BD Biosciences	555459
	CD10-FITC		BD Biosciences	347503
	CD10-PECy5 CD19-PE		BD Biosciences	555376
			BD Biosciences	555413
	CD19-PerCP CD20-PE		BD Biosciences	345778
			BD Biosciences	345793
	IgM-APC		BD Biosciences	551062
	IgD-FITC		BD Biosciences	555778

Örnekler 12,000 g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildikten sonra, sıvı faz toplanmış ve %100 etanol eklenerek karıştırılmıştır. Örnekler, RNeasy mini spin kolona eklenip 14,800 rpm'de 15 sn çöktürülmüştür. Kolondan RNA elüsyonu yapılmış ve RNA'lar kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. RNA'ların miktar ve saflığı nanodrop cihazı (Thermo Scientific) ile ölçülmüştür. Programdan nükleik asit ve sonrasında RNA-40 seçildikten sonra cihaza 1,5 µL su konup blank yapılmıştır. RNA örneklerinden 1,5 µL eklenerek ölçüm yapılmıştır. A260/280 ve A260/230 ng/µL RNA konsantrasyonları elde edilmiştir.

3.11.2. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lardan aşağıda özetlenen iş doğrultusunda, random hexamer primerler kullanılarak total cDNA elde edilmiştir. "Transcriptor high fidelity cDNA synthesis (Roche, kat no 05081963001)" kiti kullanılarak standart protokol takip edilmiş ve cDNA sentezi yapılmıştır. Her bir cDNA sentezi için 250 ng RNA kullanılmıştır. RNA ve primer'den oluşan 11,4 µl'lik bir karışım hazırlandıktan sonra RNA yapılarının denatürasyonu için, önce bir pre-inkübasyon aşaması 65°'de 10 dk'da GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA)'de yapıp, sonradan örnekler

65°C'de 10 dk denatüre edildikten sonra 4°C 5 dk soğutulmuştur. cDNA sentezi için 4 µL 5X reaction buffer, 0,5 µL Protector RNase Inhibitor, 2 µL Deoxynucleotide mix (10 mM), 1 µL DTT (0,1 M) ve 1,1 µL Reverse transcriptase (toplam 8,6 µL) örneklerle eklenmiş ve sentez aşaması için de 29°C'de 10 dk, 48°C'de 60 dk ve revers transkriptazın inaktivasyonu için ise 85°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Yukarıdaki reaksiyon sonucunda 20 µL cDNA sentezlenmiştir. cDNA örnekleri PCR grade su ile 1:2 oranında dilüe edilerek -20°C'de muhafaza edilmiştir. Elde edilen cDNA'ler; LightCycler® 480-II sisteminde (Roche), real time qRT-PCR ile rölatif hedef gen ifadenin saptanması için kullanılmıştır.

3.11.3. qRT-PCR

Kİ-MKH'lerde (n=6), CD271+ KH'lerde (n=6), PA-MKH'lerde (n=7), PK/ parankim MKH'lerde (n=5) ve GK-MKH'lerden izole edilen MKH'lerde (n=5); *NOTCH1*, *2*, *3*, *4*, *JAG1*, *JAG2*, *DLL1*, *DLL4* genlerinin ifade profilleri gerçek zamanlı PCR yöntemi (RT-PCR) ile incelenmiştir. NOTCH reseptör ve ligandlarının gen ifade profillerini incelemek amacıyla, Real-time qPCR için valide edilmiş primer-hidroliz prob çiftleri olan Taqman problemleri (Roche) kullanılmıştır (Tablo 3.2). Örneklerin bulunduğu 96 kuyucuklu plaka LightCycler 480II cihazında okutulmuştur (Roche). Bütün örneklerle ait her bir gen, aynı şartlar altında en az üçer kez çalışılmış ve t-testi ile analizler yapılmıştır. Housekeeping gen olarak Beta-aktin (*ACTB*) kullanılmıştır. 'Threshold cycle' (CT) olarak da bilinen 'Cross point' (CP) değerleri, her örneğin hedef ve referans genleri için 'Second Derivative Maximum Method'una göre, LightCycler 480 (Roche) programı kullanılarak saptanmıştır. Bütün deneylere ait amplifikasyon eğrileri ve bütün diğer veriler de yine LightCycler 480 (Roche) yazılımı ile elde edilmiştir. Verilerin istatistiksel analizi Excell ve Graphpad prism yazılımında yapılmıştır. *NOTCH1*, *2*, *3*, *4* ve *JAG1*, *2* ile *DLL1*, *4* genlerinin verileri, *ACTB* ile normalize edilip, $-\Delta CT$ ve ortalama $-\Delta CT$ değerleri hesaplanarak istatistiksel analizler yapılmıştır. Ayrıca bu genlerin dışında; hematopoez ile ilişkili olduğu bilinen genlerden *HOXA9* ve *HOXB4* gen ifadesine, Kİ-MKH ile CD271+ KH gruplarında bakılmıştır. Kat değişimi için, $2^{-\Delta\Delta CT}$ log2 transformasyonu uygulanmıştır [258] (Bkz. Şekil 4.8).

Tablo 3.2. qRT-PCR’de kullanılan primerlerin dizileri.

Gen	Forward primer	Reverse primer	Amplikon boyu (bp)
<i>NOTCH1</i>	TCAATGAGTTCCAGTGCGAGT	GCACACTCGTCCACATCGTA	73
<i>NOTCH2</i>	CCCCACAATGGACAGGAC	CCCATTTTGACAGGCATTG	77
<i>NOTCH3</i>	GCCAAGCGGCTAAAGGTA	CACTGACGGCAATCCACA	65
<i>NOTCH4</i>	CACCTGTCTGGACCTACTTGC	CTCACAGAGCTGCCCTTCTAA	70
<i>JAG1</i>	CCAGAATGGCAACAAAACCTTG	AGCCTTGTCGGCAAATAGC	74
<i>JAG2</i>	GCGCTCCTTTACCCTCATC	ATGCGACACTCGCTCGAT	88
<i>DLL1</i>	GTGGGGAGAAAGTGTGCAA	TCACAAAATCCATGCTGCTC	94
<i>DLL4</i>	CCCTGGCAATGTACTTGTGAT	TGGTGGGTGCAGTAGTTGAG	74
<i>HOXA9</i>	AAAACAATGCTGAGAATGAGAGC	TATAGGGGCACCGCTTTTT	111
<i>HOXB4</i>	CTGGATGCGCAAAGTTCAC	GTGTAGGCGGTCCGAGAG	81
<i>ACTB</i>	GGCCAGGTCATCACCATT	GGATGCCACAGGACTCCAT	91

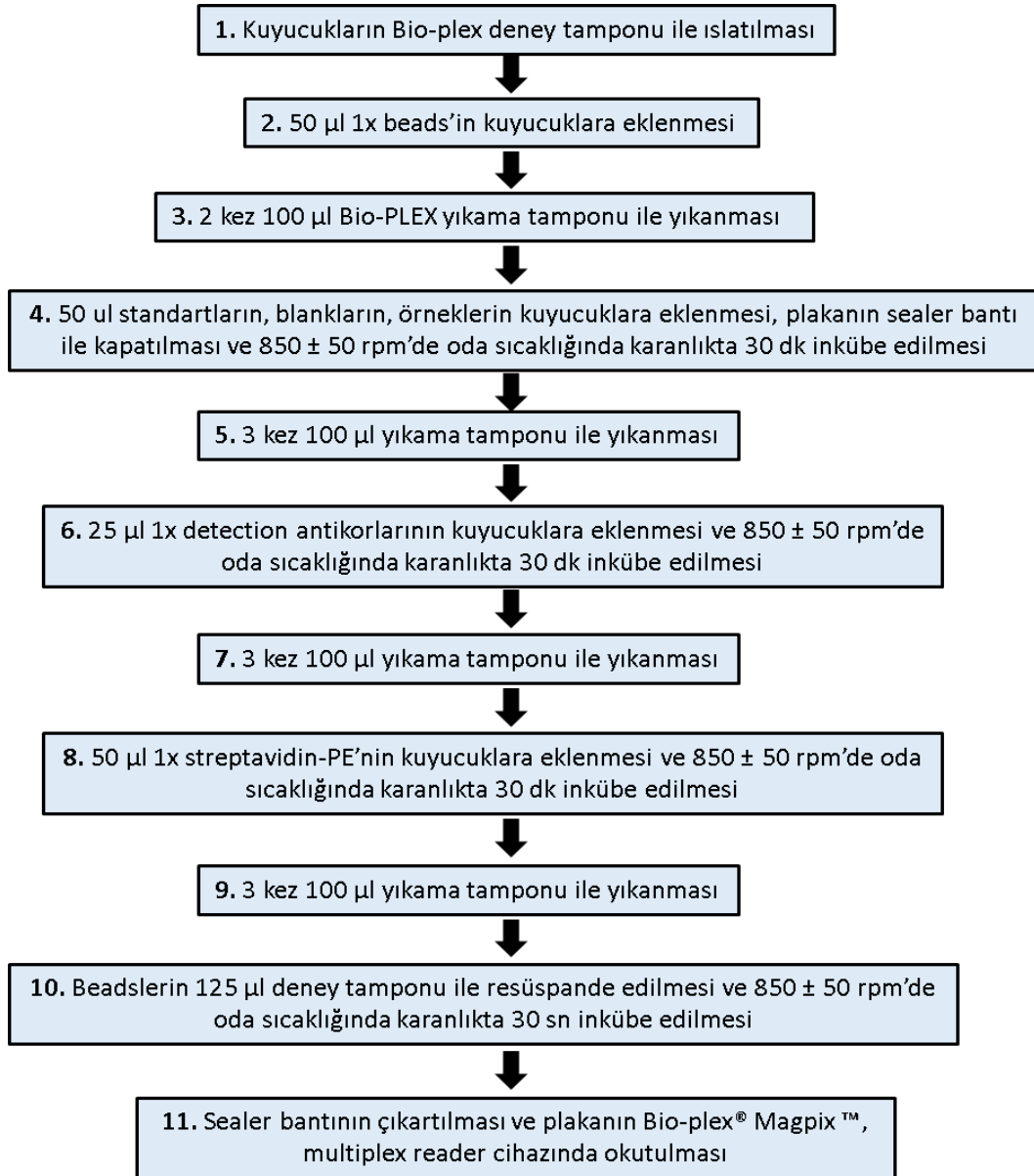
qRT-PCR için 2,5 µl moleküler grade su, 5 µl LightCycler 480 Probes Master (Roche, kat no 04707494001), 0,5 µl RealTime Ready Assay (Roche, kat no 5532957001) karıştırılmıştır. Toplam hacim 8 µl’dir. Bu karışım 96 kuyucuklu plakaya eklendikten sonra 2 µl dilüe edilen cDNA örnekleri eklenmiştir. Plaka, 1300 rpm 3-4 dk santrifüj edildikten sonra LightCycler 480-II cihazında okutulmuştur. PCR termal döngüsünün koşulları; 1 döngü 95°C 10 dk (pre-inkübasyon), 45 döngü 95°C 10 sn (denatürasyon), 60°C 30 sn (primer bağlanması), 72°C 01 sn (uzama) ve 1 döngü 40°C 30 sn (soğuma) şeklinde yapılmıştır. qRT-PCR sonrası, tüm örneklerin ortalama ΔCT değerleri hesaplanmış, analizler ve t-testi yapılmıştır. CT değeri 40.00 olan örneklerde gerçekten gen ifadesinin olup olmadığını kontrol etmek amacıyla; örnekler %2’lik agaroz jelde yürütülmüştür. Bant görülme ya da görülmeme durumuna göre analizler tekrarlanmıştır. Jelde yürütülen RNA, DNA ve PCR ürünlerinin boyutunu belirlemek için “DNA molecular weight marker XIV, 100 base pair ladder” (Roche, kat no 11721933001) kullanılmıştır.

3.12. Multipleks Sitokin-Array

Pasaj 3 Kİ-MKH, CD271+ KH, PA-MKH, PK-MKH ve GK-MKH'lerden hücre kültür süpernatantları toplanıp; 0,45 µm süzgeçten geçirildikten sonra -80°C'de saklanmıştır. Hücrelerin süpernatana salgıladıkları sitokinlerin konsantrasyonu; Bio-Plex® MAGPIX™ Multipleks Cihazı (Bio-Rad) ve IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN γ , TNF α 'ya karşı antikorlar içeren Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 8-plex Assay (BioRad, kat no M50000007A) kiti kullanılarak incelenmiştir. Hücre kültür süpernatantları çözdürüldükten sonra; 1000 x *g*'de 15 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Bütün deney protokolüne ait içerikler, tamponlar ve örnekler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir. Her standart ve örnek düplike çalışılmıştır. Uygulanan protokol Şekil 3.5'te özetlenmiştir.

3.13. ELISA

Pasaj 3 Kİ-MKH, CD271+ KH, PA-MKH, PK-MKH ve GK-MKH'lerden hücre kültür süpernatantları toplanıp; 0,45 µm süzgeçten geçirildikten sonra -80°C'de saklanmıştır. Süpernatantlar çözdürüldükten sonra 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilip, BioLegend Max™ ELISA kiti ile IL-8 (BioLegend, kat no 431507) konsantrasyonlarına bakılmıştır. Bütün reaktifler kullanılmadan hemen önce dilüe edilmiştir ve oda sıcaklığına getirilmiştir. Stok solüsyonu ve standart konsantrasyonları kullanma kılavuzuna göre 1:1 oranında dilüe edilerek hazırlanmıştır. Her standart ve örnek düplike çalışılmıştır. Kuyucuklar 4 kez 300 µl 1X yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra 50 µl örnek veya standart eklenmiş ve 2 saat 200 rpm'de çalkalayıcıda oda ısısında inkübe edilmiştir. Kuyucuklar 4 kez yıkanmış ve 100 µl detection antibody eklenip, 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. Sonrasında, plakalar 4 kere 300 µl ile yıkanmış ve 100 µl Avidin-HRP A ile beraber 30 dk'da inkübe edildikten sonra 5 kere daha yıkanmış ve her kuyucuğa 100 µl Substrat solüsyonu F eklenerek 15 dk inkübe edilmiştir. 100 µl durdurma solüsyonu eklendikten sonra plakalar 450 nm'de ELISA okuyucuda (Tecan) okutulmuştur.



Şekil 3.5. Multipleks sitokin-array deney protokolü.

3.14. Western Blot

3.14.1. Protein İzolasyonu

Pasaj 3 MKH'ler >%90 üzerinde doluluğa ulaştığında hücre kültür flaskları buz üzerine alınarak soğuk TBS tamponu (8 gr NaCl, 0,2 g KCl, 3 g Tris Baz, 1L ddH₂O, pH 7,4) ile yıkanmıştır. Lizis buffer olarak 10 mL RIPA (Radiyoimmünopresipitasyon Lizis Tamponu, Santa Cruz, kat no sc-24948A), 100 µL PMSF, 20 µL proteaz inhibitörü ve 20 µL sodyum ortovanadat kullanılmıştır. TBS aspire edildikten sonra, 300-400 µl

soğuk RIPA lizis buffer eklenmiştir. Hücre kazıyıcı kullanılarak adheran Kİ-MKH ve Kİ-CD271+ KH'leri kazınmış, hücre süspansiyonları toplanmış ve steril 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine alınmıştır. Örnekler -80°C'de hızlıca dondurulup, 37°C'de eritilip, yine dondurulmak üzere -80°C'ye konmuştur. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra örnekler 12,000 x *g*'de 20 dk 4°C'de santrifüj edilmiştir. Pellete dokunmadan süpernatant yeni bir eppendorf içerisine alınmış ve kullanılıncaya kadar loading buffer (%4 Sodyum dodesil sülfat (SDS), %10 2-Merkaptoetanol, %20 Gliserol, %0,004 bromofenol mavisi, 0.125 mM Tris-HCl, pH 6,8) içerisinde -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.14.2. Bradford Assay

Toplanan hücre lizatlarının protein konsantrasyonları Bradford (Coomassie Protein Assay Kit, ThermoScientific, kat no PI-23200) reaktifi kullanılarak BSA standartlarına (ThermoScientific, kat no PI-23210) göre belirlenmiştir. Stok BSA (2 mg/mL) solüsyonundan standartlar; 0, 200, 400, 600, 800, 1000 µg olacak şekilde seyreltilmiştir ve üçer tekrar olacak şekilde kuyucuklara eklenmiştir. Dondurulup saklanan hücre lizatları buzda eritilerek aynı 96 kuyucuklu plakaya üçer tekrar olacak şekilde su ile 1:3 dilüsyon yapılarak 5'er µL ilave edilmiştir. 5 µL protein üzerine 245 µL Bradford eklenmiş ve 5 dk karanlıkta beklenildikten sonra BSA standardı ile örnekler spektrofotometrede (TECAN, ELISA plate reader) 595 nm dalga boyunda okutulmuştur. Üçlü tekrarların ortalama absorbans verileri dikkate alınarak oluşturulan standart eğrinin formülüne göre örneklerin protein konsantrasyonları hesaplanmış ve grafikler çizilmiştir.

3.14.3. Poliakrilamid Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Yüklenmesi

15 mg APS, 150 µL ddH₂O içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Resolver için 5 mL Resolver A solüsyonu, 5 mL Resolver B solüsyonu, 5 µL TEMED ve 50 µL APS karıştırılıp vortekslenmiştir. Stacker için; Stacker A solüsyonu, Stacker B solüsyonu, TEMED ve APS karıştırılıp vortekslenmiştir. Tarak hizasının altına kadar resolver, üst kısmına da stacker solüsyon eklenmiş ve polimerizasyon için 1 saat süresince oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tablo 3.3'te kuyucuklara yüklenecek olan protein

karışımının içeriklerine dair bir örnek verilmiştir. Örnekler, aynı miktarda protein içeren şekilde SDS poliakrilamid jele yüklenmiştir.

Tablo 3.3. Kuyucuklara yüklenecek olan örneklerin hazırlanması.

	Kİ-MKH	CD271+ KH
Protein (μL)	5,21	6,48
Su (μL)	11,04	9,77
4X (μL)	6,25	6,25
10X (μL)	2,5	2,5

4X: NuPAGE™ LDS Sample buffer Invitrogen(kat no NP0007)

10X: NuPAGE™ Sample Reducing Agent Invitrogen (kat no NP0004)

Bradford yöntemiyle protein miktarı belirlenen örneklerden 22 μg alınarak üzerine eşit volumde β-merkaptotanol içeren SDS yükleme tamponu eklenmiş ve jele yüklenecek örnekler 95°C'de 5 dk bekletilip hemen buz üzerine alınmıştır. Uygun pipet uçlarıyla hazırlanan protein örnekleri poliakrilamid jele aynı miktarlarda protein içerecek şekilde yüklenmiştir. 1X Running buffer (5X Running buffer: 25 mM Tris, 190 mM Glisin, 5 g SDS, 1L ddH₂O, pH 8,3) eklenmiş elektroforez tankı (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, 170-3930, Bio-Rad) içerisindeki jele yüklenen örnekler 100 Volt'ta 1,5 saat süresince yürütülmüştür.

3.14.4. Protein Transferi

Polyvinylidene difluoride (PVDF) membran jelin boyutuna uygun olarak kesilip 1 dk. saf metanol ile, daha sonra 5 dk 1X transfer solüsyonu (3 g Tris Baz, 1,4 g Glisin, 800 mL ddH₂O, 200 mL metanol) içerisinde muamele edilmiştir. Membran ve jel sandviç yöntemiyle elektroforez cihazına (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, 170-3930, Bio-Rad) yerleştirilmiştir. Bu işlemde transfer için kullanılacak süngerler 1X transfer solüsyonuyla ıslatılmıştır. Üzerine bir adet kalın Whatmann kağıdı transfer tamponuyla ıslatılıp koyulmuş, üzerine de jel konulmuştur. Jelin üzerine PVDF membran düzgün bir şekilde yerleştirilmiş ve üzerine yine sırasıyla transfer tamponuyla ıslatılmış Whatmann ve sünger konulmuştur. Hava kabarcığı

çıkarıldıktan sonra bekletmeden 1X transfer tamponu bulunan elektroforez cihazına yerleştirilip, örnekler 1 saat süresince 100 Volt'ta transfer edilmiştir.

3.14.5. İmmün İşaretleme

Proteinlerin transfer olduğu membranlar TBS-T'de %5 süt tozu (BioRad, kat no 1706404) ile hazırlanan bloklama tamponu ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilip, membranlar 1 dakika 1X TBS-T (2 mM Tris, 15 mM NaCl, %0.1 Tween-20, pH 7.5) ile yıkanmıştır. Primer antikorlar bloklama tamponunda uygun oranda seyreltilerek (NOTCH1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-6015) ve NOTCH3 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7424) için 1:250; NOTCH4 (Santa Cruz Biotechnology, sc-32636) için 1:500) 12-16 saat çalkalayıcıda +4°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası membranlar 5'er dakika 3 kere TBS-T ile yıkanmıştır. Membranlar, bloklama tamponu içeren sekonder antikor (anti-keçi-HRP (Santa Cruz Biotechnology, G-0611)), %5 BSA, 1:10.000 dilüsyon) ile oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat muamele edildikten sonra, 5'er dakika 3 kere TBS-T ile yıkanmıştır. Western peroksit ve Western luminol/enhancer reaktifleri 1:1 oranında karıştırılmış (Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate, ThermoScientific, kat no 32132) ve membran üzerine dağıtılmış, 2 dk sonra kemoluminesans ile membranların görüntüleri FluorChem FC3 (Proteinsimple) cihazında alınmıştır. Görüntüleme sonrası membranlar yineden TBS-T içerisinde alınarak 4°C'de saklanmıştır. Yeniden aynı membranı kullanarak immün boyamaları yapabilmek için, TBS-T içinde bulunan membranlara 10 mL Western Blot stripping buffer (SantaCruz, kat no: sc-281698) eklenip, 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Membranlar TBS-T ile 3 kez 5'er dk yıkanmıştır ve en az 30 dk %5 BSA ile bloklama yapılmıştır. Bu işlemten sonra, membranlar yeni immünboyamalar için kullanılmıştır.

3.14.6. Elektroforez Sonrası Jellerin Coomassie Blue İle Boyanması

Eşzamanlı olarak iki jel dökülmüştür. Bir jel kemoluminesans ile görüntülemeye kullanılırken, diğer jel ise Coomassie blue (%0,1 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol ve %10 glasiyal asetik asit) ile boyanmıştır. Tüm boyamalar sonrasında jellerin fotoğrafları çekilmiştir. Hazırlanan Coomassie blue boyası ile jeller

1-2 saat süresince çalkalayıcıda muamele edilmiştir. Sonrasında 20 dk süresince hazırlanan destain çözeltisi (%40 metanol ve %10 glasiyal asetik asit) ile çalkalayıcıda muamele edilmiş, destain çözeltisi döküldükten sonra jel kurutulmadan hemen fotoğrafı çekilmiştir.

3.17. NSGW41 Farelere Hematopoetik Kök Hücre Nakli

NSGW41 immün yetmezliği olan farelere; 1) taze KK'dan izole edilen 3×10^5 CD34+ HKPH'ler (kontrol grubu) ve 2) 7 günlük STIFA5 sitokin kokteyli içeren serumsuz StemSPAN SFEM'de (Stem Cell Technologies) MKH veya CD271+ KH'ler üzerinde beraber ko-kültür yapılan ve çoğaltılan HKH'ler nakil edilmiştir. Hücreler 150 μ L PBS içerisinde olacak şekilde NSGW41 fareye kuyruk veninden nakil edilmiştir. Mikrohematokrit cam kapiller tüpler yardımıyla NSGW41 farelerin retro-orbital sinüslerinden kan örnekleri alınmış ve kan değerleri nakilden 1 ve 3 ay sonra değerlendirilmiştir. Engraftman, akım sitometrisi yöntemiyle insan hematopoetik belirteçleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Fareler sakrifiye edildikten sonra kalplerinden kan örnekleri alınmış, femur, tibia ve dalakları toplanmıştır. Kemiklerden PBS ile flushing yapılarak Kİ hücreleri toplanmış ve sayılmıştır. İnsan hematopoetik hücreler için koloni assayleri yapılmıştır. Dalaklar, enjektör pistonu ile ezilmiş ve hücreler 40 μ m süzgeçlerden geçirilerek tek hücre süspansiyonu haline getirilip sayılmıştır. Periferik kan, Kİ ve dalak hücreleri akım sitometrisi yöntemi ile incelenmiş ve insan hücrelerinin immünrekonstitüsyon kapasiteleri değerlendirilmiştir. Aşağıda periferik kan, Kİ ve dalak için uygulanan akım sitometrisi paneli verilmiştir. Antikorlar PBN+ %1 NMS (normal fare serum) ve %1 AB insan serum içerisinde hazırlanmıştır. Anti-fare antikorlardan 2'şer μ L kullanılmış; anti-insan antikorlardan 5'er μ L kullanılmıştır. Akım sitometri analizleri nakil edilmeden (gün "0"), nakil edildikten sonra 1 ay ve sakrifiye edildiğinde yapılmıştır. Periferik kan için anti-fare CD45-FITC, CD11b-PE, Gr1-AF700, CD3e-PECy5, NK1.1-FITC, CD45-R-PE, B220-APC, CD19-PE ve Sca1-PE antikorları kullanılmıştır. KK nakli yapıldıktan sonra ve fareleri sakrifiye ettikten sonra periferik kanda; anti-fare CD45-FITC, CD11b-PE, Gr1-AF700 ve anti-insan CD45-APC, CD3-PE, CD20-PE ve NK-FITC seviyeleri değerlendirilmiştir. Fareler sakrifiye edildikten sonra ayrıca Kİ ve dalak hücreleri insan engraftmanı için

değerlendirilmiştir. Antikor olarak; anti-fare CD45-FITC, CD11b-PE, Gr1-AF700 ve Sca1-PE ve anti-insan CD45-APC, CD3-PE, CD34-APC, CD38-PE, CD20-PE kullanılmıştır. Protokoller ve konsantrasyonları yukarıda yazıldığı gibi uygulanmıştır.

3.18. Mikoplazma Testleri

Mikoplazma belirleme testine (MycoAlert, Lonza) başlamadan önce bütün reaktifler oda sıcaklığına getirilmiştir. Hücre kültürü süpernatantları 1500 rpm'de 5' santrifüj edildikten sonra süpernatandan 100 µL alınarak lüminometre tüpüne eklenmiştir. Üzerine 100 µL MycoAlert™ Reagent eklenerek 5 dk inkübe edildikten sonra tüp lüminometreye yerleştirilerek ilgili programda okuma yapılmıştır (Program A). Örneklerle, 100 µL MycoAlert™ Substratı eklenerek (Program B) 10 dakika inkübasyon sonrasında okuma yapılmıştır. Bu iki değerin cihaz tarafından birbirine oranlanması ile sonuçlar elde edilmiştir. B/A'ya oranı <0,9 ise sonuç negatif; B/A: >1,2 ise sonuç pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.19. İstatiksel Yöntemler

Gereken ilgili durumlarda Excell ve StatPlus yazılımında iki grup arası anlamlı farklar Student's T-testi ile hesaplanmıştır; daha fazla grup arası farklar ANOVA testler ile analiz yapılmıştır. P<0,05 anlamlı farklılık değeri olarak kabul edilmiştir. Gerekğinde Graphpad Prism programı ile analizler yapılmış ve grafikler çizilmiştir.

3.20. Kimyasallar, Besiyeri, Tampon ve Solüsyonlar

Besi yeri

PBS tablet	Applichem	kat no 01A9177.0100
DMEM-LG	Life Technologies	kat no 31885-049
α -MEM	Life Technologies	kat no 22561-05
IMDM	Life Technologies	kat no 21980-065
FBS	Life Technologies	kat no 10270-106
MCDB-201	Sigma-Aldrich	kat no M6770
StemSPAN SFEM		
HKH çoğaltma besiyeri	Stem Cell Technologies	kat no 09650
StemMACS		
HKH çoğaltma besiyeri	Miltenyi	kat no 130-100-463
Methocult H4434 klasik	Stem Cell Technologies	kat no 04444

Solüsyonlar

Penisilin/Streptomisin (P/S)	Biochrom	kat no 02A2213
Biocoll	Biochrom	kat no L6115
BSA 10% stok solüsyonu	Miltenyi	kat no 130-091-376
Dimetil Sulfoksit (DMSO)	Applichem	kat no A7248
İgepal® CA-630	Sigma-Aldrich	kat no 07I3021.0100

Kimyasallar

L-Glutamin	Sigma-Aldrich	kat no G3126
NaAzid (NaN_3)	Merck	
Buzağı Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich	kat no A4503
Dispaz 1	Sigma-Aldrich	kat no 07D4818
Kollojenaz	Sigma-Aldrich	kat no C9722
İndometasin	Sigma-Aldrich	kat no 17378
İsobutilmetilksantin	Sigma-Aldrich	kat no I5879
L-Askorbik asit	Sigma-Aldrich	kat no A92902
Tripsin 1:250	Life Technologies	kat no 27250-018

EDTA disodium	Merck	kat no 4010-OP
Qiazol lysis reagent	Qiagen	kat no 79306
RNase A	ThermoFisher Scientific	kat no MBT-EN0531
Etanol %96	Kimetsan	kat no KMT-EL/05FS
2-propanol	Applichem	kat no A3928
%37 Formaldehit	JT Baker	kat no 7040.5000
%37 Hidroklorür (HCl)	Sigma	kat no 07102
NaCl	Jt Baker	kat no 7646-14-5
KCl	Carlo Erba	kat no 7447-40-7
Amonyum per sülfat	Biorad	kat no 161-0700
Albümin standart (2 mg/mL)	Thermo Scientific	kat no 23210
Tris	Biorad	kat no 161-076
Glisin	Sigma	kat no G8898-1KG
Coomassie Protein Assay Reagent	Thermo Scientific	kat no 23200
NuPAGE™ LDS Sample buffer (4X)	Invitrogen	kat no NP0007
NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X)	Invitrogen	kat no NP0004

Tamponlar

DMF10 (%52,8 DMEM-LG, %35,2 MCDB-201, %10 FBS, %1 L-Glutamin, %1 Pen/Strep)

PBN (PBS + 0,5% BSA, %0,05 NaAzid)

MACS tamponu (PBS, 0,5% BSA, 2 mM EDTA)

HUVEC besi yeri (%2 FBS, EGF, bFGF, VEGF, IGF-1, L-Askorbik Asit, hidrokortison, heparin ve İTS içeren IMDM)

OP9 medyum (α MEM, %20 FBS, %1 Pen/Strep)

Çözülme tamponu (PBS + DNaz1 + %2 FBS)

Dondurma solüsyonu (%10 DMSO, %20 FCS, %70 DMEM-LG)

1X PBS tamponu

1X Lizis tamponu

%0.25 Trypsin/1mM EDTA tampon (0,35 g NaHCO₃, 8,0 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,35 g Glukoz, 2,5 g Trypsin 1:250, 0,37 g EDTA, %1 fenol kırmızı)

Adipojenik farklılaşma medyum

Osteojenik farklılaşma medyum

T/B hücre farklılaşma medyum (αMEM, %20 FBS, %1 Pen/Strep, 5 ng/mL Flt3L, 1 ng/mL IL-7)

Western Blot Stripping tampon, SantaCruz biotechnology, kat no SC281698

10X Tris/Glisin/SDS tampon, Biorad, kat no 161-0732

10x TBST

Yükleme tamponu (Western blot)

Running tamponu (Western blot)

Bloklama tamponu

Coomassie blue destaining solüsyonu

Sitokinler

Stem Cell Factor	Immunotools	kat no 11343325
Thrombopoietin	R&D systems	kat no 288-TPN-025
Fms-like tyrosine kinase 3 ligand	Immunotools	kat no 11343305
Angiopoietin-like 5	R&D systems	kat no 6675-AN-025
Insuline-Like Growth Factor Binding Protein 2	R&D systems	kat no 674-B2-025
Interleukin-7	Immunotools	kat no 11340075
Nerve Growth Factor (NGF)	Immunotools	kat no xxxxxxxx
StemSpan 100x büyüme faktörü kokteyli	Stem Cell Technologies	kat no CC100
StemMACS 100x büyüme faktörü kokteyli	Miltenyi	kat no 130-100-843

Kitler

CD34 microbead insan hücresi izolasyon kiti, Miltenyi, kat no 130-046-702
 CD271 microbead insan hücresi izolasyon kiti, Miltenyi, kat no 130-092-819
 CD45 microbead insan hücresi izolasyon kiti, Miltenyi, kat no 130-045-801
 Sitokin array, bio-plex Pro human cytokine group 1 panel, BioRad, kat no M50-000007A
 IL-8 ELISA kiti, BioLegend ELISA Max™, kat no 431507
 miRNeasy mini kit, Qiagen, kat no 217004
 Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit, Roche, kat no 05 081 963 001
 Lightcycler 480 probes master, Roche, kat no 04 707 494 001
 EZ-PCR mikoplazma test kiti, Biological Industries, kat no BI20-700-20
 Clarity™ Western ECL Substrate kit, kat 170-5061
 TGX™ and TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide kit, Biorad, kat no161-083

Boyamalar

Türk solüsyonu	Sigma
Tripan Mavi boyası	Sigma
Wright boyası	Sigma
Oil Red O boyası	Sigma
Alizarin Red S boyası	Sigma
Coomassie Blue boyası	

Akım sitometrisi antikorları

CXCR4-PECy7	eBioscience	kat no 25-9999-42
CD3-APC	BD Biosciences	kat no 345767
CD1a-PECy5	BD Biosciences	kat no 555808
CD4-PECy7	BD Biosciences	kat no 348809
CD73-FITC	BD Biosciences	kat no 561254
CD38-FITC	BD Biosciences	kat no 555459
CD44-APC	eBiosciences	kat no 17-0441-82
IgM-APC	BD Biosciences	kat no 551062

IgD-FITC	BD Biosciences	kat no 555778
CD34-APC	eBioscience	kat no 17-0349-42
CD73-APC	BioLegend	kat no 344006
CD44-FITC	BioLegend	kat no 338804
CD29-APC	BioLegend	kat no 303008
CD90-FITC	BioLegend	kat no 328108
CD166-PE	BioLegend	kat no 343904
HLA-DR-PE	BioLegend	kat no 307606
CD14-PE	BioLegend	kat no 367104
CD45-PECy7	BioLegend	kat no 304016
CD271-Alexa 647	BD Pharmingen	kat no 560326
CD106-FITC	BD Pharmingen	kat no 551146
CD140b-PE	BD Pharmingen	kat no 558821
SSEA4-FITC	BD Pharmingen	kat no 560126
CD133/1 (AC133)-PE	Miltenyi	kat no 130-080-801
CD200-PE	BioLegend	kat no 329205
CD144-APC	BioLegend	kat no 348507
CD14-APC	BD Pharmingen	kat no 555399
CD45-FITC	BD Biosciences	kat no 560976
CD105-PE	eBioscience	kat no 12-1057-41
HLA-DR-APC	BD Pharmingen	kat no 347403
HLA-ABC-PE	BD Biosciences	kat no 555553
CXCR4-PE	BD Biosciences	kat no 551510
CD146-PE	BD Biosciences	kat no 550315
CD31-FITC	BD Biosciences	kat no 555445
ALP-APC	R&D systems	kat no FAB1448A
FAS (CD95)-APC	BD Pharmingen	kat no 340481
CD178-PE (FAS-L)	BD Pharmingen	kat no 564261
HLA-G	BD Pharmingen	kat no 557577
Rat-anti-mouse-FITC	BD Pharmingen	kat no 553443
Sheath fluid	BD Pharmingen	kat no 342003

FACSClean	BD Pharmingen	kat no 340345
Mycoalert	Lonza	kat no LT07-418
Quantichrom Ca assay kit	Bioassays	kat no DICA-500
Real Time Ready Primerler	Roche	kat no 05532957001
6X DNA loading buffer	Thermo Fisher Scientific	kat no MBT-SM1823
100-1500 bp DNA marker	Thermo Fisher Scientific	kat no M1070-1

Sarf malzemeler

Doku kültür T75 flask	Greiner	kat no 658175
Bottle top filtre 250 mL	Millipore	kat no SCGPU02RE
Bottle top filtre 500 mL	Millipore	kat no SCGPU05RE
Bottle top filtre 1000 mL	Corning	kat no 431174
100 mm kültür petri	Greiner	kat no 664160
145 mm kültür petri	Greiner	kat no 639160
35 mm kültür petri	Becton Dickinson	kat no 351008
FACS ARIA o-ring	BD Biosciences	kat no 3330840
Steril pastör pipeti	LP	kat no ORL135138
Şırınga - 3 mL	Stem Cell Technologies	kat no 28240
16 gauge küt iğne	Stem Cell Technologies	kat no 28110
Enjektör	Genject	
26 Gauge enjektör	Beybi	
Kriyotüp	Greiner	kat no 3122280
Eppendorf 1,5 mL	Greiner	kat no 3616201
PCR tüpleri 0,2 mL	Greiner	kat no 3683201
25 mL serolojik pipet	Greiner	kat no 3760180
200 uL pipet uçları beyaz	Gilson	kat no F161930
15 mL Polipropilen tüp	Greiner	kat no 188271
50 mL Polipropilen tüp	Greiner	kat no 227261
2 mL serolojik pipet	Greiner	kat no SYS 4486
5 mL serolojik pipet	Greiner	kat no 606180
10 mL serolojik pipet	Greiner	kat no 607180

5 mL FACS tüpü non-steril	Greiner	kat no 115101
5 mL steril FACS tüpü	Greiner	kat no 120180
0,22 um filtresi	Chromfilter	kat no # S33-CA-22-S
0,45 um filtresi	Chromfilter	kat no # S33-CA-45-S
6 kuyucuklu plaka	SPL Life Sciences	kat no SPL 30006
Lightcycler 480		
96 kuyucuklu plaka, beyaz	Roche	kat no 04729692001
Lightcycler 480		
384 kuyucuklu plaka, beyaz	Roche	kat no 04729749001
Filtreli uç 10 µL	Neptune	kat no BT10X
Filtreli uç 20 µL	Neptune	kat no BT20X
Filtreli uç 100 µL	Neptune	kat no BT100X
Filtreli uç 200 µL	Neptune	kat no BT200X
Filtreli uç 1250 µL	Neptune	kat no BT1250
LS kolonlar	Miltenyi	kat no 130-042-401
xCELLigence e-plakası	Roche	kat no 05232368001

Western blot antikorları

NOTCH1	Santa Cruz Biotechnology	kat no sc-6015
NOTCH3	Santa Cruz Biotechnology	kat no sc-7424
NOTCH4	Santa Cruz Biotechnology	kat no sc-32636
Sekonder antikor	Santa Cruz Biotechnology	kat no G0611

Cihazlar

MidiMACS Separatörü	Miltenyi	kat no 130-042-302
MACS rotatörü	Miltenyi	kat no 130-090-753
Mr. Frosty	Nalgene	kat no C1562
İnkübatör	Nüve	kat no EC160
Laminer Akım Kabini		
Biyogüvenlik seviye II	Hera Safe	
Laminer Akım Kabini		

Biyogüvenlik seviye II	Biolab	kat no BH-EN2004
Santrifüj	Eppendorf	kat no 5810R
Işık Mikroskobu	Olympus	kat no CKX41
Işık Mikroskobu	Leica	
Su banyosu		kat no GFL1086
Su banyosu	Nüve	kat no ST402
Distile su cihazı Milli-Q	Millipore	
Vorteks	Dragon lab	kat no MX-S
Karıştırıcı	Wisestir	kat no MSH-20A
Hassas terazi	Shimadzu	kat no AUW 2000
Çeker ocak	Metebox®, Siemens	
Buz makinası	Electrolux	
Microfuge®16 santrifüj	Beckman Coulter	
UV kabini	Biosan	
Lucetta™ Luminator	Lonza	
Pipetman	Gilson	
Pipetman	Eppendorf	
Pipetman	Thermo Fisher Scientific	
Pipetör	Thermo Scientific	kat no S1 pipet filler
Multikanallı pipet	Eppendorf	
FACSARIA	Becton Dickinson	
Bio-plex® Magpix™		
Multiplex reader	BioRad	
xCELLigence	Roche	
Spektrofotometre	Nanadrop	kat no ND-100
GeneAmp® PCR system	Applied Biosystem	kat no 9700
Lightcycler® 480II	Roche	
Spektrofotometre	Tecan	
Jel Görüntüleme sistemi	FluorChemFC3 Proteinsimple	
Western blot cihazı miniprot	Biorad	
PowerPac Basic güç kaynağı	Biorad	

Mikroskop software	DP controller ve DP manager
-80° buzdolabı	RSBiotech
-80° buzdolabı	SANYO
Otoklav	SANYO
Buz makinası	Electrolux
Shaker/Çalkalayıcı	GFL



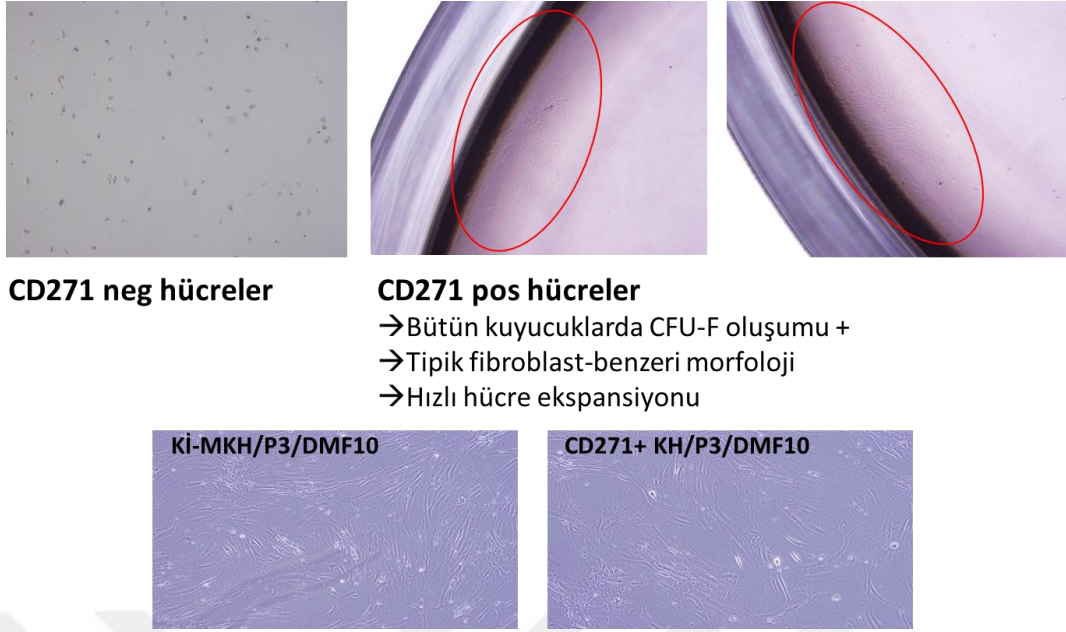
4. BULGULAR

4.1. Kemik İliğinden Mezenkimal Kök Hücre ve CD271+ Kök Hücrelerin İzolasyonu, Üretilmesi ve Karakterizasyonu

MKH'ler, multipotent kök hücrelerdir ve HKH'ler için destekleyici rol oynamaktadır. CD271, MKH'lerin prospektif izolasyonunda kullanılan, homojen MKH alt popülasyonlarının elde edilmesini sağlayan bir belirteçtir. Bu çalışmada; Kİ'nden elde edilmiş CD271+ KH'lerin, moleküler ve işlevsel karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar plastik adheran özelliklerle elde edilmiş "altın standart" Kİ-MKH'lerin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Kİ'nden elde edilen CD271+ KH'ler, Kİ-MKH'ler ile benzer *in vitro* koşullar altında; morfolojisi, çoğalma karakteristiği, çok yönlü farklılaşma kapasitesi, immünofenotipi, hücrelerin izolasyonu, salgıladıkları sitokinler ile Notch reseptör ve ligandlarının gen ifadesi, bakımından karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalara ait sonuçlar aşağıda detaylı bir şekilde verilmiştir.

4.1.1. Kemik İliği CD271+ Kök Hücrelerin Koloni Oluşturma Kapasitesi Yükseksektir

Bu çalışma sırasında kullanılan Kİ örnekleri HEK/192-04 kayıt numaralı etik kurul kararı kapsamına uygun olarak çalışmaya alınmıştır. Toplam 15 farklı sağlıklı Kİ donörlerinden (yaş 2-18), MACS yöntemi kullanılarak CD271+ hücreler izole edilmiştir (bir donörden iki defa CD271+ izolasyonu yapılmıştır). Ortalama CD271+ hücre oranı; Kİ-MNH'de $2,3 \pm 1,3$ (n=13) iken, CD271+ seleksiyonundan sonra $60,9 \pm 23,6$ (n=15) olarak saptanmıştır. Kİ'nde CFU-F sıklığını belirlemek amacıyla, CFU-F deneyleri yapılmıştır. Belirlenen sayıda hücre tipi, 6 kuyucuklu tabakalara ekilmiş ve çoğaltılmıştır (Şekil 4.1). 10-14 gün sonrasında >50 fibroblastik hücreleri içeren koloniler sayılmıştır. 10^6 ekilen Kİ-MNH'de: $183,7 \pm 178,0$ ve 10^6 ekilen CD271+/CD45- hücre grubunda: $9519,6 \pm 8107,2$ CFU-F tespit edilmiştir (p<0,01). CD271 negatif hücre kültürlerinde koloni oluşturan multipotent hücreler ve adheran hücreler tespit edilememiştir (Şekil 4.1).



CD271 neg hücreler

CD271 pos hücreler

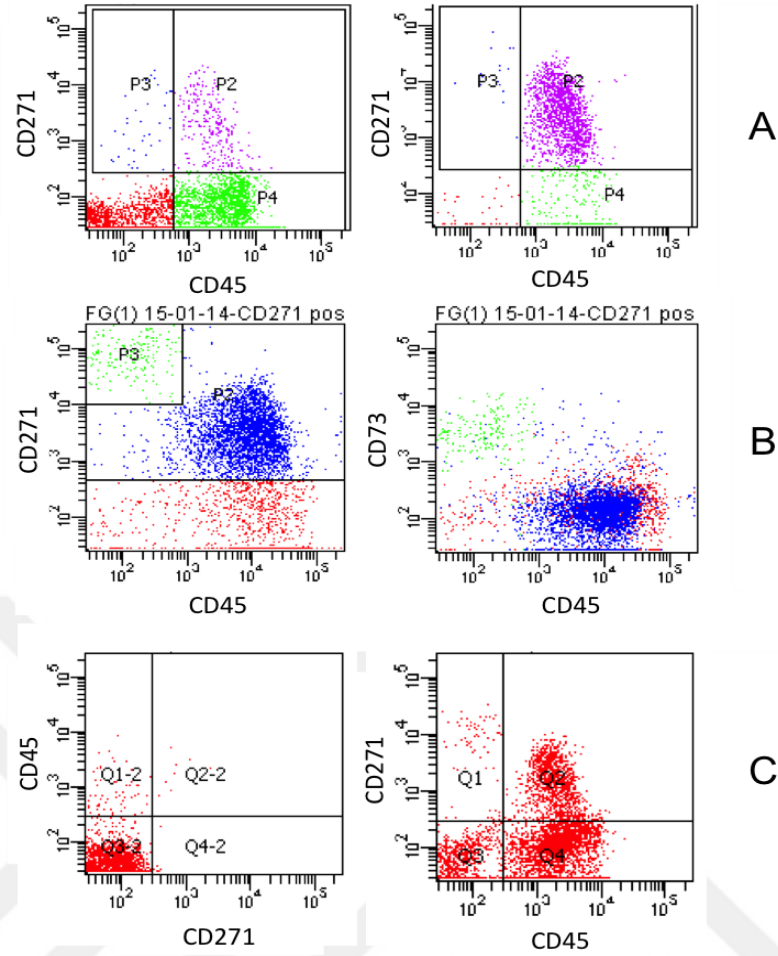
- Bütün kuyucuklarda CFU-F oluşumu +
- Tipik fibroblast-benzeri morfoloji
- Hızlı hücre ekspansiyonu

Ki-MKH/P3/DMF10

CD271+ KH/P3/DMF10

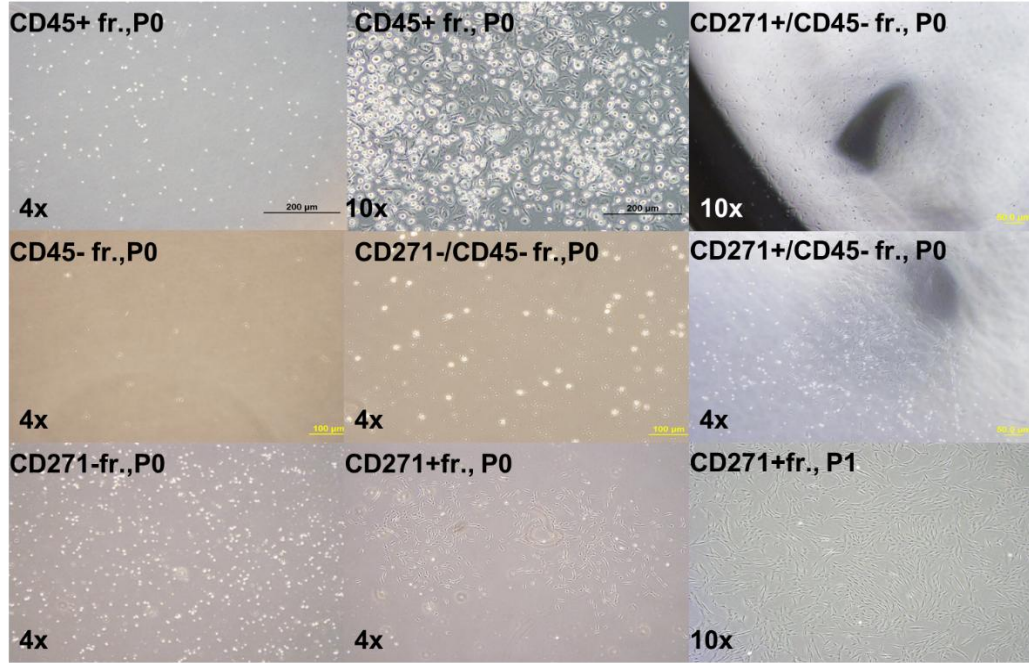
Şekil 4.1. Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin ve CD271+ kök hücrelerinin *in vitro* morfolojisi. Üst: CD271 negatif hücrelerin mikroskopik görüntüsü ve CD271 pozitif hücrelerden oluşan fibroblastik koloni oluşturan birimlerinin makroskopik görüntüleri. Aşağıda: Pasaj 3 adaran Kİ-MKH'lerin ve CD271+ KH'lerin invertte ışık mikroskop görüntüleri, 10X.

CD271+ KH izolasyonundan sonra az sayıda CD271++/CD45- hücreler ve fazla sayıda CD271+/CD45+ hücreler elde edilmektedir (Şekil 4.2A). Pasaj 3 CD271+ KH'lerin ve Kİ-MKH'lerin mikroskop altındaki morfolojik görüntüleri yukarıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 4.1). Akım sitometri yöntemi ile bakıldığında CD271++/CD45- olan hücreler MKH belirteci olan CD73 bakımından pozitif, ancak CD271+/CD45+ hücreler CD73 negatiftir (Şekil 4.2B). Bu nedenle, tüm CFU-F'lerin sadece CD271++/CD45- hücrelerden oluştuğu düşünülmektedir. Ayrıca, CD45 öz bir hematopoetik belirteç olduğundan, CD271+/CD45+ hücrelerinin hematopoetik kaynaklı olduğu, hücre kültür tabakasına bu sebeple yapışmadığı ve koloni oluşturmadığı düşünülmektedir. Bu nedenle, Kİ-MNH'lerden CD45 depleksiyonundan sonra CD271 pozitif hücre seleksiyonu yapılmıştır (Şekil 4.2C) ve CD271++/CD45- hücre grubunda 340,5 CFU-F/10⁶, aynı örnekten elde edilen Kİ-MNH grubunda ise 12,1 CFU-F/10⁶ MNH'lerde saptanmıştır.



Şekil 4.2. Kemik iliğinden CD271+ kök hücre izolasyonuna ait temsili akım sitometri görüntüleri. A: sol: Kİ-MNH fraksiyonundaki CD271+/CD45- oranları; sağ: CD271 izolasyonu yapıldıktan sonraki CD271 oranları; B: sol: İzole edilen CD271+ kök hücreler iki farklı popülasyondan oluşmaktadır: CD271++/CD45- hücreler ve CD271+/CD45+ hücreler; sağ: CD271++/CD45- hücreler MKH belirteçi olan CD73 bakımından pozitifdir ve Kİ örneğinin tüm CFU-F kapasitesini içermektedir; CD271+/CD45+ hücreler CD73 negatiftir, hematopoetik kaynaklı hücreler, plastiğe yapışmamakta ve CFU-F koloni oluşturmamaktadır. C: sol: Kİ-MNH CD45 depleksiyonundan sonra CD45 oranları %1,4'e kadar düşmüştür; sağ: CD45 negatif fraksiyonundan yapılan CD271 pozitif seleksiyonundan sonra iki farklı CD271++/CD45- ve CD271+/CD45+ popülasyonları oluşmuştur.

CD45 depleksyonundan sonra yapılan CD271+ hücre seleksiyonuna ait tüm hücre fraksiyonlarının mikroskop altındaki morfolojileri Şekil 4.3'te sunulmuştur. Sadece CD271++ hücreler ve CD271++/CD45- hücreler plastiğe yapışmaktadır; diğer hücre gruplarında CFU-F tespit edilmemiştir. CD45+ hücrelerde nadiren tek tek aderan hücreler gözlenmiş olsa da, bu hücreler pasajlanarak çoğaltılamamaktadır (Şekil 4.3).



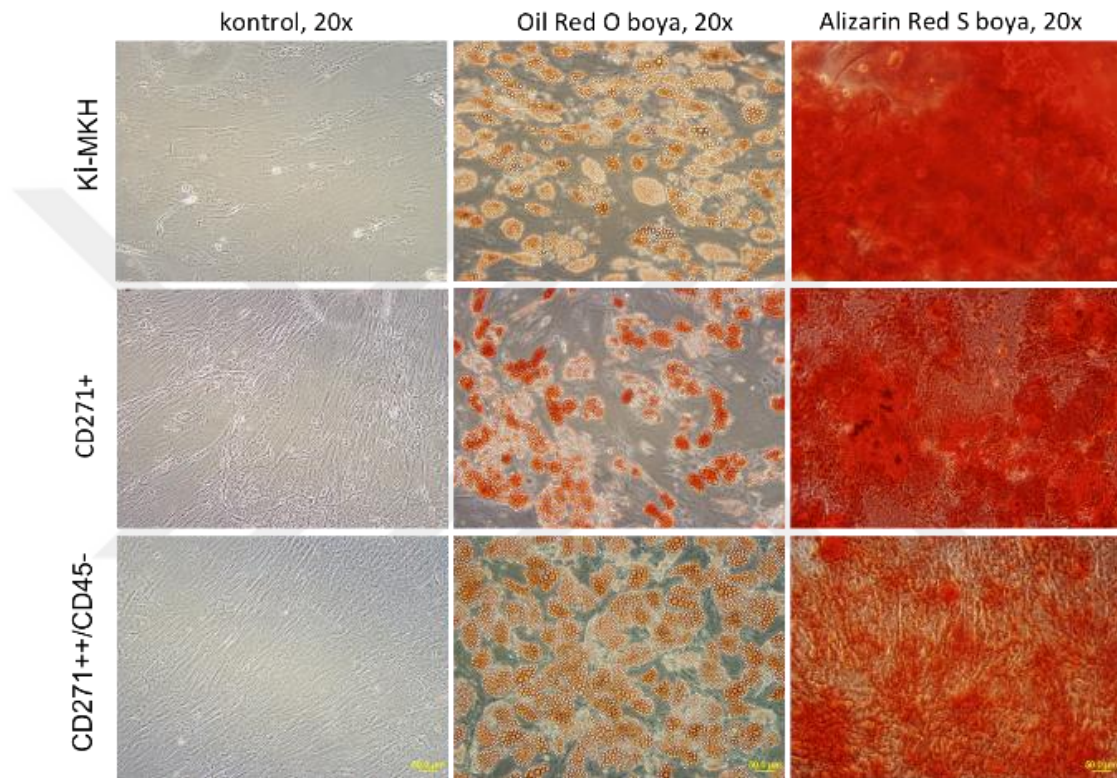
Şekil 4.3. Farklı hücre fraksiyonlarının invert mikroskop görüntüleri.

4.1.2. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin ve CD271+ Kök Hücrelerin Farklılaşma Kapasitesi Benzerdir

Pasaj 3 Kİ-MKH'ler ve CD271+ KH'lerin, farklı soylara (adipojenik ve osteojenik) farklılaşma yetenekleri incelenmiştir. Kİ-MKH ve CD271+ KH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasiteleri benzerlik göstermektedir. Sonuçlar Tablo 4.1 ve Şekil 4.4'te sunulmuştur.

Tablo 4.1. Pasaj 3 kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin ve CD271+ kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli.

Ekilen hücre tipi	Adipo ORO (mg/mL)	Osteo Kalsiyum (mg/dL)
Kİ-MKH (n=17)	0,57 ± 0,43	10,80 ± 6,39
CD271+ KH (n=6)	0,41 ± 0,24	7,99 ± 2,35



Şekil 4.4. Kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücrelerin ve CD271+ kök hücrelerin farklılaşma görüntüleri. Kİ-MKH (üst), CD271+ KH (orta) ve CD271++/CD45- KH'ler (alt) farklılaşma deneylerine 21 gün devam edilmiştir. Kültürler %4 formol ile fikse edilip adipojenik farklılaşma için ORO ile, osteojenik farklılaşma için ARS ile boyanmıştır.

4.1.3. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler ve CD271+ Kök Hücreler Benzer İmmünojenotip Göstermektedir

Pasaj 3 Kİ-MKH ve CD271+ KH'lere ait immünojenotip profili Tablo 4.2'de sunulmuştur. İmmünojenotipik olarak, Kİ-MKH ile CD271+ KH'ler birbirine yakındır.

Tablo 4.2. Pasaj 3 kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ve CD271+ kök hücrelerin immünojenotipi (%).

Antijen	Kİ-MKH (%) (n=30)	CD271+ KH (%) (n=8)
CD29	94,1 ± 7,3	97,5 ± 2,0
CD31	0,3 ± 0,4	0,3 ± 0,5
CD34	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,1
CD44	92,3 ± 5,8	87,1 ± 7,2
CD45	0,6 ± 0,4	0,3 ± 0,1
CD73	95,9 ± 5,9	92,3 ± 1,9
CD90	98,5 ± 1,9	98,4 ± 2,2
CD105	96,2 ± 5,3	94,5 ± 10,4
CD106	2,5 ± 3,7	0,4 ± 0,1
CD133	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1
CD140b	78,6 ± 21,0	76,4 ± 14,9
CD144	0,22 ± 0,32	0,21 ± 0,11
CD146	45,9 ± 26,2	64,78 ± 22,2
CD166	91,7 ± 10,6	82,2 ± 9,9
CD200	9,6 ± 8,0	8,3 ± 10,0
CD271	2,0 ± 2,7	1,4 ± 1,6
ALP	9,1 ± 11,3	16,1 ± 6,3
HLA-ABC	91,0 ± 11,2	73,5 ± 31,2
HLA-DR	0,2 ± 7,0	2,6 ± 1,6
SSEA4	1,1 ± 1,0	2,2 ± 3,2

4.1.4. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin ve CD271+ Kök Hücrelerin Proliferasyon Hızı Benzerdir

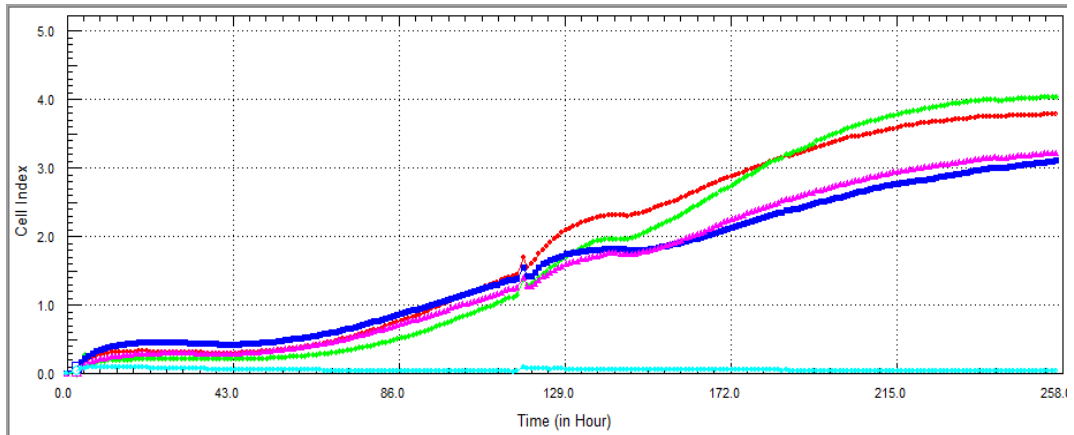
Her pasajın sonunda hücrelerin ikiye katlanma oranları (population doublings) hesaplanmıştır (Tablo 4.3). Hücrelerin popülasyonu ikiye katlamaları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. $n = \log(KS - KÖ) / \log 2$ (KS: kültür sonundaki hücre sayısı; KÖ: kültür öncesinde ekilen hücre sayısı). İkiye katlanma oranları birbiri ile aynıdır.

Tablo 4.3. Pasajlar sonrasındaki kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ve CD271+ kök hücrelerin ikiye katlanma oranları.

Ekilen hücre tipi	P1	P2	P3	P4	P5
Kİ-MKH (n=10)	3,56	3,38	3,06	2,82	2,75
CD271+ KH (n=10)	2,75	2,70	2,13	2,44	2,39

4.1.5. NGF, Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin ve CD271+ Kök Hücrelerin Proliferasyon Hızını Etkilememektedir

Hücreler genel olarak DMF10 besi yerinde çoğaltılmıştır, ancak CD271 reseptör ligandlarından biri olan NGF'nin Kİ-MKH ve CD271+ (LNGFR+) KH'lerin proliferasyonunu etkileyip etkileyemediğini öğrenmek amacıyla, bazı Kİ-MKH ve CD271+ KH'leri içeren kuyucuklara ayrıca 50 ng/mL NGF eklenmiştir. Kültür ortamına CD271 reseptör ligandının eklenmesinin proliferasyonu olumlu etkileyebileceği düşünülmüştür. Pasaj 3 Kİ-MKH ve CD271+ KH'lerin gerçek zamanlı proliferasyonu 10 gün boyunca takip edilmiştir. Sonuç olarak; Kİ-MKH ve CD271+ KH'lerin proliferasyon hızı benzer bulunmuştur ve NGF'nin hücrelerin proliferasyon hızına etki etmediği görülmüştür (Şekil 4.5).

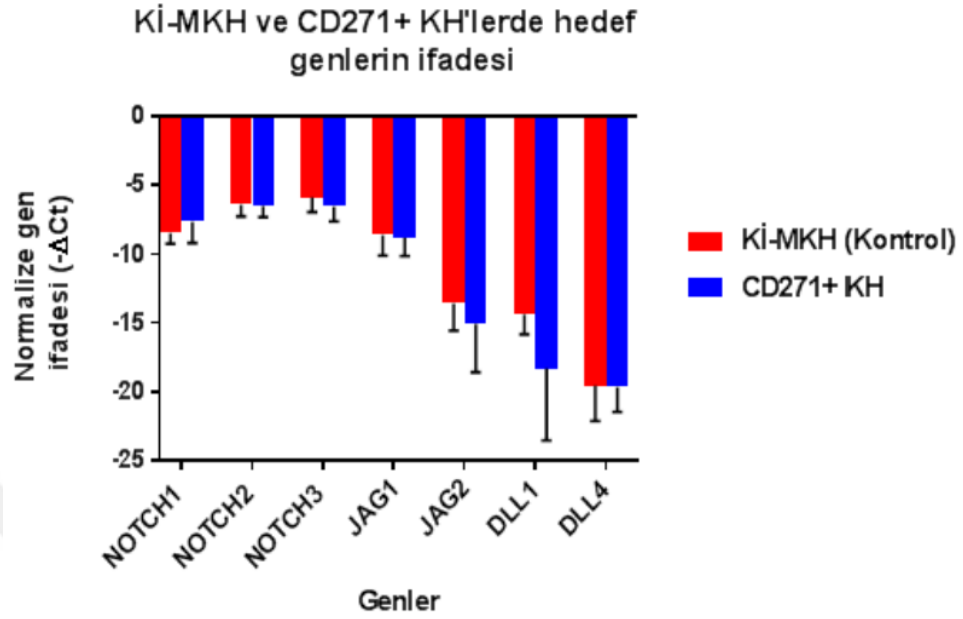


Şekil 4.5. Gerçek zamanlı hücre proliferasyon analizi (xCELLigence). xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (Roche) kullanılarak, pasaj 3 Kİ-MKH ve CD271 KH'lerin proliferasyon hızı 10 gün boyunca takip edilmiştir. 5'inci günde, medyumlar tazelenmiştir (zirveler, saat 120). NGF'nin Kİ-MKH ve CD271+ KH'leri üzerindeki etkilerini görmek amacıyla, bazı kuyucuktaki medyumlara 50 ng/mL NGF eklenmiştir. Açık mavi: hücre içermeyen kontrol medyum, DMF10 (n=3); Kırmızı: Kİ-MKH (n=4); Yeşil: Kİ-MKH + 50 ng/mL NGF (n=4); Koyu Mavi: CD271+ KH (n=4); Pembe: CD271+ KH + 50 ng/mL NGF (n=4).

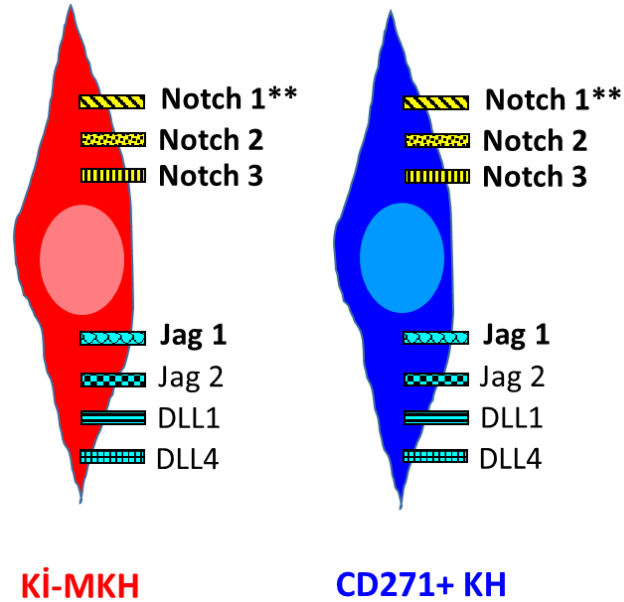
4.1.6. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler ve CD271+ Kök Hücreler Benzer NOTCH Reseptör ve Ligand Gen Profili Göstermektedir

Kİ-MKH (n=6), CD271+ KH'lerde (n=6); *NOTCH 1, 2, 3* ve *4* reseptörleri ile ligandları olan *JAG1, JAG2, DLL1, DLL4* genlerinin ifade profilleri incelenmiştir. Kİ-MKH'ler ve CD271+ KH'lerin gen ifadeleri karşılaştırıldığında; *NOTCH 1, 2, 3* ve *JAG1, JAG2, DLL1* ve *DLL4* gen ifadeleri benzerlik göstermektedir. Her iki hücre grubu *NOTCH 1, 2, 3* reseptörlerini, ligandlarına kıyasla daha yüksek düzeyde ifade etmektedir. Ligandlardan ise; en yüksek olarak ifade edilen gen *JAG1*'dir. Her iki hücre grubunda da *NOTCH 4* gen ifadesi yoktur (Şekil 4.6). Ayrıca, reseptör ve ligand gen ifadelerine dair elde edilen bu sonuçlar aşağıda çizilen şekil üzerinde özetlenmiştir (Şekil 4.7). Bu genlerin dışında, Kİ-MKH ve CD271+ KH'lerde, HKH'lerde önemli rol oynadığı bilinen *HOX* genleri ailesinden; HKH'ler ile ilişkili olan *HOXA9* ve *HOXB4* gen

ifadelerine de bakılmıştır. Log2 tabanında, iki hücre arasında HOX gen ifadelerinde kat değişimi gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 4.8).

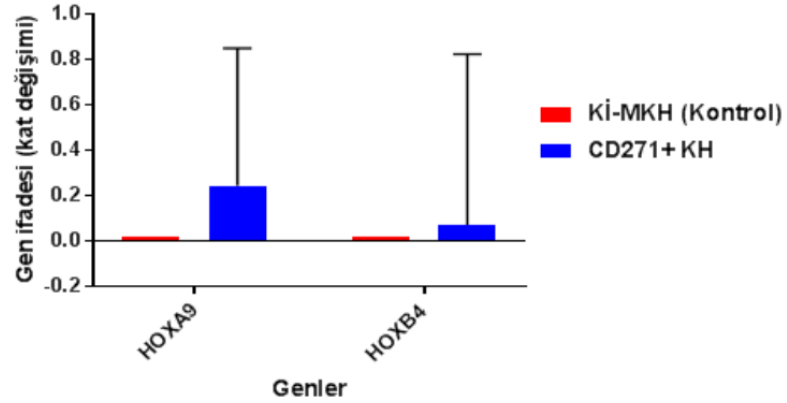


Şekil 4.6. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve CD271+ kök hücrelerde NOTCH reseptör ve ligandlarının gen ifadeleri.



Şekil 4.7. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve CD271+ kök hücrelerde Notch reseptör ve ligandlarının ifadesi. **: en yüksek gen ifadesi, **koyu** ile işaretliler: daha yüksek gen ifadesini temsil etmektedir.

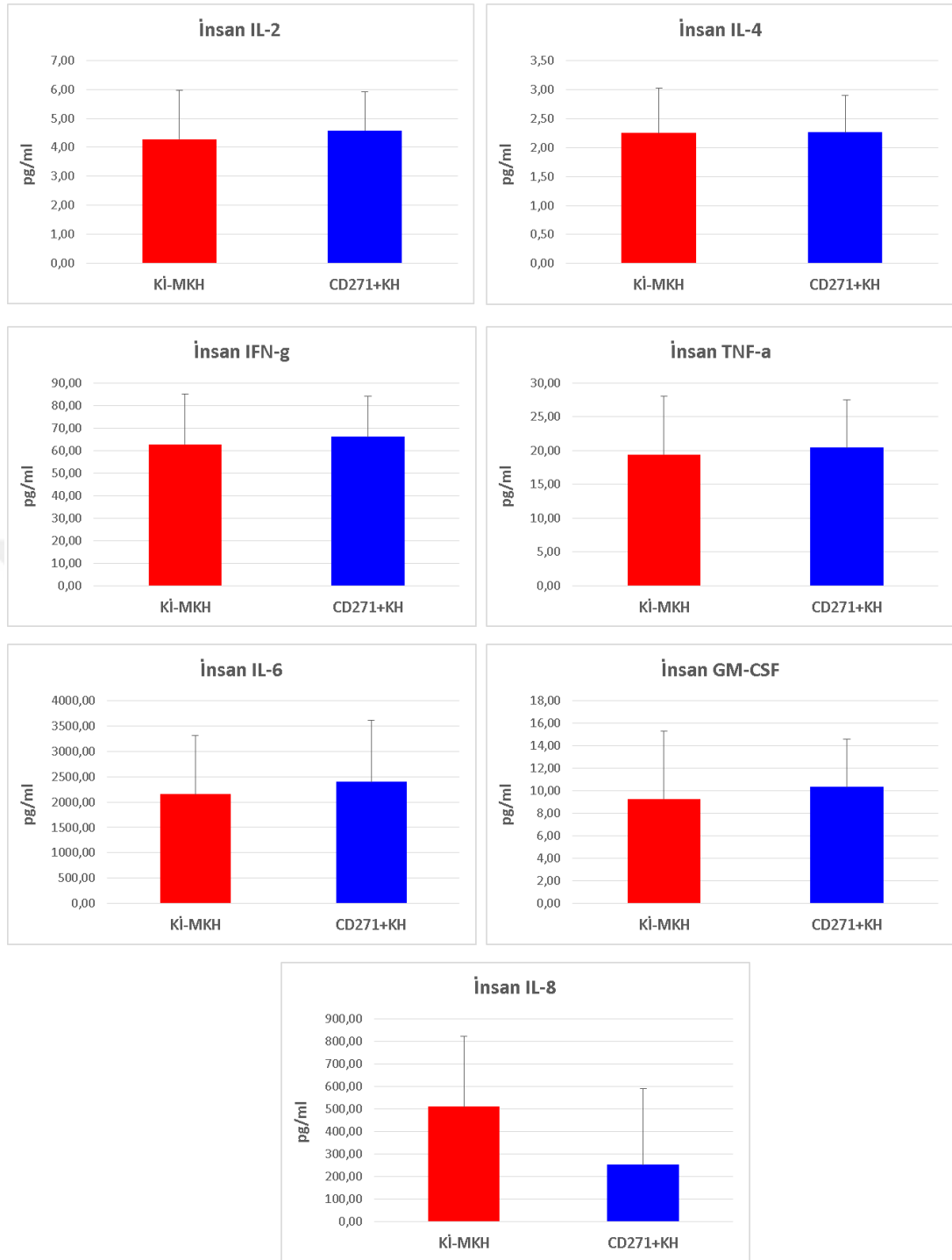
Hematopoetik Kök Hücreler ile ilişkili HOXA9 ve HOXB4 genlerinin
Kİ ve CD271+ KH'lerde ifadesi
($\log_2(2^{\Delta\Delta\text{act}})$)



Şekil 4.8. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve CD271+ kök hücrelerde *HOX* genlerinin ifadesi (kat değişimi).

4.1.7. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler ve CD271+ Kök Hücreler Benzer Sitokin Profili Göstermektedir

Pasaj 3 Kİ-MKH (n=11), CD271+ KH (n=11) kültür süpernatantlarına salgılanan; IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN γ ve TNF α seviyeleri Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 8-plex Assay (BioRad #M50000007A) kiti kullanılarak incelenmiştir. IL-10'un standartları kitin kalite kontrolüne göre uygun çıkmadığı için, IL-10 sonuçları analiz dışı bırakılmıştır. Multipleks sonuçları Şekil 4.9'da sunulmuştur.



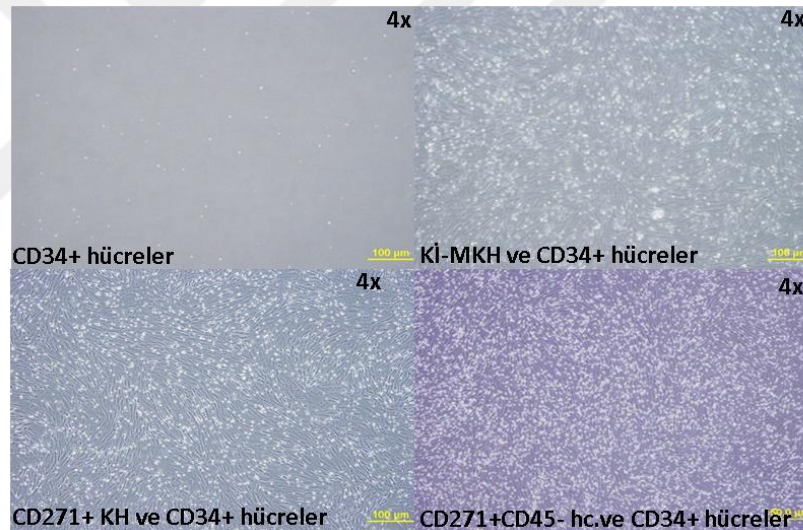
Şekil 4.9. Kemik iliği mezenkimal kök hücre ve CD271+ kök hücrelerin salgıladıkları ortalama sitokin düzeyleri.

Genel olarak, Ki-MKH ve CD271+ KH süpernatantlarının sonuçları birbirine yakın sitokin profili göstermiştir. Ki-MKH ve CD271+ KH'ler arasında sadece IL-8 seviyelerinde anlamlı fark gözlenmiştir ($p < 0,05$). Ki-MKH ve CD271+ KH'lerden salınan

IL-8 seviyeleri, multipleks deneyinde anlamlı fark gösterirken, bulunan bu anlamlı fark ELISA yöntemi ile doğrulanamamıştır. ELISA yöntemi ile tespit edilen IL-8 seviyeleri; Kİ-MKH süpernatantlarda $257,3 \pm 325,6$ pg/mL; CD271+ KH süpernatantlarda $196,5 \pm 282,4$ pg/mL olarak bulunmuştur ($p=0,68$).

4.1.8. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler ve CD271+ Kök Hücreler, CD34+ Hematopoetik Kök ve Progenitör Hücre Çoğalmasını Desteklemektedir

Göbek KK'dan izole edilen CD34+ HKPH'ler; kontrol grubu olarak besleyici tabaka olmadan tek başlarına veya Kİ-MKH, CD271+ KH ve CD271++/CD45- KH besleyici tabakaları üzerinde 7 gün boyunca, serumsuz STIFA5 içeren hematopoetik hücre çoğaltma medyumunda kültüre edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. CD34+ hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin *in vitro* çoğaltılması. Ko-kültür sırasında mikroskop ile çekilen hücrelerin görüntülerini (4x) temsil etmektedir.

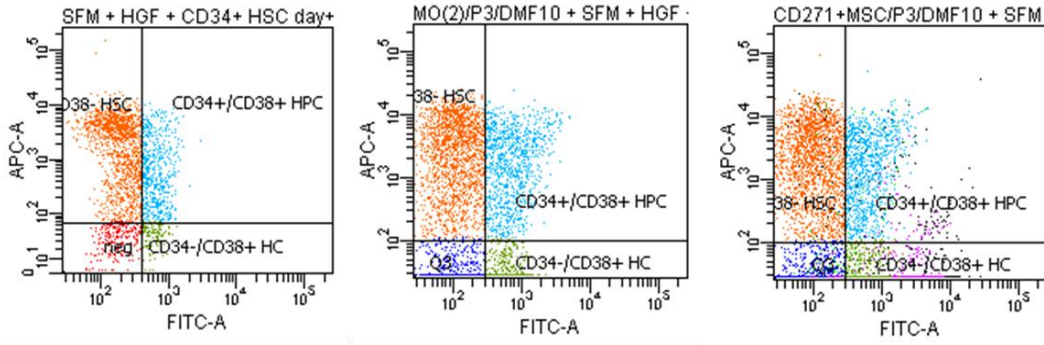
Tek başına kültür edilen CD34+ HKPH'lerde; $121,3 \pm 89,8$ kat çoğalma gözlenmiştir. Besleyici tabaka olarak kullanılan Kİ-MKH, CD271+ KH ve CD271+CD45- hücreler, CD34+ HKPH'lerin *in vitro/ex vivo* çoğalmasını daha fazla desteklemektedir. Kullanılan besleyici tabakalar *in vivo* niş koşullarına daha fazla benzerlik sağladığı için, HKH'lerin hem kök hücre özelliklerinin korunmasında hem de çoğaltılmasında önemli

rol oynadığı görülmektedir. Kİ-MKH'lerle yapılan ko-kültürler sonucunda $229,4 \pm 262,4$; CD271+ KH'lerle yapılan ko-kültürler sonucunda $306,4 \pm 180,8$ kat artış gözlenmiştir. Kontrol kültürlerden sonra, CD34+/CD38- HKH oranları $\%45,4 \pm 31,2$; CD34+/CD38+ HKPH oranları $\%12,5 \pm 8,5$ ve farklılaşmış CD34-/CD38+ hücre oranları $\%9,5 \pm 11,6$ 'dır. MKH ko-kültüründen sonra CD34+/CD38- HKH oranları $\%14,0 \pm 16,9$; CD34+/CD38+ HKPH oranları $\%13,8 \pm 20,6$ ve farklılaşmış CD34-/CD38+ hücre oranları $\%12,4 \pm 8,1$ 'dir. CD271+ KH ko-kültüründen sonra CD34+/CD38- HKH oranları $\%31,2 \pm 23,4$; CD34+/CD38+ HKPH oranları $\%15,8 \pm 22,8$ ve farklılaşmış CD34-/CD38+ hücre oranları $\%8,4 \pm 7,6$ 'dir.

Ex vivo hücre çoğaltılması sonrası HKH, HKPH ve farklılaşmış hücrelere ait elde edilen bilgiler ve popülasyonu ikiye katlama oranları (PD) aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 4.4). Yukarıda bahsedilen üç farklı şekilde çoğaltılan CD34+ hematopoetik hücrelere ait temsili bir akım sitometrisi plot görüntüsü aşağıda örnek olarak sunulmuştur (Şekil 4.11).

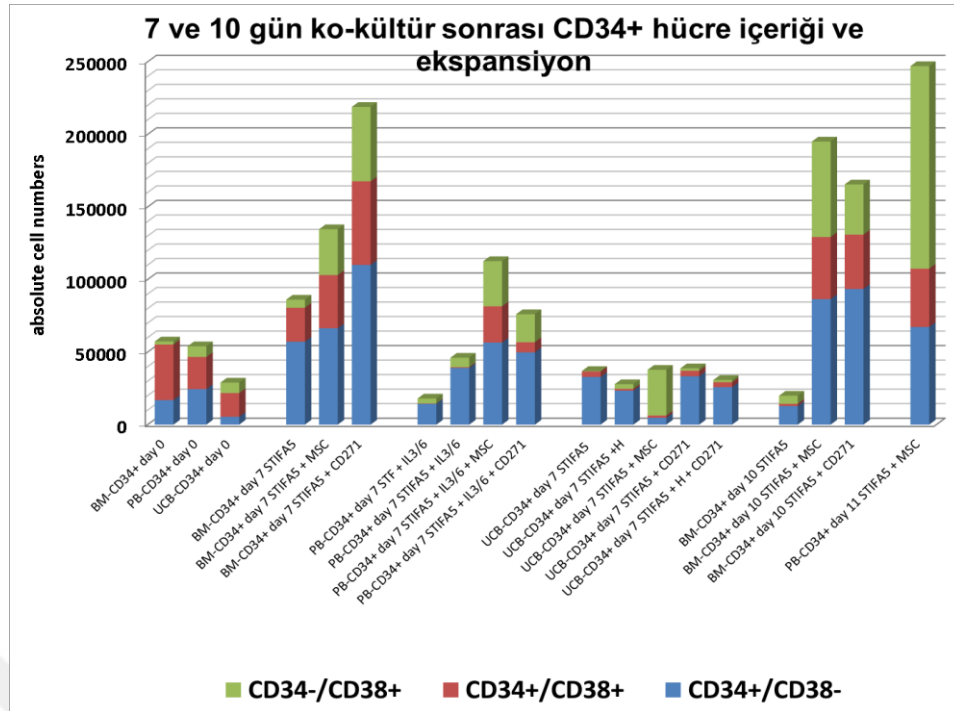
Tablo 4.4. Hücre çoğaltılması sonrası hematopoetik kök hücre fraksiyonlarının sayıları, yüzdeleri ve popülasyonu ikiye katlama oranları – temsili örnek sonucu.

Kültürler	Hücre sayısı	PD	CD34+/CD38-	PD	CD34+/CD38+	PD	CD34-/CD38+	PD
Ekilen hücre	1.0×10^4		2750 (27.5%)		6350 (63.5%)		340 (3.4%)	
Sadece SFM	9.6×10^4	3.26	57119 (59.5%)	4.38	23424 (24.4%)	1.88	5568 (5.8%)	4.03
+ PA-MKH	16.2×10^4	4.02	66420 (41.0%)	4.59	36612 (22.6%)	2.53	31590 (19.5%)	6.54
+ CD271+	28.8×10^4	4.85	110016 (38.2%)	5.32	57600 (20.0%)	3.18	51264 (17.8%)	7.24

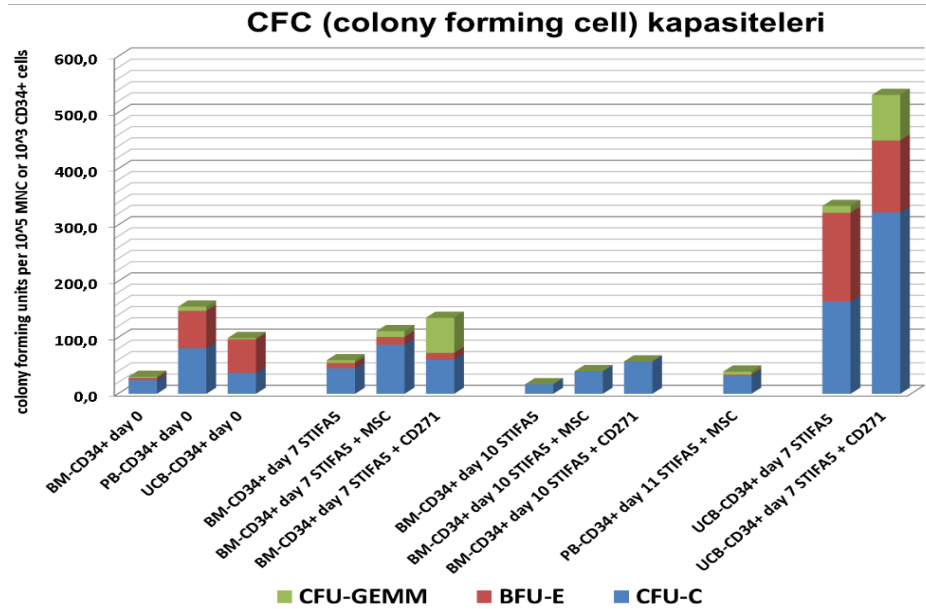


Şekil 4.11. Üç farklı koşullarda *ex vivo* çoğaltılan CD34+ hematopoetik hücrelerin akım sitometrisi plotları – temsili örnek sonucu. En sol: tek başına kültüre edilen CD34+ HKPH’leri, ortadaki plot: Kİ-MKH ile kültüre edilen CD34+ HKPH’leri ve en sağ plot: CD271+ KH ile kültüre edilen CD34+ HKPH’lerin plotlarını temsil etmektedir.

Ayrıca, ilk başlarda yapılan *ex vivo* hücre çoğaltılması optimizasyon deney çalışmaları için, hücreler hem 7 gün hem de 10 gün süresince kültüre edilmiştir. Böylelikle kültür süresinin, HKPH kalitesi ve çoğaltılması üzerine olan etkisi araştırılmaya çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda 10 gün süresince hücreleri kültüre etmenin daha fazla ek bir yarar sağlamadığı, 7 gün kültür ile daha iyi sonuçlar elde edildiği tespit edildiği için sonraki tüm deneylerde hücreler 7 gün süresince kültür edilmiştir. Kültür koşullarında kullanılacak olan sitokin kokteyllinin optimizasyonu çalışmaları da ilk deneylerde yapılmıştır. Örneğin; STIFA3, STF+IL-3/6 vb. farklı sitokin kokteylleri de denenerek, CD34+ HKPH’leri en iyi şekilde destekleyecek sitokin kombinasyonları üzerine çalışmalar da yapılmıştır. Bu paragrafta özetlenen bilgiler ve ko-kültürler sonrası CD34+ hücrelerin içerikleri ile çoğalma sonuçları aşağıdaki şekil üzerinde detaylı bir şekilde sunulmuştur (Şekil 4.12). Farklı koşullar altında çoğaltılan CD34+ hematopoetik hücrelerin, *in vitro* koşullarda HKH işlevini gösterebildiğini ve farklılaşabildiğini göstermek amacıyla; CFC deneyleri için hücreler methoculta ekilmiş ve hücre çoğaltılması sonrası elde edilen sonuçlar da aşağıdaki şekilde verilmiştir. Böylelikle kültür koşullarının HKPH’lerin koloni oluşturma (CFU-GM, CFU-GEMM, BFU-e) potansiyeli üzerine olan etkisi de tespit edilmiştir (Şekil 4.13).



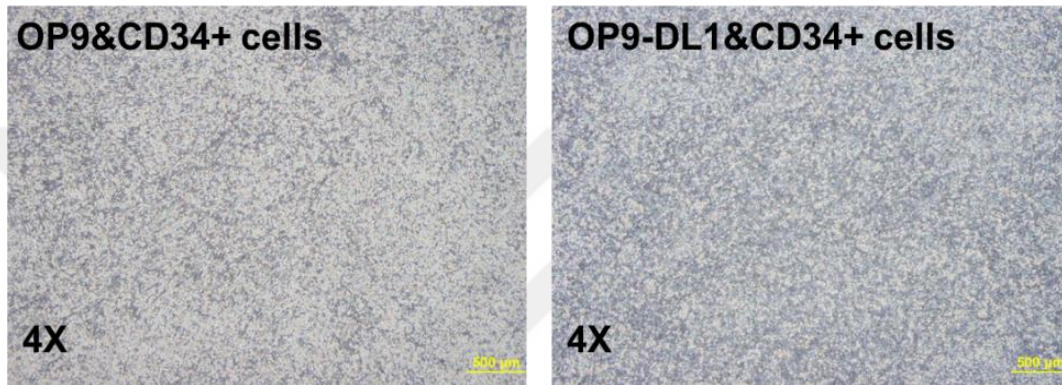
Şekil 4.12. 7 ve 10 gün süresince *ex vivo* çoğaltılan kemik iliği, periferik kan ve kordon kanı CD34+ hücrelerin sayıları. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda, hücre çoğaltılması deneylerinde STIFAS (STF, TPO, IGFBP2, FLT3L, ANGPTL5) sitokin kokteyli kullanılmıştır.



Şekil 4.13. 7 gün *ex vivo* çoğaltma sonrası CD34+ hematopoetik hücrelerin koloni oluşturma potansiyelleri.

4.1.9. CD271+ Kök Hücreler ile Ko-Kültür Yapılarak Çoğaltılan CD34+ Hematopoetik Kök ve Progenitör Hücreler *In Vitro* B/T Hücre Farklılaşma Potansiyeli Göstermektedir

Serumsuz besiyeri ve STIFA5 sitokin kokteyli varlığında, 7 gün süresince CD271+ KH besleyici tabaka ile ko-kültür yapılarak çoğaltılan CD34+ HKPH'ler; *in vitro* B hücre yönünde farklılaştırılması için Op9 hücre hattı üzerine ve T hücre yönünde farklılaştırılması için de Op9-DL1 hücre hattı üzerine ekilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Op9 ve Op9-DL1 hücre hattı üzerinde *in vitro* çoğaltılan CD34+ hücrelerin B ve T hücre farklılaşması. Sol: 7 gün CD271+ KH/HKPH ko-kültüründen sonra, HKPH'lerin Op9 hücre hattı üzerinde B hücre farklılaşması, Sağ: 7 gün CD271+ KH/HKPH ko-kültüründen sonra, HKPH'lerin Op9-DL1 hücre hattı üzerinde T hücre farklılaşması. Leica ışık mikroskobu görüntüleri, 4x büyütmede, hücrelerin boyanmadan fotoğrafı çekilmiştir.

65 gün süresince B ve T hücre farklılaşması takip edilmiştir. CD34+/CD10+ ve CD10+/CD19+ immatür B hücrelerin ilk gelişimi 30. günde saptanmıştır. CD34+/CD1α+ immatür T hücreler ise 30. günden itibaren tespit edilmiştir. En yüksek immatür T hücre (CD3+/CD4+/CD8+) yüzdesi; 60. günde gözlenmiştir (%2,5). 60. günde eşit oranda yardımcı T hücreleri (%1,5) ile sitotoksik T hücrelerinin (%1,5) gelişmeye başladığı da saptanmıştır. 30. güne kadar olan B hücre farklılaşmasının özeti aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 4.5). 65. Güne kadar takip edilen T hücre gelişiminin evreleri ise Tablo 4.6.'da verilmiştir. Bir sonraki sayfada ise; Op9 ve Op9-DL1 hücre hattı üzerinde B (CD10+/CD19+) ve T hücre (CD3-/CD4+/CD8+)

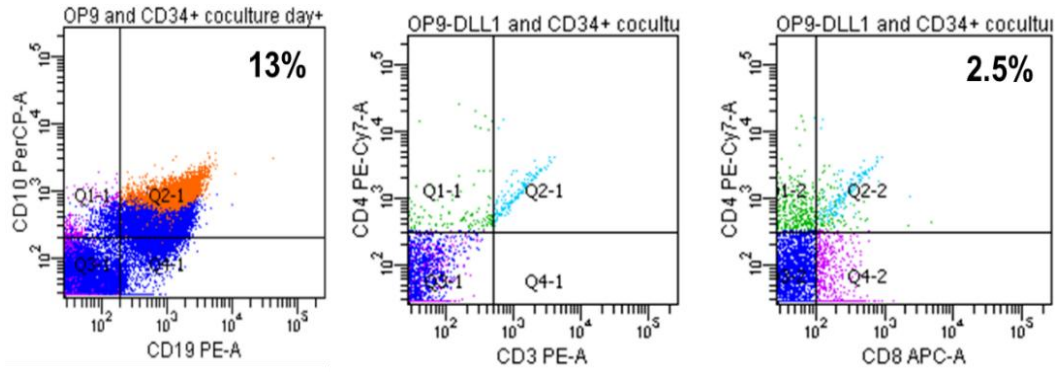
farklılaşmasına dair elde edilen, akım sitometrisi plot görüntüleri temsili olarak sunulmuştur (Şekil 4.15).

Tablo 4.5. 7 gün CD271+ kök hücre/CD34+ hematopoetik kök ve progenitör hücre ko-kültüründen sonra, hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin B hücre yönünde farklılaşması.

%	CD34+/CD38-	CD34+/CD38+	CD34-/CD38+	CD34+/CD10+	CD10+/CD19+
day +5	11,9	37,3	25	1,4	0,1
day+10	4,9	4,8	38,6	0,2	0
day+15	1,1	0,8	37,5	0,2	0
day+20	0,1	0	31,6	0	0,6
day+25	0,1	0	20	0,2	4,1
day+30	1,3	0,1	20,5	2,4	13,3

Tablo 4.6. 7 gün CD271+ kök hücre/CD34+ hematopoetik kök ve progenitör hücre ko-kültüründen sonra, hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin Op9-DL1 hücre hattı üzerinde T hücre yönünde farklılaşması.

%	CD34+/CD38-	CD34+/CD38+	CD34-/CD38+	CD34+/CD1a	CD3+/CD4+/CD8+	CD3+/CD4+/CD8-	CD3+/CD8+/CD4-
day +5	4,2	22,4	44,2	1,5	0	0,2	0
day+10	5,1	9,9	43,1	0,8	0	0,3	0,2
day+15	9,0	12,1	26,6	1,2	0	0,1	0,1
day+20	4,7	7,2	39,4	0,8	0,1	1,3	0
day+25	2,0	1,2	53,6	1,1	0,1	0,3	0,1
day+30	11,6	32,3	38,8	2,2	0,8	0,3	0
day+35	3,6	5,7	63,8	0,2	0,1	0,5	0
day+40	3,1	13,6	68,7	1,4	0,8	0,3	0,6
day+45	1,8	6,1	78,3	0,6	0,6	0,3	0,4
day+50	0,7	24,2	66,1	0,3	0,5	0,9	0,1
day+55	0,6	2,6	84,9	1,0	1,0	0,3	0,1
day+60					2,5	1,5	1,5
day+65	0,8	0,7	68,3	0,1	0,7	2	0,2



Şekil 4.15. Op9 ve Op9-DL1 hücre hattı üzerinde B (CD10+/CD19+) ve T hücre (CD3-/CD4+/CD8+) farklılaşması. Op9 hücre hattında, B hücre yönünde farklılaşması takip edilen CD34+ HKPH'ler; Sol: farklılaşmanın 30. gününde CD10+/CD19+ hücre oranı %13 olarak tespit edilmiştir (Q2-1), Orta ve Sağ: Op9-DL1 hücre hattında, T hücre yönünde farklılaşması takip edilen CD34+ HKPH'ler; farklılaşmanın 60. gününde CD3-/CD4+/CD8+ hücre oranı %2,5 olarak tespit edilmiştir (Q2-2). Her iki analiz için en az 10^4 hücre okutulmuştur.

4.2. Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu, Üretilmesi ve Karakterizasyonu

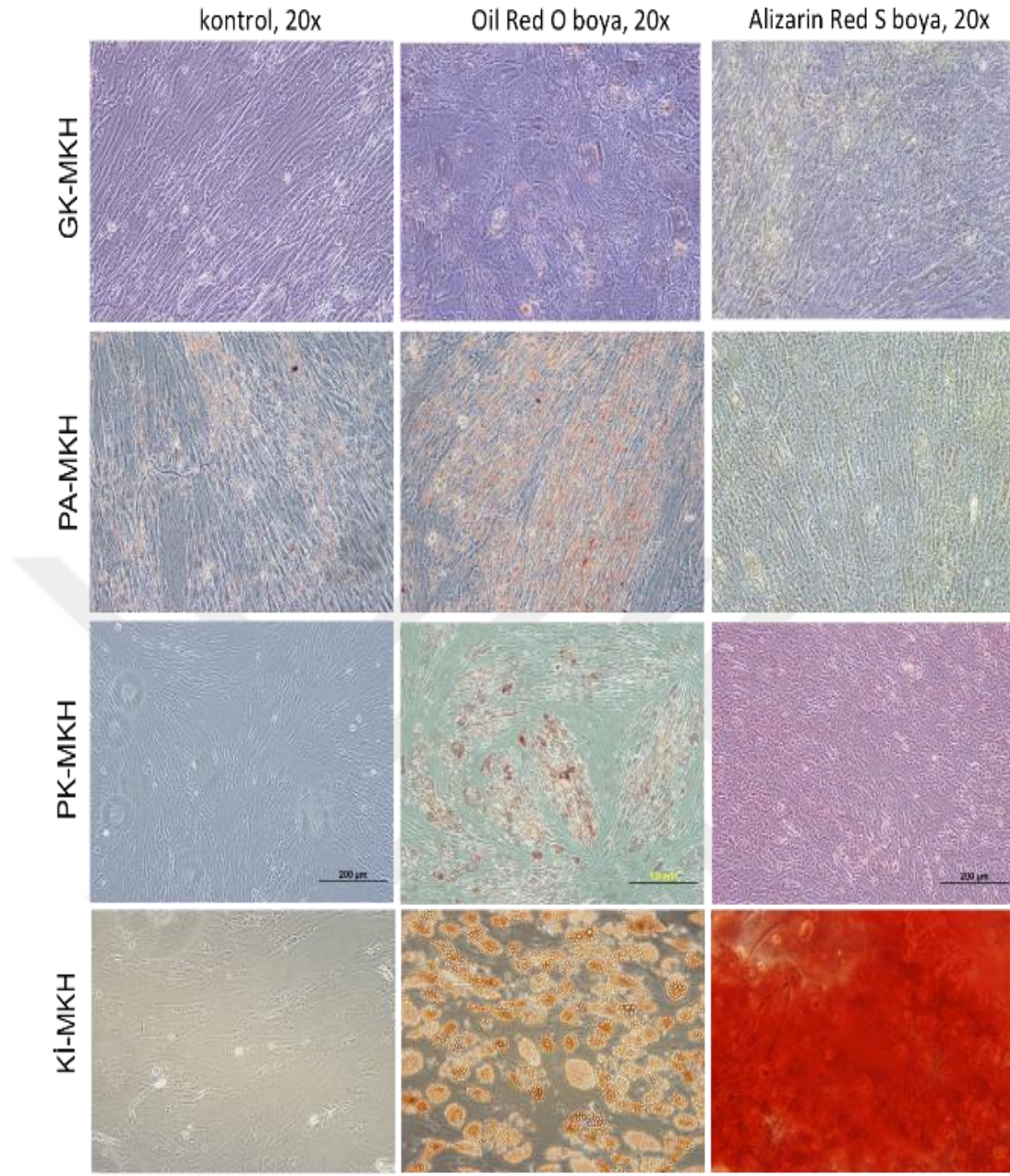
4.2.1 Fetal Doku CD271+ Hücrelerin CFU-F Kapasitesi Yoktur

Bu çalışma sırasında kullanılan ve toplanan PL/GK örnekleri, GO13-156 kayıt numaralı etik kurul kararları kapsamına uygun olarak çalışmaya alınmıştır. Amniyon zarları koryon zarlarından ayrıldıktan sonra, enzimatik yöntemler ile PA-MKH izolasyonu yapılmıştır. Kalan karışık olan plasenta dokularından (koryon ve desidua) ayrıca eksplant kültürleri yaparak PK-MKH elde edilmiştir. Taze gelen PK/desidua'daki CD271+/CD45- oranları %2'dir ve CD271 izolasyonundan sonra çoğu hücreler CD45+ hematopoetik kaynaklı olduğu için, yapılan izolasyonlarda CFU-F koloniler tespit edilmemiştir. PA-MKH'ler önce pasaj 3'e kadar çoğaltılmış ve sonrasında CD271 izolasyonu için kullanılmıştır. PA-MKH'lerin CD271 oranları ortalama %0,89'dir ve izolasyondan sonra CFU-F tespit edilememiştir. CD271+/CD45- oranları PL dokularında CFU-F kapasitesi içermediğinden dolayı, bundan sonraki çalışmalarda, PL

ve GK kaynaklı olan PA-MKH, PK-MKH, GK-MKH gruplarının sonuçları, Kİ-MKH ile karşılaştırılmalı olarak sunulacaktır.

4.2.2. Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli Düşüktür

Pasaj 3 PA-MKH, PK-MKH, GK-MKH'lerin farklılaşma sonuçları Şekil 4.16 ve Tablo 4.7'de sunulmuştur. PK-MKH ve GK-MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyelinin, *in vitro* koşullarda Kİ-MKH'lere kıyasla çok daha düşük olduğu saptanmıştır. Farklılaşma protokolü 42 güne kadar uzatıldığında hücrelerin daha iyi adipojenik ve osteojenik farklılaşma yaptığı tespit edilmiştir, ancak Kİ-MKH'lere kıyasla farklılaşmalarının daha az ve daha yavaş gerçekleştiği fark edilmiştir.



Şekil 4.16. Fetal doku mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli düşüktür.

Pasaj 3 PK-MKH, PA-MKH, GK-MKH ve Kİ-MKH'lerin farklılaşma deneylerine 21 gün devam edilmiştir. Adipojenik farklılaşma için ORO, osteojenik farklılaşma için ARS kullanılmıştır. Kİ-MKH'lere kıyasla, fetal dokulardan izole edilen MKH'lerin farklılaşma potansiyeli düşüktür. Fetal doku MKH'lerin farklılaşma deneyleri 42. güne kadar devam ettirilmesine rağmen, farklılaşmaları Kİ-MKH'ler kadar iyi olmamıştır.

Tablo 4.7. Farklı dokulardan izole edilmiş pasaj 3 mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli.

Ekilen hücre tipi	Adipo ORO (mg/mL)	Osteo Kalsiyum (mg/dL)
PA-MKH (n=9)	0,68 ± 0,51	5,27 ± 7,22
PK-MKH (n=7)	0,38 ± 0,29*	0,64 ± 1,18**
GK-MKH (n=5)	0,38 ± 0,09	1,99 ± 2,83*
Kİ-MKH (n=17)	0,57 ± 0,43	10,80 ± 6,39

Kİ-MKH kıyasla * p<0.05; ** p<0.01.

4.2.3. Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücre Kültürleri Heterojen Hücre Popülasyonlarından Oluşmaktadır

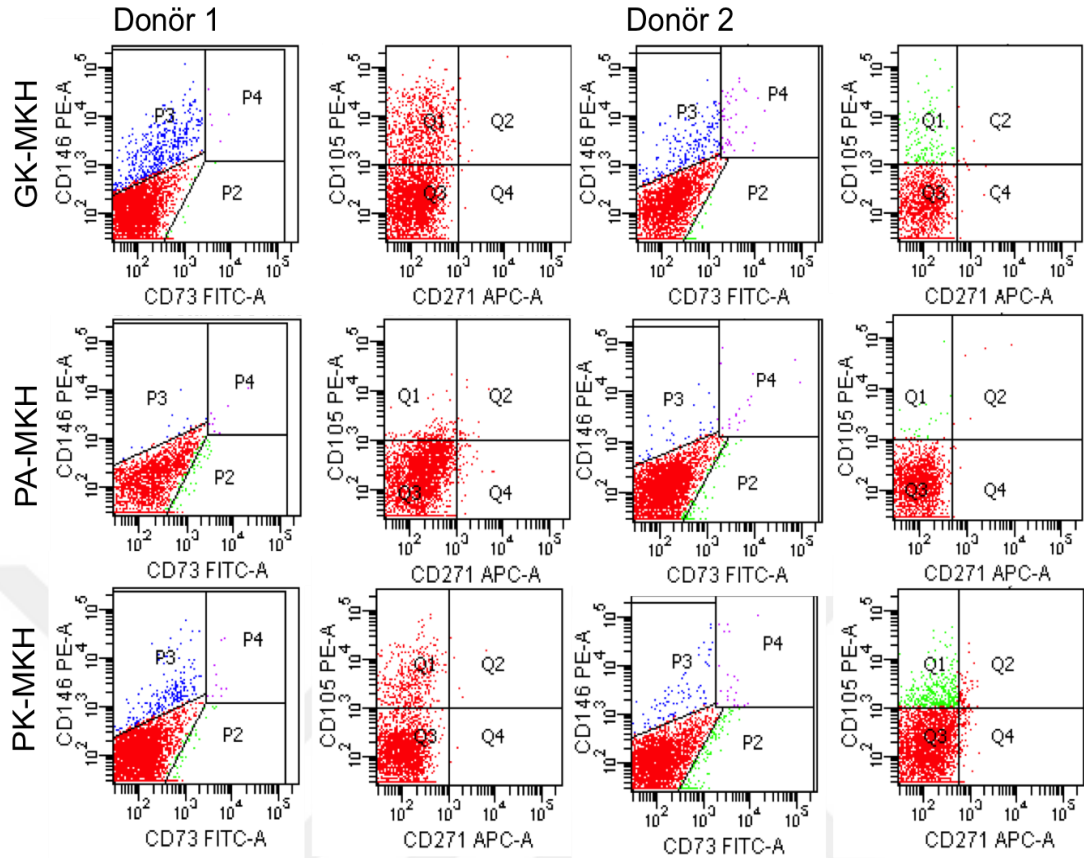
Özellikle PK-MKH ve GK-MKH kültürlerinde, bu hücre tiplerinin dışında başka adheran hücreler de tespit edilmiştir. PA-MKH, PK-MKH, GK-MKH'lerin akım sitometrisi analizleri yapılmıştır ve Kİ-MKH'lerle karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.8'de sunulmuştur. Fetal dokudan izole edilen MKH'lerin immünojenotipinin benzer olduğu, ancak tamamen aynı olmadığı anlaşılmıştır. İmmünojenotipik olarak, PL kaynaklı PA-MKH ve PK-MKH'ler birbirine yakın immünojenotip göstermiştir. Kİ-MKH'ler; CD44, CD90, CD105 ve CD166 antijenlerini, PL kaynaklı MKH'lere kıyasla daha yüksek seviyelerde ifade etmektedir. GK-MKH'lerin immünojenotipi ise diğer iki hücre grubundan çok farklıdır. GK-MKH'ler, Kİ ve PL-kaynaklı MKH'lere göre daha yüksek oranlarda CD90 ve CD29 ($p<0,05^*$) ifade ederken, CD200 seviyeleri de 3-4 kat daha yüksektir ($p<0,05^*$); ancak CD140b oranları çok daha düşüktür ($p<0,05^*$).

Toplam olarak analiz edilen PA-MKH, PK-MKH ve GK-MKH örnek sayıları 10'dur. Ancak, bazı fetal doku MKH örnekleri, MKH çalışma grubu tarafından belirtilen MKH'ler için gerekli olan minimal immünojenotip profiline uymadığından dolayı analiz dışında bırakılmıştır. Bu sebeple, Tablo 4.8'de sadece PK-MKH'lerin 10'undan 7'sine; GK-MKH'lerin 10'undan 8'ine ait sonuçlar verilmiştir. Kalite kontrolü geçemeyen örneklerdeki hücreler, tipik MKH belirteçleri olan CD73, CD90 ve CD105 için negatif veya düşük pozitiflik göstermektedir (Şekil 4.17). Ayrıca bir GK-MKH örneğinde, endotelial belirteç olan CD31 yüksek pozitifliği saptanmıştır. Bu örnekte aynı bebeğe ait GK'dan gelen HUVEC hücrelerinin GK-MKH kültürüne karıştığı düşünülmektedir. Bu nedenle; MKH kalite kontrolünü geçemeyen örnekler devam çalışmalarında ve analizlerde kullanılmamıştır (Şekil 4.17).

Tablo 4.8. Akım sitometrisi mezenkimal kök hücre immünojenotipi sonuçları (%).

MKH kaynağı	CD29	CD44	CD73	CD90	CD105	CD140b	CD146	CD166	CD200	CD271
PA-MKH (n=10)	96,4 ± 2,8	76,8 ± 20,6**	94,1 ± 8,9	87,0 ± 13,5**	83,0 ± 20,9**	69,8 ± 21,5	46,3 ± 37,1	70,7 ± 30,6**	17,7 ± 32,8	1,0 ± 1,4
PK-MKH (n=7)	96,7 ± 4,4	81,2 ± 18,0**	89,3 ± 15,0	79,6 ± 15,0**	94,1 ± 7,1	90,7 ± 5,1	49,7 ± 21,4	90,5 ± 5,9	13,0 ± 20,5	0,6 ± 0,5
GK-MKH (n=8)	99,5 ± 0,4*	60,0 ± 22,8**	81,4 ± 21,5**	99,6 ± 0,3	92,7 ± 9,2	31,1 ± 30,0**	46,1 ± 16,5	80,5 ± 21,8	44,9 ± 31,5**	0,5 ± 0,6
Kİ-MKH (n=30)	94,1 ± 7,3	92,3 ± 5,8	95,9 ± 5,9	98,5 ± 1,9	96,2 ± 5,3	78,6 ± 21,0	45,9 ± 26,2	91,7 ± 10,6	9,6 ± 8,0	2,0 ± 2,7

Kİ-MKH kıyasla * p<0,05; ** p<0,01.



Şekil 4.17. Karışık hücre türlerini içeren fetal doku kültürlerinin akım sitometrisi analizi. Sol: Donör 1; Sağ: Donör 2. Bu iki tane donörden izole edilen PL ve GK kaynaklı hücreler tipik MKH belirteçleri olan CD73 ve CD105 için negatif veya düşük pozitifdir. Kalite kontrolü geçemeyen hücreler devam çalışmalarında kullanılmamıştır.

4.2.4. Kemik İliği ve Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücrelerinin

İmmünomodülatuar Molekül İfadeleri

Fetal doku MKH'ler ve Ki-MKH'lerin immün modülatuar yüzey belirteçlerine bakılmıştır ve sonuçlar Tablo 4.9'da sunulmuştur. Genel olarak, tüm immünomodülatuar yüzey belirteç oranlarının ifadeleri Ki-MKH'lerde en yüksek seviyelerinde bulunurken; en düşük ifadeler ise GK-MKH'lerde tespit edilmiştir. HLA-G ifadeleri; Ki-MKH'lerde en yüksek, PA-MKH ve PK-MKH'lerde orta seviyede ve GK-MKH'lerde en düşük oranlarda tespit edilmiştir. Fas-L ifadeleri; en çok Ki-MKH ve PA-

MKH'lerde görülmektedir. PA-MKH ve PK-MKH'ler; immün modülatuar yüzey belirteçleri bakımından benzer bir profil göstermektedir.

Tablo 4.9. Fetal doku ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin immünomodülatuar molekül ifadeleri (%).

MKH kaynağı	HLA-DR	HLA-ABC	HLA-G	CD95/FasR	CD178/FasL
PA-MKH (n=10)	2,0 ± 3,9	84,7 ± 14,0	6,8 ± 9,2*	1,9 ± 2,6*	60,2 ± 29,1*
PK-MKH (n=7)	0,6 ± 0,6	90,7 ± 6,2	7,5 ± 7,8&	1,1 ± 1,0&	23,2 ± 13,8&
GK-MKH (n=8)	0,5 ± 0,8	58,8 ± 33,7	1,1 ± 0,6&	1,2 ± 1,1&	6,3 ± 6,5&
Kİ-MKH (n=30)	2,5 ± 7,0	91,0 ± 11,2	15,9 ± 18,1#	3,1 ± 3,7#	99,0 ± 0,9#

* n=6; & n=4; # n=2

4.2.5. Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin Proliferasyon Hızı Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerden Yüksek

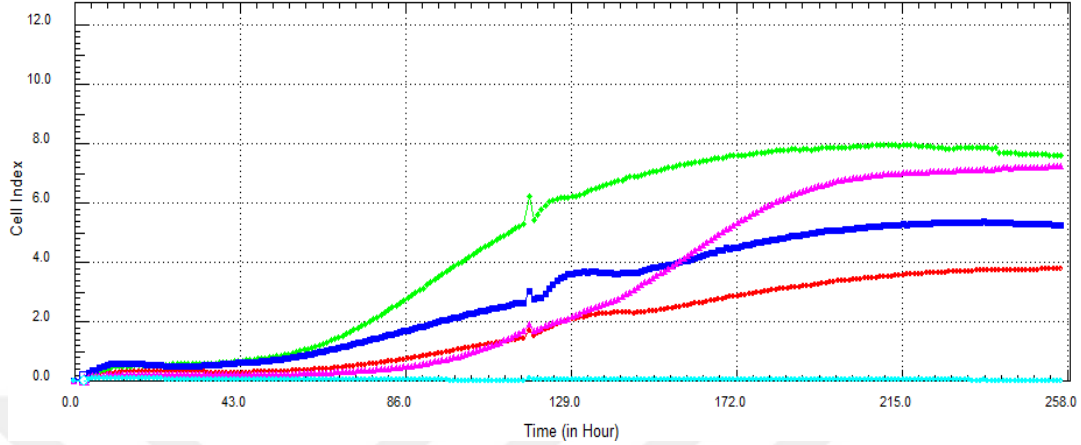
Her pasaj sonunda, MKH'lerin ikiye katlanma oranları (population doublings/PD) hesaplanmıştır (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Fetal doku ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin pasaj sonrasındaki ikiye katlanma oranları.

Ekilen hücre tipi	P1	P2	P3	P4	P5
PA-MKH (n=10)	3,12	3,63	3,89	3,99	2,71
PK-MKH (n=8)	3,64	3,37	3,33	2,81	2,89
GK-MKH (n=10)	3,66	3,79	3,43	4,02	3,37
Kİ-MKH (n=10)	3,56	3,38	3,06	2,82	2,75

xCELLigence Hücre Analiz Sistemi (Roche) kullanılarak, ayrıca MKH'lerin gerçek zamanlı proliferasyon hızı 10 gün boyunca takip edilmiştir (Şekil 4.18). PA-MKH'lerin proliferasyon hızı diğer kaynaklara göre daha yüksektir ve 172 saat inkübasyondan sonra büyüme platosuna ulaşmış (lacivert); PK-MKH'lerin proliferasyonu yavaş başlayıp 6. günden sonra bir hızlanma saptanmış ve 8.nci günden sonra büyüme platosuna ulaşmış (turuncu); GK-MKH'ler ise orta hızda

proliferasyon göstermiştir (pembe) (Şekil 4.18). Ancak tüm fetal kaynaklı (PA, PK, GK) MKH'lerin proliferasyon hızı, erişkin kaynaklı Kİ-MKH'lerden daha hızlıdır.

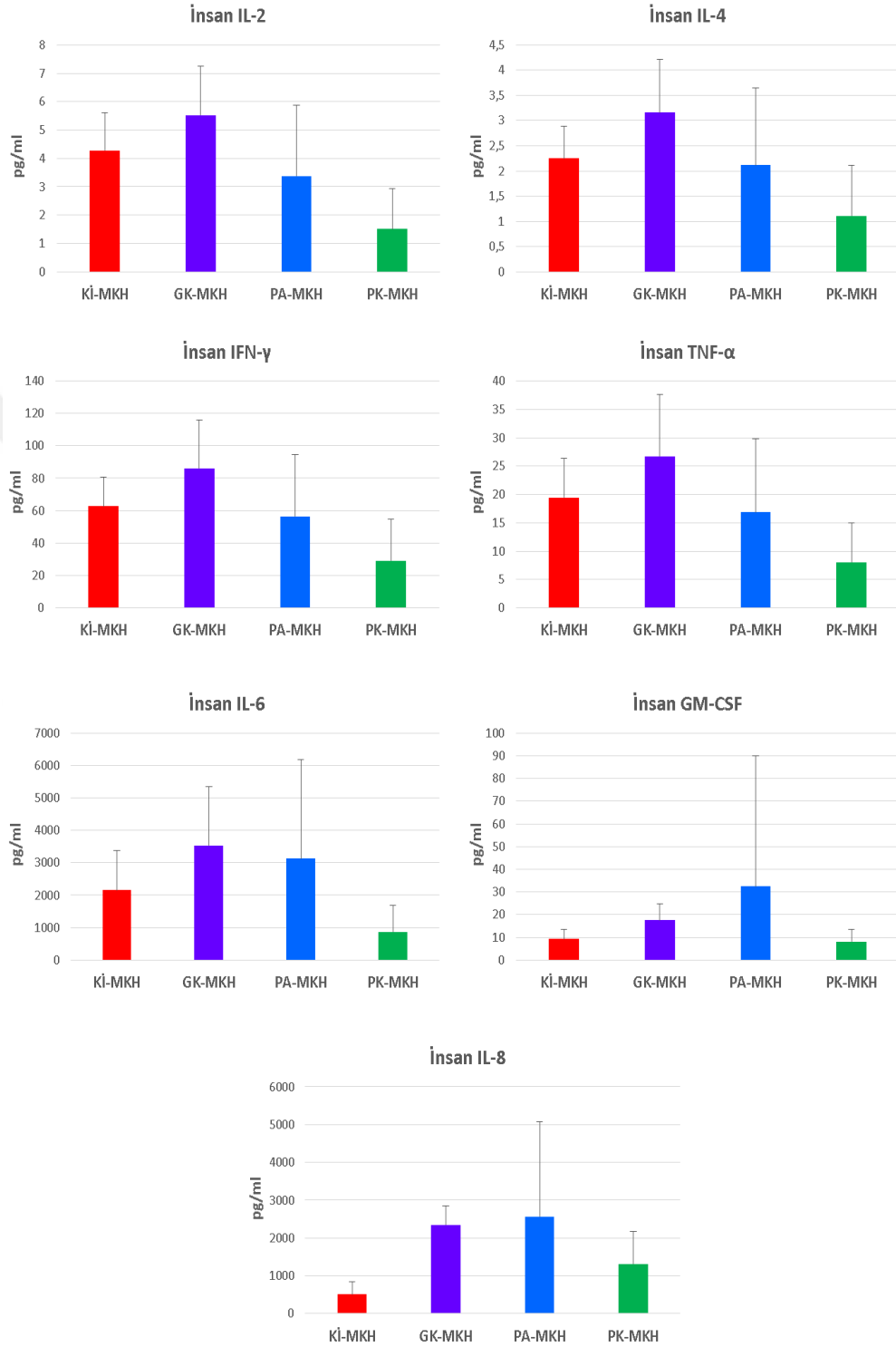


Şekil 4.18. Fetal doku ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin gerçek zamanlı proliferasyon analizi. xCELLigence Sistemi (Roche) kullanılarak, fetal doku ve Kİ-MKH'lerin proliferasyon hızı 10 gün boyunca gerçek zamanlı takip edilmiştir. 5'inci günde medyumlar tazelenmiştir (zirveler). Açık mavi: hücre içermeyen kontrol medyumları olan DMF10'yu (n=3); Koyu mavi: GK-MKH'leri (n=3); Pembe: PK-MKH'leri (n=3); Kırmızı: Kİ-MKH'leri (n=4); Yeşil: PA-MKH'leri (n=3) temsil etmektedir.

4.2.6. Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücreler, Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelere Göre Yüksek Oranda IL-8 Salgılamaktadır

Fetal doku ve Kİ-MKH'lerin süpernatantlarına salgılanan sitokin seviyeleri Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 8-plex Assay (BioRad #M50000007A) ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.19). IL-10'nun standartı, kalite kontrolü geçmediği için sonuçlar değerlendirmeye alınmamıştır. GM-CSF'in dışında diğer tüm sitokinlerin en yüksek oranları GK-MKH süpernatantlarında saptanmıştır. IL-8 dışında diğer tüm sitokinlerin en düşük oranları, PK-MKH süpernatantlarında bulunmuştur. Tüm fetal doku MKH'lerin IL-8 salınımı ($2112,49 \pm 1628,66$ pg/mL) Kİ-MKH'lerden ($379,87 \pm 343,31$ pg/mL) daha yüksek çıkmıştır ($p < 0.0001$). Multiplex sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunan IL-8 sitokini için, fetal doku ve Kİ-MKH'lerin süpernatantları

ELISA yöntemi ile de kontrol edilmiştir. Fetal doku MKH'ler Kİ-MKH'lere kıyasla, daha yüksek düzeyde IL-8 salgılamaktadır. Sonuçlar Tablo 4.11'de sunulmuştur.



Şekil 4.19. Fetal doku ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin multipleks sitokin array sonuçları.

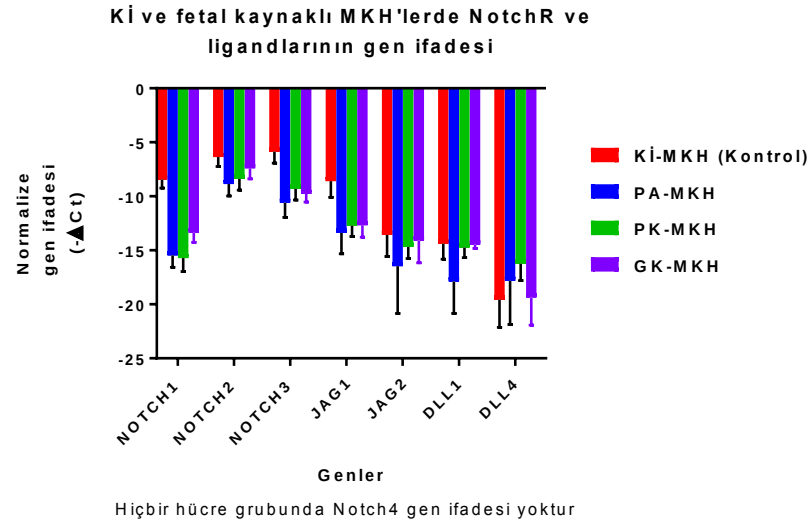
Tablo 4.11. Fetal doku ve kemik iliği mezenkimal kök hücre kültür süpernatantlarında saptanan IL-8 düzeyleri.

MKH kaynakları	Ortalama $\pm$ standart sapma (pg/mL)
Kİ-MKH	257,3 $\pm$ 325,6
PK-MKH	649,3 $\pm$ 585,9*
PA-MKH	1047,0 $\pm$ 459,1**
GK-MKH	1215,7 $\pm$ 45,5***

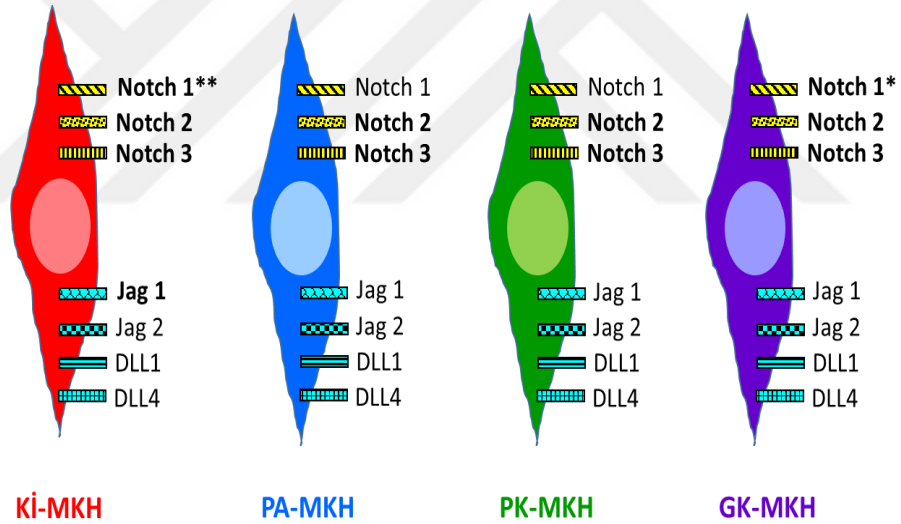
* p<0.05; ** p<0.001; *** p<0.00001

4.2.7 Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin *NOTCH* ve *JAG* İfadeleri Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelere Göre Daha Düşüktür

Fetal doku ve Kİ-MKH'lerde (n=6); *NOTCH 1*, *2*, *3* ve *4* reseptörleri ile ligandları olan *JAG1*, *JAG2*, *DLL1*, *DLL4* genlerinin ifade profilleri incelenmiştir. Kİ-MKH'ler *NOTCH 1*, *2*, *3* ve *JAG1* genlerini, fetal doku MKH'lere göre daha yüksek seviyelerde ifade etmektedir (p<0,0001). *NOTCH 4* gen ifadesi hiç bir grupta saptanmamıştır (Şekil 4.20). *NOTCH* reseptör ve ligandlarının gen ifadeleri, fetal doku MKH'lerde benzer düzeyde tespit edilmiştir. Fetal doku MKH'ler arasında anlamlı farklar sadece *NOTCH 1* ifadelerinde bulunmuştur: GK-MKH'lerde (n=5), PA-MKH (n=7) ve PK-MKH'lere (n=5) kıyasla daha yüksek *NOTCH 1* gen ifadeleri bulunmuştur (p<0,05). Kİ-MKH'lerde, tüm fetal doku MKH'lerine oranla daha yüksek düzeyde *NOTCH 1* gen ifadeleri tespit edilmiştir (p<0,0001) (Şekil 4.20). Fetal doku ve Kİ-MKH'lerde tespit edilen *NOTCH* reseptör ve ligand gen ifadeleri Şekil 4.21'de şematik olarak sunulmuştur.



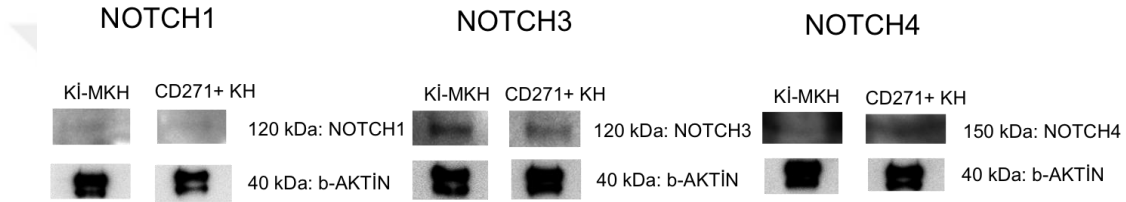
Şekil 4.20. Fetal doku ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerde *NOTCH* reseptör ve ligandlarının gen ifadeleri.



Şekil 4.21. Fetal doku ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerde *NOTCH* reseptör ve ligandlarının gen ifadeleri şeması. *: yüksek gen ifadesi, **: en yüksek gen ifadesi, koyu ile işaretliler: daha yüksek gen ifadesini temsil etmektedir.

4.2.8. Kemik iliği Mezenkimal Kök Hücrelerde ve CD271+ Kök Hücrelerde NOTCH1 ve NOTCH3 Protein İfadeleri Benzerdir

Kİ-MKH ve CD271+ KH'lerde NOTCH1, NOTCH3 ve NOTCH4 proteinlerinin ifadelerine Western blot yöntemi ile bakılmıştır. Elde edilen Western blot görüntüleri Şekil 4.22'de sırasıyla sunulmuştur. NOTCH1 ve NOTCH3 protein ifadeleri Kİ-MKH ve CD271+ KH gruplarında benzerlik göstermektedir (Şekil 4.22). Ancak, çeşitli Western Blot, boyama, ölçme ve bloklama optimizasyonlarının yapılmasına rağmen Kİ-MKH ve CD271+ KH'lerde NOTCH4 protein ifadeleri tespit edilememiştir.



Şekil 4.22. Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerde ve CD271+ kök hücrelerde NOTCH1, NOTCH3 ve NOTCH4 protein ifadeleri. Proteinler; anti-NOTCH1, NOTCH3 ve NOTCH4 primer antikörlerle inkübe edilmiştir. Sekonder antikör olarak anti-keçi-HRP kullanılmıştır. Membranların görüntüleri FluorChem FC3 (Proteinsimple) cihazında alınmıştır. NOTCH1 (120 kDa) ve NOTCH3 (120 kDa) proteinlerinin bantları beklenen yerlerinde tespit edilmiştir. Kontrol olarak b-AKTİN kullanılmıştır.

4.2.9. NSGW41 Fare Deneyi *In Vivo* Sonuçları

Serumsuz kültür besiyerinde STIFA5 kokteyli varlığında, Kİ-MKH ve CD271+ KH besleyici tabakaları üzerinde 7 gün süresince çoğaltılan CD34+ HKPH'lerin homing, engraftman kapasitesini ve *in vivo* lenfohematopoeze olan etkisini görmek amacıyla, 3×10^5 çoğaltılan HKPH tek başına (Kontrol grubu) ve/veya Kİ-MKH veya CD271+ KH'lerle birlikte NSGW41 farelerine kuyruk veninde iv enjekte edilmiştir. Nakil sonrası birinci ve altınca ayda farelerden periferik kan toplanmış ve altıncı ayda fareler kurban edildikten sonra periferik kanın yanı sıra, dalak ve Kİ'nde insan hücrelerinin sayılarına ve oluşumuna bakılmıştır. Kültür edilmemiş, taze KK hücreleri nakil edilen

iki fareden birinde insan hücreleri engraftman olurken, diğerinde olmamıştır. Birinci fare (BC63/3-1)'nin beyaz hücre sayıları ve trombosit sayıları nakilden 6 ay sonra $0,8 \times 10^6$ ve 1276×10^6 iken; diğerinin (BC63/3-2) beyaz hücre ve trombosit sayıları $3,6 \times 10^6$ ve 637×10^6 olarak tespit edilmiştir. Bu farelerde %0,8 ve %12,5 oranında insan CD45 tespit edilmiştir. STIFA5 ortamında kültür edilen CD34+ HKPH'leri alan farenin (n=1) beyaz küresi $1,7 \times 10^6$ ve trombosit sayıları 1124×10^6 olarak sayılmıştır, insan CD45 oranları ise %0,7 olarak saptanmıştır. MKH tabakası ile STIFA5 ortamında kültür edilen CD34+ HKPH'leri alan farenin (n=1) beyaz küresi $2,1 \times 10^6$ trombosit sayıları 1215×10^6 , insan CD45 oranları %0,6'dır. Bu durumda her iki farede yetersiz düzeyde insan hücre engraftmanının olduğu anlaşılmıştır ve verilen hücre sayısının yeterli olmadığı düşünüldüğünden bundan sonraki fare deneylerine $>5 \times 10^5$ çoğaltılan hücreler ile devam edilmesine karar verilmiştir. Tüm deneyler 5×10^5 Kİ-MKH veya CD271+ KH'ler üzerinde çoğaltılan HKPH'ler ile tekrar edilmiştir, ancak fareler idare sıkıntılarından dolayı hayatlarını kaybetmiştir ve deneyler yetersiz fare sayılarından dolayı tekrar edilememiştir.

4.2.10. Mikoplazma ve Endotoksin Testleri Sonuçları

Kültür sonrası yıkanan deney gruplarından ayrılan bir kısım süpernatant örneğinden gerçekleştirilen, endotoksisite (duyarlılık: 0,125 EU/mL) ve mikoplazma belirleme test sonuçları negatiftir. Çalışmalara sadece mikoplazma negatif olan hücreler alınmıştır.

5. TARTIŞMA

MKH'ler, rejeneratif ve restoratif tıbbi uygulamalar açısından büyük önem taşımaktadır ve hücreyel tedavilerin temelini oluşturmaktadır [259]. Kİ-MKH'ler, HKH işlevi ile bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde ve doku tamirinde önemli bir rol oynamaktadır [260]. Bugüne kadar CD73, CD90 ve CD105 belirteçlerini ifade eden hücreler MKH olarak kabul edilmektedir [261, 262]. Ancak bu belirteçleri eksprese eden ve plastik aderan özellik gösteren MKH olarak kabul edilen hücreler; *in vitro* koşullarda, kültüre edildiklerinde heterojen bir hücre popülasyonundan oluşmaktadır [263]. Halen, bilinen ve MKH karakterizasyonunda kullanılan bu belirteçlerin; homojen MKH'lerin izolasyonundaki yararı henüz bilinmemektedir. CD271'in saf MKH izolasyonunda en etkin belirteçlerden biri olduğu gösterilmiştir [153, 264, 265]. O nedenle, bu tez çalışması kapsamında; 1) CD271 antijeni kullanılarak Kİ'nden MKH izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır; 2) Bu yöntem kullanılarak Kİ'nden izole edilen aderan KH'lerin, plastiğe aderan Kİ-MKH'ler ile CFU-F koloni sayısı, immün profili, proliferatif ve farklılaşma kapasiteleri kıyaslanmıştır; 3) CD271 antijeninin, Kİ dışında başka, çeşitli fetal dokulardan saf MKH izolasyonu için kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmıştır; 4) Kİ-kaynaklı MKH ve CD271+ KH'lerin fonksiyonu ve lenfohematopoetik desteği karşılaştırılmıştır; ve 5) tüm erişkin ve fetal dokulardan izole edilen MKH'lerin *in vitro* lenfopoetik farklılaşma desteğini incelemek için gerekli NOTCH reseptör ve ligandların gen ve protein ifadeleri araştırılmıştır ve sonuçları güncel bilimsel literatüre göre tartışılmıştır. Tez kapsamında elde edilen ön bilgilere göre aşağıda belirtilen plan doğrultusunda ilk olarak; Kİ-MKH ve CD271+ KH sonuçlarının tartışılması, sonraki bölümlerde ise Kİ-MKH ile fetal doku MKH'lerin (PA-MKH, PK-MKH, GK-MKH'lerin) sonuçlarının tartışılması detaylı bir şekilde yapılacaktır.

5.1. CD271 Antijeni Kemik İliğinden Saf Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonunda Kullanılabilmektedir

Bugüne kadar MKH'lerin hangi belirteç ya da antijen kullanılarak izole edilmesine yönelik birçok çalışma yapılmıştır; ancak MKH'lerin prospektif izolasyonu için hangi belirteçin en uygun olduğu hala tartışılmaktadır. Bu tez çalışmasının ilk

aşamasında, Kİ-MKH'lerin izolasyonunda CD271'in önemi daha detaylı olarak araştırılmıştır. Daha önce CD271+ KH'lerin tüm Kİ CFU-F kapasitesini içerdiği ve CD133+ HKH'ler ile beraber nakil edildiğinde, farelerin immünohematopoezini daha iyi desteklediği gösterilmiştir [15]. Çalışmalarımız sonucunda, Kİ'nden elde edilebilen CD271+ KH oranlarının çok düşük olduğunu ve Kİ mononükleer fraksiyonunda sadece %0,5 oranında CD271+/CD45- hücre bulunduğunu göstermiş bulunmaktayız. Bu sebeple, klinikte CD271+ KH'leri kullanabilmek ve yeterli hücre sayılarını elde edebilmek için, toplanacak Kİ başlangıç hacminin büyük önem taşıyacağını düşünmekteyiz. Klasik yöntemlerde MKH'ler plastik aderan kapasiteleri kullanılarak elde edilmektedir. Ancak, bu yöntem ile aynı zamanda diğer, monositler, adipositler, osteoblastlar ve endotelial hücreler gibi, tüm Kİ'nde bulunan yapışabilen hücreler de elde edilmektedir. Dolayısıyla sadece plastik aderan özelliklerine göre izole edilen Kİ-MKH'ler saf hücre popülasyonundan oluşmamakta ve daha da önemlisi ana MKH'lerin özelliklerini yansıtmamaktadır [266]. Buna rağmen, kullanılan hücre kültür yöntemi ile birkaç pasajdan sonra, çoğalmayan hücrelerin sayıları azalmakta ve hızlı çoğalan MKH'ler artmakta ve böylelikle daha "saf" bir hücre popülasyonu haline gelmektedir.

Kİ-MKH'lere kıyasla, CD271+ KH'lerin CFU-F kapasitesi yaklaşık 53 kat daha fazladır. Ayrıca, bu tez çalışmasında ve diğer çalışmalarda da CFU-F kapasitesine sahip olan tüm hücrelerin sadece CD271+ fraksiyonda yer aldığı gösterilmiştir [60, 267]. Bunun aksine, CD271-, CD271-/CD45- ve CD271+/CD45+ fraksiyonları hiç plastik aderan hücreler içermemekte ve CFU-F'ler oluşmamaktadır. İlk izolasyondan sonra, CD271+ KH'lerden oluşan CFU-F'ler, Kİ-MKH'lere göre daha geç gelişmektedirler. Ancak, geliştirildikten sonra CD271+ KH'lerin *in vitro* proliferasyon hızı, xCELLIGENCE yöntemi ile incelendiğinde Kİ-MKH'ler ile benzerlik göstermektedir. CD271+ KH'lerin kültür sırasında daha geç ortaya çıkma sebeplerinin; hücrelerin çoğunlukla G0 fazında olabileceğinden, hücrelerin yapışması ve kültüre adapte olması için bazı yüzey antijenlerinin daha geç upregüle olabileceğinden, ayrıca da G0 fazından çıkıp bölünme ve çoğalma evresine girebilmesi için daha fazla zamana ve belki de *in vivo*

nişteki çevre koşullarına, 3 boyutlu bir ortama daha fazla ihtiyaç duyduğundan kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz.

Kİ-MKH'lerin ana hücresi olduğu düşünülen CD271+ KH'lerin CFU-F oluşturma kapasitesi yüksektir ve CD271 antijenine dayalı yapılan prospektif izolasyon sonrasında Kİ'nden saf bir kök hücre popülasyonu elde edilebilmektedir. Kültüre edilen MKH'ler, *in situ* MKH'lere kıyasla her zaman yüzey antijenlerini aynı seviyede ifade etmemektedirler. Örneğin; kültür sırasında CD44, CD166 ve CD318 ifadeleri *in situ* MKH'lere göre artmaktadır. Ancak CD271+ KH izolasyonu sonrasında, *in vitro* kültür sırasında CD271+ ifadesi hızlı bir şekilde azalmakta ve hem Kİ-MKH hem de CD271+ KH'lerin devam kültürlerinde düşük seviyelerde CD271+ hücreler tespit edilebilmektedir [60]. Bu hem Kİ-MKH'ler hem de CD271+ KH kültürlerinde bulunan, CD271+ ifadeleri azalmayan CD271+ hücrelerin, küçük bir "ana" kök hücre grubu olarak kültürlerde devamını sağlayan hücreleri temsil ettiğini düşünmekteyiz. Bunun sebebinin, *in vitro* koşullardaki gerekli sinyal ve hücre-hücre etkileşimlerinin yokluğundan kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenlerle, CD271 antijeninin saf Kİ-MKH izolasyonu için etkin bir belirteç olduğu; ancak kök hücre takibi için uygun olmadığını düşünmekteyiz. *In vitro* kültür koşullarına bağlı azalan CD271 oranını ve CD271'in etkinliğini araştırmak için pasaj 3'e kadar çoğaltılan CD271 antijeni kullanılarak elde edilen KH'lerden tekrar CD271 KH izolasyonu yapılmıştır. Ancak, bu hücreler sort yönteminden sonra yeterli saflık değerlerine ulaşamamışlardır ve geri ekildiğinde CFU-F kapasitesi ve farklılaşma kapasiteleri değerlendirilememiştir. Bu sorunu aşmak için, CD271'i overeksprese eden kök hücrelerin geliştirilmesi ile, bu hücrelerin proliferasyon, farklılaşma ve hematopoetik destek kapasitelerinin değerlendirilmesinin yarar sağlayacağını ve belki de bu yöntemle klinikte kullanabilmek üzere daha efektif bir CD271+KH grubunun elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

5.2. CD271 Antijeninin Fetal Dokulardan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonundaki Önemi

Kİ-MKH'lerin eldesi için invazif olan Kİ aspirasyonu süreci gerekli olduğundan rejeneratif tıpta Kİ-MKH'lere alternatif olarak, etik sorun teşkil etmeyen, kolay

ulaşılabilen ve hastalar için risk olmayan, invazif bir yöntem gerektirmeyen MKH kaynakları aranmaktadır [268]. MKH'ler Kİ'nin dışında PL ve GK gibi dokulardan da izole edilebilmektedir [269, 270]. PL ve GK genelde tıbbi atık olarak atılmaktadır [271]. Ancak yapılan çalışmalar sonrasında, bu dokuların zengin bir MKH kaynağı olduğu gösterilmiştir. Fetal dokulardan izole edilen MKH'lerin çoğalma ve farklılaşma potansiyelleri fazladır ve toplama süreçleri Kİ aspirasyonuna kıyasla daha kolay ve verimliğı yüksektir [271, 272]. Bu sebeple, fetal doku kaynaklı MKH'ler, Kİ-MKH'lere alternatif hücreler olarak rejeneratif potansiyelleri bakımından araştırılmaktadır [272, 273]. Fakat, fetal dokudan izole edilen hücreler karışık hücre popölasyonlarından oluşabilmektedir [272, 274] ve bu dokulardan saf MKH'leri izole edebilmek için bilinen eksplant veya enzimatik izolasyon prosedürlerinden daha yeni, etkin yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu bağlamda, bu tez çalışmasının ikinci aşamasında CD271 antijeni kullanılarak fetal dokulardan saf MKH'lerin elde edilebilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışma kısmının asıl amacı, Kİ'nin yanı sıra fetal dokulardan doğrudan MKH'lerin izolasyonunda CD271 antijeninin kullanımının ve etkinliğinin karşılaştırılmasıdır. Ancak, fetal kaynaklı dokulardan CD271+ hücre seleksiyonu sonrası pürifikasyon verimliliğinin düşük olduğunu, izole edilen CD271+ hücrelerin çoğunun ayrıca hematopoetik belirteç olan CD45'i ifade ettiğini ve bu hücrelerin stromal kökenli olmadığını, dolayısıyla da CFU-F kapasitesini içermediğini, bu sebeple de adheran ve kültürde geliştirilebilen hücrelerin çıkmadığını tespit etmiş bulunmaktayız. Bu bakımdan, CD271 antijeninin kültür öncesi fetal doku MKH izolasyonu için uygun bir belirteç olmadığı düşünöldüğünden, bir sonraki deneylerde fetal doku MKH'lerin izolasyonu için sadece enzimatik yöntemler ve hücrelerin adezif kapasite özellikleri kullanılmıştır ve bu yöntemle fibroblastik görünüme sahip adheran MKH kültürleri yapıp hücreler çoğaltılabilmekmiştir. Bazı araştırmacılar da, GK-MKH'lerde CD271+/CD45- hücre grubunu saptamamıştır [133] ve PL kaynaklı MKH'lerin CD271 ifade etmediğı göstermiştir [275]. Bu tez çalışmasında, CD271 antijeninin PL'de ifade edildiğı; ancak hücrelerin CD45+ olduğunu ve CD271 antijeninin dolaylı olarak MKH izolasyonunda kullanılamayacağı anlaşılmıştır. CD271'in, fetal doku MKH izolasyonu için etkin bir

belirteç olmadığı başka araştırmacılar tarafından da tasdik edilmiştir [42, 142, 153]. Dolayısıyla, CD271 Kİ'nden MKH izolasyonu için uygun ve etkin bir belirteçken; CD271 ifade etmeyen fetal veya çok düşük düzeyde ifade eden PL dokularından, CD271 antijeni ile MKH seleksiyonu yapmanın uygun olmadığı net bir şekilde gösterilmiştir.

5.3. Fetal Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin Özellikleri Kemik İliği

Mezenkimal Kök Hücrelerden Önemli Farklılıklar Göstermektedir

Fetal dokulardan izole edilen MKH'lerin özellikleri birbirine yakinken, Kİ ve fetal doku MKH'lerin genel profilleri birbirinden çok farklıdır:

1) Kİ-MKH'lerin çoğalma hızı fetal doku MKH'lere göre daha yavaş, farklılaşma potansiyeli ise daha yüksektir. Eş zamanlı *in vitro* çoğalma hızları karşılaştırıldığında; PA-MKH > PK-MKH > GK-MKH > Kİ-MKH şeklindedir. Li ve diğ., GK-MKH ve PL kaynaklı MKH'lerin çoğalma hızının Kİ-MKH'ye kıyasla daha fazla olduğunu göstermiştir [276]. Fetal ve Kİ-kaynaklı MKH'lerin çoğalma hızındaki farkın hücrelerin değişik stromal niş kompartmanlarından kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz. PL ve GK'den elde edilen MKH'lerin çoğalma hızının daha fazla olması ve Kİ kıyasla non-invasif kolayca elde edilebilmesi gelecek klinik çalışmalarda büyük önem taşımaktadır. Kİ-MKH ve CD271+ KH devam kültürlerinde, CD271 küçük bir hücre popülasyonunda ifade edildiği için, NGF'nin Kİ-MKH ve CD271+ KH kültürlerinin proliferasyon hızı üzerine etki edebileceği düşünüldüğünden kültür besiyerine 50 ng/mL NGF eklenerek CD271+ KH ve Kİ-MKH'lerin proliferasyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmiş, ancak önemli bir etki görünmemiştir.

2) GK-MKH ve Kİ-MKH'leri arasında işlevsel benzerlikler bulunurken, *in vitro* adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasiteleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Kİ-MKH'ler 21 gün içerisinde farklılaşma özelliği gösterirken, bazı GK ve PL-MKH hücrelerinin farklılaşması için daha fazla süreye ihtiyaç duyduğu tespit edilmiştir. GK-MKH'ler ile Kİ-MKH'ler arasındaki farklılaşma ve çoğalma kapasiteleri arasındaki farklılıklarının; GK kanı hücrelerinin etkileşiminden, gereksinimlerinden ve osteoblastik nişin yokluğundan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca Kİ kaynaklı MKH'lere alternatif olarak; GK kanı HKH'lerinin *ex vivo* çoğaltılması için, non-invasif olarak kolaylıkla elde edilebilen GK veya PL stromal besleyici MKH tabakasının

kullanılmasıyla; bu hücrelerden salınacak olan büyüme faktörleri ve sitokinlerin desteğiyle, GK-HKH'lerinin çoğalmasına olumlu katkı sağlayacağını da düşünmekteyiz.

3) Kİ kaynaklı MKH'lerin ve fetal kaynaklı MKH'lerin hücre kültürü karşılaştırıldığında; en saf hücre popülasyonu CD271+ KH'lerde gözlenirken; GK-MKH popülasyonlarında bir miktar HUVEC kontaminasyonu tespit edilmiş ve PK-MKH'lerin, hem anneye ait, hem de bebeğe ait; hem kök hem de olgunlaşmış heterojen hücreleri içerdiği anlaşılmıştır. PL fetomaternal bir organ olduğu için; fetal ve maternal MKH'lerin daha saf ve ayrı bir şekilde izole edebilmesi ve elde edilen MKH'lerde görülen heterojen popülasyon sorununun ve anne ile bebeğe ait hücrelerin birbirinden ayırt edilebilmesi için birçok protokol geliştirilmiştir. Dokudan sadece maternal ya da fetal MKH izolasyonu için plasentanın göbek bağına yakın kısmı veya desidua basalisin en az 1 cm uzağından; sadece maternal kısmı için ise decidua basalis dokusundan makaslarla dokular kesilerek saf ve doğru hücre popülasyonlarının doğru kısımlardan alınabileceği gösterilmiştir [270]. İzolasyondan sonra maternal ve bebeğe ait hücreleri ayırt edebilmek için; erkek bebeğe ait PL dokuları kullanıldığında, XY FISH kitiyle analizler yapılarak bu hücrelerin ayrımının net bir şekilde yapılabileceğini düşünmekteyiz. Bu tez çalışması kapsamında toplanan fetal dokularda bebeğin cinsiyeti ile ilgili bilgiler doktordan istenmediğinden dolayı bu yöntem kullanılamamıştır. Ayrıca, Pelekanos ve diğ.'nin protokolüne göre, maternal desiduedan izolasyon yapıldığında PO'da kültüre edilen hücrelerin çoğu XX kromozoma sahipken, sadece %10 XY fetal hücrelerden oluşmaktadır; ancak pasaj 2'de maternal hücrelerin çoğalmasıyla kültürde daha baskın hale gelmesi ile kültür %100 XX maternal hücrelerinden oluşmaktadır [270]. Mikroskopik olarak koryonik villüslere bakarak doku ayrımının da yararlı olabileceği gösterilmiştir. GK-MKH kültürlerinde tespit edilen HUVEC kontaminasyonunu önlemek adına, GK-MKH izolasyonu için optimizasyon çalışmaları ve hücre izolasyon aparatları üretilmeye başlanmıştır [277, 278]. Bunların dışında olası HUVEC kontaminasyonunu önlemek adına MACS yöntemi ile CD31 negatif hücreler seçilebilir ya da akım sitometrisi ile CD73+/CD90+/CD105+/CD31-/CD34- şeklinde hücreler sort edilebilmektedir. Daha saf GK-MKH'ler için göbek bağı damarlarından uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler bistüri

ile WJ'den kazıyarak toplanıp, kollajenaz ve tripsin ile muamele edilerek de elde edilebilmektedir [269]. Enzimatik yöntem uygulamadan, MKH'lerin göç etme özelliği kullanılarak; GK 1-1,5 cm'lik kesilip medyum içerisinde uygun plakalara alınarak kültüre edildiğinde 15-20 gün içerisinde MKH hücreleri elde edilebilmektedir [279].

4) Hücrelerin immünojenotiplendirilmesinde; Kİ-MKH ile CD271+ KH'ler ve PA-MKH ile PK-MKH'ler daha çok birbirine benzer bir profil sergilemiştir. GK-MKH'lerin immünojenotipik profili PL kaynaklı MKH'lerden farklılık göstermektedir. Ayrıca da Kİ ve fetal MKH'ler immünomodülatuar molekül ifadeleri bakımından da farklılık göstermiştir. MKH'lerin klinikteki en sık kullanım nedeni bu hücrelerin önemli immünomodülatuar etkilerinin olmasıdır [280]. Ancak, farklı dokulardan elde edilen MKH'lerin immünomodülatuar etkileri birbirinden farklılık gösterebilmektedir. Bunu daha detaylı araştırmak için, Kİ ve fetal MKH'lerin yüzeylerinde ifade edilen immünomodülatuar moleküller karşılaştırılmış ve bu MKH'lerin süpernatantlarına salınan sitokin profillerine bakılmıştır. MKH'ler; TNF- α , NO, IL-1 β ile uyarılınca farklı sitokin profili ve parakrin etkiler sergilemektedir [281, 282]. Bu tez çalışmasında; MKH'lerin salgıladıkları sitokine uyarılmadan bakılmış ve önemli farklılıklar tespit edilmemiştir. TNF α , IFN γ veya LPS gibi uyarılar uygulandığı takdirde, Kİ kaynaklı ve fetal doku kaynaklı hücre gruplarının salgıladığı sitokin düzeylerinde daha belirgin değişikliklerin ortaya çıkabileceğini düşünmekteyiz. CD271+ KH ile Kİ-MKH'lerin salgıladıkları sitokinler değerlendirildiğinde, sitokin arrayde IL-8'i CD271+ KH'lerin, Kİ-MKH'lere kıyasla 2 kat daha az salgıladığı görülmüş ($p<0,05$), ancak bu veriler ELISA yöntemi ile istatistik olarak anlamlı çıkmamıştır ve genel olarak, CD271+ KH'ler ile Kİ-MKH'lerin sitokin salımını benzerlik göstermektedir. Temel salınan sitokin seviyeleri değerlendirildiğinde de, GK-MKH'lerden salınan sitokinler, GM-CSF hariç diğer tüm sitokinler (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFN γ , TNF α) PK, PA ve Kİ-MKH'lere göre en yüksek oranda salınmıştır. Ayrıca, tüm fetal doku kaynaklı MKH'ler, Kİ-MKH'lere kıyasla yaklaşık 5 kat daha yüksek oranda IL-8 salgılamaktadır. IL-8'in dışında, diğer tüm sitokinlerin en düşük oranları PK-MKH kültür süpernatantlarında bulunmuştur. IL-8 proliferasyonu ve migrasyonu arttırdığı için, insan PL ve GK kaynaklı MKH'ler rejeneratif tıp alanında önemli rol oynamaktadır [283]. GK-MKH'lerin Kİ-MKH'lere

kıyasla daha yüksek oranda önemli hematopoetik büyüme faktörlerini (GM-CSF, G-CSF, LIF, IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-11) salgıladıkları tespit edilmiştir [284]. GK, Kİ ve PL-MKH'lere kıyasla daha çok sayıda mezenkim kökenli fibroblast, myofibroblast, düz kas hücreleri gibi başka hücreleri de içermektedir [285]. Dolayısıyla GK-MKH'lerin sitokin salınımının daha yüksek olma sebebinin bundan kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz. Hwang ve diğ. farklı dokulardan elde edilen MKH'lerde sitokin indüksiyonu ve sinyal transdüksiyonunun farklılık gösterebileceğini, bu sebeplede sitokin salınımlarında farklılık olabileceğini düşünmektedir [286]. Bunların dışında; GK-MKH'lerin izolasyonu ve kültüre edilmesinde, MKH'lerin kendi kendine göç etme yeteneği sayesinde, hücrelerin kültür tabakalarına yayılması, hücrelerin izolasyonu ve eldesinin sitokin profilini etkileyebileceğini düşünmekteyiz. Son olarak ise; sitokin seviyelerindeki bu farkın hücre yaşlanmaya bağlı olabileceğini, hücre yaşlanmadan dolayı bu sitokinleri daha yüksek seviyede salgıladığını düşünmekteyiz. Bu bakımdan farklı hücre gruplarının, hücre yaşlanma (senesens) bakımından da araştırılmasının yarar sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

HLA-DR ifadelerinin olmaması, MKH'ler nakil edildiğinde, bu hücrelerin alıcıda "görünmezliğini" sağladıkları için önemlidir ve Kİ-MKH ile fetal doku MKH'lerdeki ifadeleri benzerlik gösterirken; istatistiksel olarak anlamlı olmasa da genel olarak en yüksek HLA-G ve CD178/Fas-L ifadeleri Kİ-MKH'lerde, en düşük HLA-G ve CD178/FasL ifadeleri ise GK-MKH'lerde tespit edilmiştir. Tam tersine, Pittenger ve diğ. Kİ-MKH'lerde CD178/FasL ifadelerini hiç tespit edememiştir [43]. HLA-G; MKH'lerin immünsüpresif özellik göstermesindeki en etkili solubl faktörlerden biridir ve bu özel sınıf I MHC formu olan antijen, trofoblast ve PL hücrelerinde ifade olmakta ve anne ile fetüs arasındaki toleransta rol oynamaktadır [287, 288]. *In vitro* HLA-G'nin; aktif T lenfositler üzerine MKH'ler ile benzer immünsüpresif etki ettiği gösterilmiştir [289]. GK-MKH'lerde daha önceki çalışmalarda HLA-G gen ve HLA-ABC yüzey protein ifadelerinin olduğu gösterilmiştir [290]. PL MKH'leri maternal/fetal arasında ortak orijinden geldiği için ve asıl fizyolojik immünotolerans burada gerçekleştiği için, HLA-G'nin GK-MKH'ye göre daha yüksek olması beklenmiştir [291]. Kordon, anne kısmına ait olmadığından önemli bir immünomodülatuar etki göstermesi beklenmemektedir.

Bu sebeple de, GK'da HLA-G'nin daha düşük olması gerektiği düşünülmüştür ve elde edilen veriler de bu düşüncemizi destekleyici nitelikte olmuştur. HLA-G'nin iki adet HLA-G1-4 transmembran izoformu ve HLA-G5-7 olmak üzere solubl, sekrete olan izoformları bulunmaktadır [292]. Bir çalışmada, GK-MKH'lerin yaklaşık %91'inin HLA-G'yi intraselüler ifade ettiği gösterilmiştir [291]. Ancak, bu tez çalışmasında sadece hücre yüzeyindeki HLA-G ifadesi araştırılmıştır. Dolayısıyla, bundan sonraki çalışmalarda tüm dokulardan izole edilen MKH'lerde, intraselüler ve transmembran izoformlarına spesifik akım sitometrisi antikoları ile hücrelerin boyanmasının daha yararlı olacağını ve literatüre ek bilgiler sağlayacağını düşünmekteyiz.

PA-MKH ve PK-MKH immünomodülatuar molekül ifadeleri bakımından daha fazla benzerlik gösterirken, GK-MKH'ler daha farklı bir profil göstermektedir. Bu farkın; GK-MKH'lerin, PA ve PK'dan ayrı bir bölgeden izole edilmesinden kaynaklı olabileceğini; ancak tüm *in vitro* kültüre edilen MKH gruplarında aynı besiyeri kullanıldığından kültür koşullarından kaynaklı olmadığını da düşünmekteyiz. Amniyon-koryon-fetüs birbiriyle daha yakın temasta olduğundan PL kaynaklı MKH'lerin benzer özellik gösterdiğini düşünmekteyiz ve başka araştırmacılar da bu düşüncemizi desteklemektedir [293]. Sonuç olarak; PA, PK ve GK-MKH'ler; Kİ-MKH ve CD271+ KH'lerden daha farklı davranmaktadır.

5.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin, Hematopoetik Kök Hücrelerin İdamesinde, Çoğaltılmasında ve Farklılaşmasındaki Önemi

Kİ-MKH'lerin *in vivo* koşullarda HKH ve HKPH'leri desteklediği, kendini yenilemesinde, farklılaşmasında önemli roller oynadığı ve bu hücreler için bir iskele yapısı oluşturduğu bilinmektedir. Aynı şekilde CD271+ KH'lerde, Kİ stromasında yer almaktadır ve Kİ'nde HKH'ler için bir matriks yapısı oluşturmaktadır [153]. HKH'ler Kİ'nden, GK'dan ve mobilize edilen periferik kandan izole edilebilen; kan ve bağışıklık sistemi hücrelerini meydana getirebilen erişkin kök hücrelerdir ve kan veya bağışıklık sistemi ile genetik kan hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır [294, 295]. Ancak özellikle KK'dan izole edilen CD34+ HKH'lerin sayıları sınırlı olduğu için, bu hücrelerin klinikte kullanılabilmesi için sayılarının artırılması gerekmektedir. Bu sorunu aşmak için en çok araştırılan yöntem *ex vivo* HKPH çoğaltılmasıdır [214, 296]. Tez

kapsamında bu çalışmanın aşamasında, Kİ-MKH ve Kİ-CD271+KH'lerin HKPH'lere besleyici tabaka olarak kullanılması ile *in vivo* Kİ nişinin taklit edilmesi ve böylelikle hücrelerin kaliteli olarak sayısının artırılması hedeflenmiştir. Ayrıca klinik için, bu *ex vivo* hücre çoğaltılması protokolleri kullanılarak, HKH nakli sonrası, homing/engraftmanın artırılabilmesi ve immün-yeniden yapılanmanın daha kısa sürede oluşturulabilmesi de büyük önem taşımaktadır. Bu süreçte, B ve T hücre gelişiminin hızlandırılmasına yönelik yapılan *in vitro* manipülasyonlar öne çıkmaktadır. Bu nedenle, Kİ-MKH ve CD271+ KH besleyici tabakaları üzerinde çoğaltılan HKPH'lerin *in vitro* B ve T hücre soy yönünde farklılaşma kapasiteleri incelenmiştir. 7 gün süresince serumsuz kültür koşullarında STIFA5 varlığında çoğaltılan HKPH'lerin NSGW41 fare modelinde homing ve engraftman kapasiteleri de araştırılmıştır.

Kİ'nden elde edilen CD271+ KH'lerin, Kİ-MKH'ler ile karşılaştırılması; moleküler ve işlevsel karakterizasyonunun yapılması, immünomodülasyondaki rolü ile CD271+ KH'lerin *in vitro* lenfohematopoezi destekleme kapasiteleri araştırılmıştır. CD34+ HKPH'lerin *ex vivo* çoğaltılması yapıldığında, besleyici tabakasız kültüre edilen HKPH'lere kıyasla, MKH ve CD271+ KH ortamında kültür edilen HKPH sayılarında çok daha fazla bir artış tespit edilmiştir. En yüksek total hematopoetik hücre sayıları, CD271+ KH ko-kültürlerinden sonra görülmüştür. Ancak, besleyici tabakaları kullanılmadan özellikle CD34+/CD38- HKPH sayılarında bir artış görülürken, Kİ-MKH ve CD271+ KH ile ko-kültür yapıldığında; hem CD34+/CD38-, hem de CD34+/CD38+ hematopoetik hücre sayılarında bir artış görülmüş, aynı zamanda HKPH'lerin olgunlaşmaya doğru bir eğilimi olduğu da tespit edilmiştir. Özellikle CD271+ KH'lerin, Kİ-MKH'ye ve besleyici tabaka olmadan tek başına CD34+ kültürüne kıyasla, *ex vivo* HKPH çoğalmasını daha iyi desteklediği, hem CD34+ kök hem de progenitör hücrelerin total sayısını arttırdığı, *in vitro* CFU-C deney sonuçlarına bakıldığında da daha yüksek sayıda CFU-GM, CFU-GEMM, BFU-e kolonilerinin meydana gelmesini sağladığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde Li ve diğ., Kİ-MKH'lerin CD34+ hücrelerin çoğalmasını desteklediğini; ancak CD271+/CD45-/CD140a^{low}/- hücrelerin CD34+ *ex vivo* hücre çoğalmasını daha iyi desteklediğini ve CD271+ KH'lerin hematopoezi destekleyici

genleri de (VCAM1, SPP1, CXCL12 ve Angiopoietin 1) daha yüksek düzeyde ifade ettiğini göstermişlerdir [297]. HKPH'lerin *in vitro* serumsuz besiyeri koşullarında çoğaltılmasının optimizasyonu için; Kİ-MKH ve CD271+ KH'lere alternatif olarak, PA-MKH, PK-MKH veya özellikle GK-MKH'ler (daha geniş yelpazede sitokin ve hematopoetik büyüme faktörü salgıladığı için) ile ko-kültür çalışmalarının yapılmasının, HKH çoğaltılmasında verimli olabileceği de düşünülmektedir.

5.5. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler ile CD271+ Kök Hücrelerin ve Fetal Mezenkimal Kök Hücrelerin *In Vitro* Lenfopoezi Destekleme Potansiyeli

Bu tez çalışmasında ayrıca CD271+ KH'lerin, *in vitro* hem B hem de T hücre gelişimini desteklediği gösterilmiştir. 2010 yılında Kuçi ve diğ., kültüre edilmeden insan CD133+ HKH'leri ile Kİ-CD271+ KH'leri birlikte NSG fare modeline intravenöz nakil ettiklerinde plastik adheran Kİ-MKH'ye kıyasla; *in vivo* T hücre gelişiminde >10 kat, B hücre de >3 kat ve NK'da 2,5 katlık bir artışla, lenfoid engraftmanı daha iyi sağladıklarını ve CD271+ KH'lerin immünsüpresif etkilerinin olduğunu da göstermişlerdir [15]. Kök hücre nakli sonrası, özellikle lenfoid soy hücrelerinin yeniden gelişmesi ve güçlendirmesi yılları bulabildiği için bu süreçte hastalarda (ağır/ölümcül) enfeksiyon riski çok yüksektir. Dolayısıyla nakil sonrası B, T ve NK hücrelerinin daha kısa sürede ortaya çıkması ve sayılarının artması klinik bakımdan büyük önem taşımaktadır. CD271+ KH'lerin CD133+ veya CD34+ HKH'ler ile beraber, hematolojik maligniteler ve/veya bağışıklık sistemi hastalığı olan hastalara nakil edilmesinin, hem GvHH riskini azaltabileceği hem de lenfoid soyların gelişimini hızlandırarak hastaların enfeksiyonlara bağlı hayatlarını kaybetme riskini düşürmeye yardımcı olabileceği, klinikte eş zamanlı MKH-HKH naklinin hastalar için klinik bakımdan önemli yararlar sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Halen, *in vitro* B/T hücre farklılaşmasını destekleyebilen insan kaynaklı hücre hattı henüz geliştirilmediği için bu tez çalışması kapsamında, hem HKPH *ex vivo* çoğalmasını destekleyen hem de *in vitro* B/T hücre gelişimini en iyi destekleyebilen besleyici insan kaynaklı MKH grubunun belirlenebilmesi hedeflenmiştir. Bunun için, ilk olarak Kİ ve fetal MKH hücre gruplarının hematopoetik desteği araştırılmıştır ve

ikinci aşamada bu farklı kaynaklardan oluşan besleyici MKH tabakaları üzerinde çoğaltılan HKPH'lerin *in vitro* B/T hücre farklılaşma kapasiteleri Op9 ve Op9-DL1 fare hücre hatları ile kokültürler yapılarak test edilmiştir. Son olarak, bu fare hücre hatlarının yerine en iyi hangi insan kaynaklı MKH grubu kullanılabilir tespit etmek amacıyla; lenfoid soy yönünde farklılaşmada önemli rol oynayan Notch reseptör ve ligandlarının karşılaştırılması yapılmıştır. CD271+ KH'lerin immünofenotipi farklılaşma kapasiteleri ve bakılan gen (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, *JAG1*, *JAG2*, *DLL1*, *DLL4*) ifadeleri genel olarak plastik aderan Kİ-MKH'lerle benzerlik göstermektedir. Kİ-MKH'lerin özellikle *NOTCH1*, 2, 3 ve *JAG 1* ifadeleri tüm fetal MKH'lere göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0,0001$). Bu bakımdan, lenfopoezde önemli rol oynadığı bilinen NOTCH ligandlarını daha yüksek düzeyde ifade eden Kİ-MKH ve CD271+ KH'lerin (fetal doku MKH'lere kıyasla) *in vitro* B ve T hücre farklılaşması için daha uygun bir besleyici tabaka olacağını düşünmekteyiz. Ancak genel olarak bakıldığında bütün doku kaynaklı MKH'lerde, DLL1 ve DLL4 ifadeleri düşük olduğundan B/T hücre farklılaştırılması için çok uygun olmadıklarını, bu sebeple de DLL1 veya DLL4'ün MKH'lerde overeksprese ettirilmesiyle, B/T hücre gelişiminde çok daha fazla etkinlik sağlanabileceğini düşünmekteyiz.

Fetal kaynaklı MKH'ler kendi aralarında karşılaştırıldığında ise; NOTCH reseptör ve ligandlarının gen ifadesi bakımından benzer bir profil sergilemektedir. Ancak *NOTCH1* gen ifadeleri bakımından aralarında anlamlı fark bulunmuştur: GK-MKH'lerde, PA-MKH ve PK-MKH'lere kıyasla daha yüksek düzeyde *NOTCH1* ifadeleri saptanmıştır. Diğer çalışmalarla paralel olarak; NOTCH ligandlarından *JAG1*'in gen ifadesi fetal kaynaklı MKH'lerden daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle ligandını daha yüksek ifade eden Kİ kaynaklı MKH'ler, (Kİ-MKH ve/veya CD271+ KH) HKH'lerdeki NOTCH reseptörleri ile etkileşime geçeceğinden *ex vivo* hücre çoğaltılmasında stromal tabaka olarak kullanılmasının daha yararlı olabileceği düşünülmektedir. Sıçan karaciğeri kaynaklı MKH'lerde hem mRNA hem de protein düzeyinde; Notch4, Jag1 ve Jag2 ifadeleri saptanmamıştır [298]. Her ne kadar hücre kaynağı farklı olsa da; bu sonuçla benzer olarak bu tez çalışmasında da, insan kaynaklı Kİ-MKH, CD271+ KH, PA-MKH, PK-MKH ve GK-MKH'lerde de *NOTCH4* gen ifadeleri

saptanmamıştır; ancak ligandlardan *JAG1* ve *JAG2* ifadeleri saptanmıştır. Bu farklılığın MKH'lerin, farklı dokulardan ve farklı türlerden elde edilmesine veya hücre kültür farklılıklarına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. İlginç olarak Shi ve diğ., CD34+ HKPH'lerin GK-MKH'ler ile ko-kültür yapılmasından sonra *NOTCH1* ve *JAG1*'in arttığını göstermişlerdir [299]. Bu bilgiden yola çıkarak, bundan sonraki çalışmalarda farklı insan besleyici MKH'leri kullanarak ko-kültür edilen CD34+ hücrelerde, ko-kültür sonrasında da NOTCH reseptör ve ligand ifadelerinin araştırılmasının literatüre önemli bilgiler sağlayacağını düşünmekteyiz.

Son olarak ise Kİ kaynaklı CD271+ KH'lere alternatif olarak; fetal doku kaynaklı MKH'lerin alternatif olarak kullanılabileceğini 1) etik problem taşıması; 2) kolay ve invazif olmaması; 3) yüksek çoğalma kapasitesi göstermesi; 4) tümörjenite riskinin yüksek olmaması; 5) karyotipinin stabil olması; 6) yüksek immünomodülatuar etki göstermesi [300]; 7) sitokin ve hematopoetik büyüme faktörü salgılama profili açısından *ex vivo* hücre çoğaltılması çalışmalarının ve belki de PL ve GK kaynaklı MKH'lerle ko-kültür yapıldıktan sonra B/T hücre gelişimini destekleyip desteklemediğinin, ko-kültür sonrası bu hücreler ile CD34+ hematopoetik hücrelerin birlikte nakil edilmesiyle *in vivo* homing, lenfohematopoeze olan etkilerinin araştırılmasının hem literatüre ek bilgiler sağlayacağı hem de klinik bakımdan önem taşıyacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ

Tez kapsamında elde edilen sonuçlara göre; CD271 antijeninin, Kİ-MKH izolasyonu için uygun olduğu, ancak fetal dokulardan MKH izolasyonu için uygun olmadığı gösterilmiştir ve başka gruplar da bu bulgularımızı desteklemektedir [42, 142, 153]. Battula ve diğ., PL MKH'lerin çok düşük düzeyde CD271 ifade ettiğini; PK ve PA dokularından MKH izolasyonu için CD271'in uygun bir belirteç olmadığını göstermiştir [301]. Ancak, başka bir grup; PA ve PK'dan CD271 pozitif hücrelerin CD271 negatif fraksiyona göre yüksek klonojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyeli sergilediğini ve CD271'in PL kaynaklı dokulardan da MKH izolasyonu için kullanılabileceğini göstermiştir [155]. Hem Kİ kaynaklı hem de fetal doku kaynaklı MKH'ler otolog ve allojenik olarak kullanılabilmektedir [196]. Tercihen, bazı klinik kullanımlarda Kİ-MKH'lerin kullanımının daha uygun olduğu, bazı endikasyonlarda ise PL ve GK-MKH'lerin çoğalma hızlarının daha yüksek olması ve daha kolay elde edilebilmesi gibi hücresel özelliklerinden dolayı (örneğin; acil olarak fazla sayıda hücre gerektiren durumlar), Kİ-MKH'lere alternatif olarak rejeneratif tıpta kullanımın daha uygun olabileceğini düşünmekteyiz. Klinikte kök hücrelerin kullanılması için daha kısa sürede çoğalabilen ve farklı tipteki hücrelere farklılaşma kapasitesine sahip olan hücrelerle daha yüksek sayıda hücre elde edilebileceğinden fetal kaynaklı MKH'lerin kullanımının büyük önem taşıdığını düşünmekteyiz. Örneğin, Kİ'nden MKH izolasyonu invazif bir yöntemdir; ancak GK ve PL'den MKH izolasyonu daha kolay bir şekilde elde edilebilmektedir. Ayrıca ülkemizde genel olarak Kİ bağıışı yapan verici sayısı azdır, ancak son zamanlarda ise göbek KK bağıışı daha sık yapılabilmekte ve ürünler KK bankasında saklanabilmektedir. Henüz fetal dokuların (PA, PK, GK-MKH'lerin) rutin olarak saklanabileceği ve hücre çoğaltılmasının yapılabildiği bir kamu kurumu bankacılığı bulunmamaktadır. Ancak doğumdan sonra toplanan PL ve GK'ların saklanması ve klinikte kullanılmak üzere hazır MKH kaynağı olarak geliştirilme potansiyelleri çok yüksektir. Bu dokulardan, Kİ'ne kıyasla kolay bir şekilde MKH'ler elde edileceğinden, daha hızlı bir şekilde çoğaltılıp ve kalite kontrolleri de yapıp hazır hücresel ilaç "off the shelf" hücresel tedavi ürünü olarak kullanılabileceğinden; örneğin GvHH gibi ve diğer acil kök hücre müdahalesi yapılabilen, hastanın durumu

kötüye gittiğinde hemen kök hücre müdahalesi gereken durumlarda, hazır elde edilmiş ve çoğaltılmış bankalarda saklanan PA, PK, GK-MKH'lerinin kullanımının çok büyük önem ve yarar taşıyacağını düşünmekteyiz.

In vitro koşullarda adipojenik ve osteojenik soylara farklılaşma süresinin uzatılmasına rağmen, fetal dokulardan elde edilen hücrelerin farklılaşması Kİ-MKH'ler ve CD271+ KH'ler kadar iyi olmamıştır. Bu aradaki farklılığın, Kİ mikroçevresi ile PL kaynaklı fetal doku mikroçevresinin biraz farklı yapıda olmasından kaynaklandığını tahmin etmekteyiz. Örneğin, PL fetomaternal bir organdır ve Kİ'ne kıyasla daha fazla vasküler endotelial hücreden ve Kİ'nden farklı olarak da sınırsız trofoblast hücrelerinden oluşan özel bir hematopoetik nişe sahiptir [190]. PL ve GK dokularındaki osteoblast ve osteoprogenitör hücre yokluğunun, bu hücrelerin daha geç farklılaşma yapmasında veya farklılaşma için daha fazla zamana ihtiyaç duymasında etken olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak, başka araştırmacılar; PA, PK ve GK-MKH'lerin farklılaşma potansiyellerinin yüksek olduğunu belirtmiştir [155, 300]. Diğer araştırmacı grubuyla benzer düşünce olarak; bu çalışmalar ve bizim elde ettiğimiz sonuçlar arasındaki farkın; kök hücre izolasyon yöntemlerinin ve genel kültür koşullarının yanı sıra, bu kök hücrelerin farklılaşması sırasında uygulanan mekanik kontrol, adeziv durum, mekanik sinyaller ve hücrelerin fiziksel cevaplarından kaynaklı olabileceğini de düşünmekteyiz [302]. Bunun dışında, Kİ-MKH ve CD271+ KH'ler benzer şekilde farklılaşma potansiyeline sahiptir.

Bu tez çalışmasında, Kİ'nden izole edilen plastik adheran MKH ile; prospektif izolasyon yapılarak izole edilen CD271+ KH'ler ve fetal doku kaynaklı PA-MKH, PK-MKH ve GK-MKH hücreler, kontrol grubu olarak belirlenen Kİ-MKH'ler ile karşılaştırılmıştır. Bu 5 farklı hücre grubunun detaylı karakterizasyonu, morfolojisi, eş zamanlı hücre proliferasyonu, immünofenotiplendirilmesi ve farklı soylara farklılaşma kapasiteleri, *in vitro* lenfohematopoezi destekleyici ilgili genlerin ifadesinin karşılaştırılması yapılmıştır. Kİ'nden anti-CD271 antikoru kullanarak hızlı, saf ve tüm CFU-F kapasitesini içeren homojen MKH'lerin izolasyonu yapılabilmektedir. CD271+ KH'lerin kalitesi, farklılaşma kapasiteleri ve bakılan gen ifadeleri ve kemokin salınımları plastik adheran Kİ-MKH'lerle benzerlik göstermektedir. Aynı şekilde, fetal

dokulardan izole edilen MKH'lerin profilleri de birbirine yakındır. Ancak, Kİ ve fetal doku MKH'lerin genel profilleri birbirinden çok farklıdır: Kİ-MKH'lerin çoğalma hızı, fetal doku MKH'lere göre daha yavaş, farklılaşma potansiyeli daha yüksek, özellikle *NOTCH 1, 2, 3* ve *JAG 1* ifadeleri daha yüksek, ve IL-8 salınımı anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Fetal doku kaynaklı ve GK-MKH'ler, Kİ-MKH'ye kıyasla 5.5 kat daha fazla oranda IL-8 salgılamaktadır. Bu sonuçlara göre, CD271 antijeninin, Kİ'nden MKH izolasyonu için uygun; ancak fetal dokulardan MKH izolasyonu için uygun olmadığı öğrenilmiştir. Ayrıca yukarıda detaylıca açıklanan sebeplerden ötürü; bazı klinik kullanımlarda Kİ-MKH'lerin kullanımının daha uygun olabileceği, bazı endikasyonlarda ise PL kaynaklı hücrelerin kullanılmasının daha uygun olabileceği düşünülmektedir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında ve yukarıda bahsedilen ek araştırma ve deneysel çalışma önerileri doğrultusunda, daha detaylı bir şekilde ek araştırmaların ve deneylerin yapılmasının hem bilim dünyasına ek bilgiler sağlayacağını hem de klinik denemelere ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Burada; MKH'lerin Kİ'nden doğrudan (prospektif) izolasyonunda, tek başına CD271 antijeni kullanılarak; kolay, hızlı ve tekrarlanabilir bir şekilde yüksek CFU-F kapasitesine sahip olan, saf bir MKH popülasyonu elde edilebildiği, ancak fetal dokulardan saf MKH'lerin izolasyonu için CD271'in kullanılmadığını göstermiş bulunmaktayız. Bu tez kapsamında yapılan deneylerde özet olarak; Kİ-MKH, CD271+ KH ve fetal MKH'lerin immünofenotipleri, CFU-F'leri, farklılaşma kapasiteleri, çoğalma hızları, sitokinlerin salınımı, NOTCH reseptör ve ligandlarının gen ve protein ifadelerinin değerlendirilmesi, *in vitro* lenfohematopoetik desteği ve *in vivo* NSGW41 farelerde ko-kültürlerden toplanan Kİ-MKH ve CD271+ KH/HKH'lerin engraftman potansiyeli değerlendirilmiştir.

Tezin en önemli bulguları;

1) Kİ-MNH'deki CD271+ KH'lerin sayıları çok sınırlı olmasına rağmen Kİ-MKH'lere kıyasla 45-40 kat daha yüksek CFU-F koloni oluşturma kapasitesine sahiptirler ve tüm Kİ koloni oluşturma kapasitesi sadece bu CD271+ KH fraksiyonunda bulunmaktadır.

2) Kİ-MKH ve CD271+ KH'lerin; immünofenotipleri, farklılaşma kapasiteleri, çoğalma hızları, morfolojisi, NOTCH reseptör ve ligand ifadeleri ve sitokin salınımı profili benzerdir.

3) CD271 antijeni Kİ'nden daha saf MKH grubunun izolasyonu için etkin bir belirteçken, MKH'lerin kültürde takibi için uygun değildir ve fetal kaynaklı MKH'lerin izolasyonu için de etkin bir belirteç değildir.

4) CD271+ KH'ler hücre kültürü sırasında CD271+ antijenini downregüle etmektedir.

5) CD271+ KH'lerin *in vitro* lenfohematopoezi desteklediği gösterilmiştir.

Bu nedenle, tek bir antikor (CD271) kullanılarak elde edilebilen, CFU-F kapasitesi daha yüksek olan, *ex vivo* çoğalmayı ve *in vitro* ile *in vivo* lenfohematopoezi destekleyen CD271+ KH'lerin özellikle HKH nakli bekleyen hastalarda; CD34+ HKPH'ler ile birlikte nakil edilmesinin homing ve engraftmanı daha fazla arttırabileceğini ve nakil sonrası B, T ve NK hücrelerinin daha kısa sürede oluşmasını sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Hastalara yapılan KK veya Kİ nakli sonrasında homingin, engraftmanın ve lenfoid soy yönünde farklılaşmanın hızlandırılması adına, CD34+ HKPH'ler CD271+ KH besleyici tabakası üzerinde 1 hafta süresince bu tez çalışmasında optimize edilen kültür koşullarında ko-kültür yapıp çoğaltıldıktan sonra, hastalara birlikte nakil edilmesinin klinik bakımdan çok önemli yarar sağlayacağını, hastaların enfeksiyonlara bağlı ölüm riskini azaltmada etken olabileceğini düşünmekteyiz. Bu tez çalışmasında yapılan ve optimize edilen ko-kültür çalışmaları sonucunda; HKH ve HKPH'lerin hem total sayısı artmakta hem de hücrelerin köklülük özellikleri ve kök hücre kalitesi de korunduğundan, özellikle taze kültüre edilmemiş KK CD34+ hücreler yerine ko-kültür ile çoğaltılan bu hücrelerin hastalara nakil edilmesinin daha iyi klinik sonuçlar doğuracağını düşünmekteyiz. Son olarak ise; Kİ'nden MKH ve KH izolasyonu invazif bir yöntem ve etik sorunları taşıdığı için, daha kolay bir şekilde elde edilen ve etik sorunlar yaşamayan hematopoezi destekleyici sitokinleri ve faktörleri daha yüksek oranda salgılayan GK-MKH'lerin CD271+ KH'lere alternatif olarak *ex vivo* CD34+ hücre çoğaltılmasında

kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca; Ki'nden "off the shelf" hazır kök hücre ürünleri yapılamayacağından, PL ve GK-MKH'lerden; kalite kontrolü yapılmış, dondurulmuş halde hazır bulunabilecek olan bu "off the shelf" kök hücre ürünlerinin bankalarda saklanması ve bu ürünlerin kullanımı ile birçok hastalığa yarar sağlanabileceği düşünülmektedir.



7. KAYNAKLAR

1. Bianco, P., et al., *Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications*. Stem Cells, 2001. **19**(3): p. 180-92.
2. Heo, J.S., et al., *Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue*. Int J Mol Med, 2016. **37**(1): p. 115-25.
3. Wu, M., et al., *Comparison of the Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Human Placenta and Umbilical Cord*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 5014.
4. Rostovskaya, M. and K. Anastassiadis, *Differential expression of surface markers in mouse bone marrow mesenchymal stromal cell subpopulations with distinct lineage commitment*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51221.
5. Boxall, S.A. and E. Jones, *Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells*. Stem Cells Int, 2012. **2012**: p. 975871.
6. Watson, J.T., et al., *CD271 as a marker for mesenchymal stem cells in bone marrow versus umbilical cord blood*. Cells Tissues Organs, 2013. **197**(6): p. 496-504.
7. Alvarez, R., et al., *Single CD271 marker isolates mesenchymal stem cells from human dental pulp*. Int J Oral Sci, 2015. **7**(4): p. 205-12.
8. Alvarez-Viejo, M., Y. Menendez-Menendez, and J. Otero-Hernandez, *CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture*. World J Stem Cells, 2015. **7**(2): p. 470-6.
9. Lv, F.J., et al., *Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2014. **32**(6): p. 1408-19.
10. Chou, S., et al., *Expansion of human cord blood hematopoietic stem cells for transplantation*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(4): p. 427-8.
11. Park, B., K.H. Yoo, and C. Kim, *Hematopoietic stem cell expansion and generation: the ways to make a breakthrough*. Blood Res, 2015. **50**(4): p. 194-203.
12. Boulais, P.E. and P.S. Frenette, *Making sense of hematopoietic stem cell niches*. Blood, 2015. **125**(17): p. 2621-9.
13. Charbord, P., *Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts*. Hum Gene Ther, 2010. **21**(9): p. 1045-56.
14. Majumdar, M.K., et al., *Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells*. J Cell Physiol, 1998. **176**(1): p. 57-66.

15. Kuci, S., et al., *CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties*. Haematologica, 2010. **95**(4): p. 651-9.
16. Weber, J.M. and L.M. Calvi, *Notch signaling and the bone marrow hematopoietic stem cell niche*. Bone, 2010. **46**(2): p. 281-5.
17. Delaney, C., M.Z. Ratajczak, and M.J. Laughlin, *Strategies to enhance umbilical cord blood stem cell engraftment in adult patients*. Expert Rev Hematol, 2010. **3**(3): p. 273-83.
18. Dahlberg, A., C. Delaney, and I.D. Bernstein, *Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood, 2011. **117**(23): p. 6083-90.
19. Duryagina, R., et al., *Overexpression of Jagged-1 and its intracellular domain in human mesenchymal stromal cells differentially affect the interaction with hematopoietic stem and progenitor cells*. Stem Cells Dev, 2013. **22**(20): p. 2736-50.
20. Renstrom, J., et al., *How the niche regulates hematopoietic stem cells*. Chem Biol Interact, 2010. **184**(1-2): p. 7-15.
21. Radtke, F., et al., *Notch regulation of lymphocyte development and function*. Nat Immunol, 2004. **5**(3): p. 247-53.
22. Robey, E.A. and J.A. Bluestone, *Notch signaling in lymphocyte development and function*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(3): p. 360-6.
23. Pontikoglou, C., et al., *Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation*. Stem Cell Rev, 2011. **7**(3): p. 569-89.
24. Nombela-Arrieta, C., J. Ritz, and L.E. Silberstein, *The elusive nature and function of mesenchymal stem cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(2): p. 126-31.
25. Dimarino, A.M., A.I. Caplan, and T.L. Bonfield, *Mesenchymal stem cells in tissue repair*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 201.
26. Friedenstein, A.J., et al., *Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues*. Transplantation, 1968. **6**(2): p. 230-47.
27. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet, 1970. **3**(4): p. 393-403.
28. Owen, M. and A.J. Friedenstein, *Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors*. Ciba Found Symp, 1988. **136**: p. 42-60.
29. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
30. Dennis, J.E., et al., *A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(5): p. 700-9.

31. Bianco, P. and P. Gehron Robey, *Marrow stromal stem cells*. J Clin Invest, 2000. **105**(12): p. 1663-8.
32. Jiang, Y., et al., *Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain*. Exp Hematol, 2002. **30**(8): p. 896-904.
33. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
34. Barry, F., et al., *The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(2): p. 519-24.
35. Matthay, M.A., et al., *Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for severe acute lung injury*. Chest, 2010. **138**(4): p. 965-72.
36. Lin, C.S., et al., *Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges*. Histol Histopathol, 2013. **28**(9): p. 1109-16.
37. Zimmerlin, L., et al., *Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells*. Cytometry A, 2013. **83**(1): p. 134-40.
38. Kaiser, S., et al., *BM cells giving rise to MSC in culture have a heterogeneous CD34 and CD45 phenotype*. Cytotherapy, 2007. **9**(5): p. 439-50.
39. Quirici, N., et al., *Anti-L-NGFR and -CD34 monoclonal antibodies identify multipotent mesenchymal stem cells in human adipose tissue*. Stem Cells Dev, 2010. **19**(6): p. 915-25.
40. Yoshimura, K., et al., *Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates*. J Cell Physiol, 2006. **208**(1): p. 64-76.
41. Pachon-Pena, G., et al., *Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles*. J Cell Physiol, 2011. **226**(3): p. 843-51.
42. Simmons, P.J. and B. Torok-Storb, *Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1*. Blood, 1991. **78**(1): p. 55-62.
43. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
44. Krause, D.S., et al., *CD34: structure, biology, and clinical utility*. Blood, 1996. **87**(1): p. 1-13.
45. Hermiston, M.L., Z. Xu, and A. Weiss, *CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 107-37.
46. Mazzone, A. and G. Ricevuti, *Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance*. Haematologica, 1995. **80**(2): p. 161-75.

47. Lubis, A.M., et al., *Isolation and cultivation of mesenchymal stem cells from iliac crest bone marrow for further cartilage defect management*. Acta Med Indones, 2011. **43**(3): p. 178-84.
48. Wagner, C., et al., *The complement receptor 3, CR3 (CD11b/CD18), on T lymphocytes: activation-dependent up-regulation and regulatory function*. Eur J Immunol, 2001. **31**(4): p. 1173-80.
49. Resta, R., Y. Yamashita, and L.F. Thompson, *Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73*. Immunol Rev, 1998. **161**: p. 95-109.
50. Colter, D.C., et al., *Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3213-8.
51. Rege, T.A. and J.S. Hagood, *Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis*. FASEB J, 2006. **20**(8): p. 1045-54.
52. Duff, S.E., et al., *CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications*. FASEB J, 2003. **17**(9): p. 984-92.
53. Barry, F.P., et al., *The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105)*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **265**(1): p. 134-9.
54. Ode, A., et al., *CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells*. Eur Cell Mater, 2011. **22**: p. 26-42.
55. Eckle, T., et al., *Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 8127-37.
56. Haeryfar, S.M. and D.W. Hoskin, *Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3581-8.
57. Williams, A.F. and J. Gagnon, *Neuronal cell Thy-1 glycoprotein: homology with immunoglobulin*. Science, 1982. **216**(4547): p. 696-703.
58. Schubert, K., et al., *Melanoma cells use Thy-1 (CD90) on endothelial cells for metastasis formation*. Am J Pathol, 2013. **182**(1): p. 266-76.
59. Craig, W., et al., *Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells*. J Exp Med, 1993. **177**(5): p. 1331-42.
60. Tormin, A., et al., *CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization*. Blood, 2011. **117**(19): p. 5067-77.
61. Tawonsawatruk, T., et al., *Adipose derived pericytes rescue fractures from a failure of healing--non-union*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 22779.

62. Jones, E., et al., *Large-scale extraction and characterization of CD271+ multipotential stromal cells from trabecular bone in health and osteoarthritis: implications for bone regeneration strategies based on uncultured or minimally cultured multipotential stromal cells*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(7): p. 1944-54.
63. Jones, E.A., et al., *Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(3): p. 817-27.
64. Ishii, M., et al., *Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(1): p. 297-303.
65. Chan, N.L., et al., *Umbilical vein and placental vessels from newborns with hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1 genotype are normal despite reduced expression of endoglin*. Placenta, 2004. **25**(2-3): p. 208-17.
66. Narravula, S., et al., *Regulation of endothelial CD73 by adenosine: paracrine pathway for enhanced endothelial barrier function*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 5262-8.
67. Gronthos, S., et al., *Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 9): p. 1827-35.
68. Jung, E.M., et al., *Evidences for correlation between the reduced VCAM-1 expression and hyaluronan synthesis during cellular senescence of human mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **404**(1): p. 463-9.
69. Caplan, A.I., *Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 341-7.
70. Bunnell, B.A., et al., *Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation*. Methods, 2008. **45**(2): p. 115-20.
71. Jin, H.J., et al., *Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(9): p. 17986-8001.
72. Mahmoudifar, N. and P.M. Doran, *Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue*. Methods Mol Biol, 2015. **1340**: p. 53-64.
73. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng, 2001. **7**(2): p. 211-28.
74. Izadpanah, R., et al., *Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue*. J Cell Biochem, 2006. **99**(5): p. 1285-97.
75. Fan, C.G., et al., *Characterization and neural differentiation of fetal lung mesenchymal stem cells*. Cell Transplant, 2005. **14**(5): p. 311-21.

76. Campagnoli, C., et al., *Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow*. Blood, 2001. **98**(8): p. 2396-402.
77. Miao, Z., et al., *Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells*. Cell Biol Int, 2006. **30**(9): p. 681-7.
78. De Bari, C., et al., *Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(8): p. 1928-42.
79. In 't Anker, P.S., et al., *Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1548-9.
80. Delo, D.M., et al., *Amniotic fluid and placental stem cells*. Methods Enzymol, 2006. **419**: p. 426-38.
81. Noort, W.A., et al., *Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice*. Exp Hematol, 2002. **30**(8): p. 870-8.
82. Lee, O.K., et al., *Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood*. Blood, 2004. **103**(5): p. 1669-75.
83. Gronthos, S., et al., *Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13625-30.
84. Kraft, D.C., et al., *Mechanosensitivity of dental pulp stem cells is related to their osteogenic maturity*. Eur J Oral Sci, 2010. **118**(1): p. 29-38.
85. Williams, J.T., et al., *Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes*. Am Surg, 1999. **65**(1): p. 22-6.
86. Caballero, M., et al., *Osteoinduction in umbilical cord- and palate periosteum-derived mesenchymal stem cells*. Ann Plast Surg, 2010. **64**(5): p. 605-9.
87. Djouad, F., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism*. Stem Cells, 2007. **25**(8): p. 2025-32.
88. Mouiseddine, M., et al., *Characterization and histological localization of multipotent mesenchymal stromal cells in the human postnatal thymus*. Stem Cells Dev, 2008. **17**(6): p. 1165-74.
89. Zvaifler, N.J., et al., *Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals*. Arthritis Res, 2000. **2**(6): p. 477-88.
90. Murphy, M.B., K. Moncivais, and A.I. Caplan, *Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine*. Exp Mol Med, 2013. **45**: p. e54.
91. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin, 2013. **63**(1): p. 11-30.

92. Doorn, J., et al., *Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements*. Tissue Eng Part B Rev, 2012. **18**(2): p. 101-15.
93. Mirotsou, M., et al., *Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(5): p. 1643-8.
94. Caplan, A.I. and D. Correa, *The MSC: an injury drugstore*. Cell Stem Cell, 2011. **9**(1): p. 11-5.
95. Caplan, A.I. and J.E. Dennis, *Mesenchymal stem cells as trophic mediators*. J Cell Biochem, 2006. **98**(5): p. 1076-84.
96. Le Blanc, K. and D. Mougiakakos, *Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(5): p. 383-96.
97. Caplan, A.I. and J.M. Sorrell, *The MSC curtain that stops the immune system*. Immunol Lett, 2015. **168**(2): p. 136-9.
98. Squillaro, T., G. Peluso, and U. Galderisi, *Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update*. Cell Transplant, 2016. **25**(5): p. 829-48.
99. Nauta, A.J. and W.E. Fibbe, *Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells*. Blood, 2007. **110**(10): p. 3499-506.
100. Bernardo, M.E. and W.E. Fibbe, *Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation*. Cell Stem Cell, 2013. **13**(4): p. 392-402.
101. Di Nicola, M., et al., *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3838-43.
102. Tse, W.T., et al., *Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation*. Transplantation, 2003. **75**(3): p. 389-97.
103. Krampera, M., et al., *Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide*. Blood, 2003. **101**(9): p. 3722-9.
104. Rasmusson, I., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells*. Transplantation, 2003. **76**(8): p. 1208-13.
105. Meisel, R., et al., *Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation*. Blood, 2004. **103**(12): p. 4619-21.
106. Chabannes, D., et al., *A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells*. Blood, 2007. **110**(10): p. 3691-4.

107. Burr, S.P., F. Dazzi, and O.A. Garden, *Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance?* Immunol Cell Biol, 2013. **91**(1): p. 12-8.
108. Maccario, R., et al., *Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype.* Haematologica, 2005. **90**(4): p. 516-25.
109. Akiyama, K. and D. Sutoo, *Effect of different frequencies of music on blood pressure regulation in spontaneously hypertensive rats.* Neurosci Lett, 2011. **487**(1): p. 58-60.
110. Jiang, X.X., et al., *Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells.* Blood, 2005. **105**(10): p. 4120-6.
111. Nauta, A.J., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells.* J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2080-7.
112. Corcione, A., et al., *Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions.* Blood, 2006. **107**(1): p. 367-72.
113. Krampera, M., et al., *Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells.* Curr Opin Pharmacol, 2006. **6**(4): p. 435-41.
114. Sotiropoulou, P.A., et al., *Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells.* Stem Cells, 2006. **24**(1): p. 74-85.
115. Spaggiari, G.M., et al., *Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation.* Blood, 2006. **107**(4): p. 1484-90.
116. Keating, A., *Mesenchymal stromal cells: new directions.* Cell Stem Cell, 2012. **10**(6): p. 709-16.
117. Eggenhofer, E. and M.J. Hoogduijn, *Mesenchymal stem cell-educated macrophages.* Transplant Res, 2012. **1**(1): p. 12.
118. Nemeth, K., et al., *Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production.* Nat Med, 2009. **15**(1): p. 42-9.
119. Chen, L., et al., *Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing.* PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1886.
120. Melief, S.M., et al., *Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6.* Haematologica, 2013. **98**(6): p. 888-95.
121. Ren, G., et al., *Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide.* Cell Stem Cell, 2008. **2**(2): p. 141-50.

122. Waterman, R.S., et al., *A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10088.
123. Prockop, D.J. and J.Y. Oh, *Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation*. Mol Ther, 2012. **20**(1): p. 14-20.
124. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 836-41.
125. Wilson, A. and A. Trumpp, *Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 93-106.
126. Redondo-Castro, E., et al., *Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype in vitro*. Stem Cell Res Ther, 2017. **8**(1): p. 79.
127. Almeida-Porada, G., et al., *Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3620-7.
128. Devine, S.M. and R. Hoffman, *Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation*. Curr Opin Hematol, 2000. **7**(6): p. 358-63.
129. Masuda, S., et al., *Cotransplantation with MSCs improves engraftment of HSCs after autologous intra-bone marrow transplantation in nonhuman primates*. Exp Hematol, 2009. **37**(10): p. 1250-1257 e1.
130. Park, S.K., et al., *Co-transplantation of human mesenchymal stem cells promotes human CD34+ cells engraftment in a dose-dependent fashion in NOD/SCID mice*. J Korean Med Sci, 2007. **22**(3): p. 412-9.
131. Lazarus, H.M., et al., *Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients*. Biol Blood Marrow Transplant, 2005. **11**(5): p. 389-98.
132. Koc, O.N., et al., *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*. J Clin Oncol, 2000. **18**(2): p. 307-16.
133. Alvarez-Viejo, M., et al., *Quantifying mesenchymal stem cells in the mononuclear cell fraction of bone marrow samples obtained for cell therapy*. Transplant Proc, 2013. **45**(1): p. 434-9.
134. Jones, E.A., et al., *Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow*. Cytometry B Clin Cytom, 2006. **70**(6): p. 391-9.

135. Jones, E. and X. Yang, *Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status*. Injury, 2011. **42**(6): p. 562-8.
136. Harichandan, A. and H.J. Buhning, *Prospective isolation of human MSC*. Best Pract Res Clin Haematol, 2011. **24**(1): p. 25-36.
137. Lin, G., et al., *Tissue distribution of mesenchymal stem cell marker Stro-1*. Stem Cells Dev, 2011. **20**(10): p. 1747-52.
138. Gronthos, S., et al., *A novel monoclonal antibody (STRO-3) identifies an isoform of tissue nonspecific alkaline phosphatase expressed by multipotent bone marrow stromal stem cells*. Stem Cells Dev, 2007. **16**(6): p. 953-63.
139. Gronthos, S., et al., *Heat shock protein-90 beta is expressed at the surface of multipotential mesenchymal precursor cells: generation of a novel monoclonal antibody, STRO-4, with specificity for mesenchymal precursor cells from human and ovine tissues*. Stem Cells Dev, 2009. **18**(9): p. 1253-62.
140. Haynesworth, S.E., et al., *Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow*. Bone, 1992. **13**(1): p. 81-8.
141. Jones, E.A., et al., *Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(12): p. 3349-60.
142. Aslan, H., et al., *Osteogenic differentiation of noncultured immunisolated bone marrow-derived CD105+ cells*. Stem Cells, 2006. **24**(7): p. 1728-37.
143. Cleary, M.A., et al., *Expression of CD105 on expanded mesenchymal stem cells does not predict their chondrogenic potential*. Osteoarthritis Cartilage, 2016. **24**(5): p. 868-72.
144. Cheifetz, S., et al., *Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(27): p. 19027-30.
145. Rokhlin, O.W., et al., *Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow*. J Immunol, 1995. **154**(9): p. 4456-65.
146. Airas, L., et al., *Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells*. J Cell Biol, 1997. **136**(2): p. 421-31.
147. Strohmeier, G.R., et al., *Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia*. J Clin Invest, 1997. **99**(11): p. 2588-601.
148. Anjos-Afonso, F. and D. Bonnet, *Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment*. Blood, 2007. **109**(3): p. 1298-306.
149. Gang, E.J., et al., *SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1743-51.

150. Martinez, C., et al., *Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs*. Blood, 2007. **109**(10): p. 4245-8.
151. Covas, D.T., et al., *Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts*. Exp Hematol, 2008. **36**(5): p. 642-54.
152. Kaltz, N., et al., *Novel markers of mesenchymal stem cells defined by genome-wide gene expression analysis of stromal cells from different sources*. Exp Cell Res, 2010. **316**(16): p. 2609-17.
153. Quirici, N., et al., *Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies*. Exp Hematol, 2002. **30**(7): p. 783-91.
154. Yamada, T., et al., *Age-related changes of p75 neurotrophin receptor-positive adipose-derived stem cells*. J Dermatol Sci, 2010. **58**(1): p. 36-42.
155. Soncini, M., et al., *Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. **1**(4): p. 296-305.
156. Maijenburg, M.W., et al., *The composition of the mesenchymal stromal cell compartment in human bone marrow changes during development and aging*. Haematologica, 2012. **97**(2): p. 179-83.
157. Jones, E.A., et al., *Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(6): p. 1731-40.
158. Civenni, G., et al., *Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth*. Cancer Res, 2011. **71**(8): p. 3098-109.
159. Alexander, D., et al., *LNGFR induction during osteogenesis of human jaw periosteum-derived cells*. Cell Physiol Biochem, 2009. **24**(3-4): p. 283-90.
160. Mikami, Y., et al., *CD271/p75(NTR) inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages*. Stem Cells Dev, 2011. **20**(5): p. 901-13.
161. Cuthbert, R., et al., *Single-platform quality control assay to quantify multipotential stromal cells in bone marrow aspirates prior to bulk manufacture or direct therapeutic use*. Cytotherapy, 2012. **14**(4): p. 431-40.
162. Veyrat-Masson, R., et al., *Mesenchymal content of fresh bone marrow: a proposed quality control method for cell therapy*. Br J Haematol, 2007. **139**(2): p. 312-20.
163. Li, H., et al., *Low/negative expression of PDGFR-alpha identifies the candidate primary mesenchymal stromal cells in adult human bone marrow*. Stem Cell Reports, 2014. **3**(6): p. 965-74.

164. Lu, B., P.T. Pang, and N.H. Woo, *The yin and yang of neurotrophin action*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(8): p. 603-14.
165. Nykjaer, A., T.E. Willnow, and C.M. Petersen, *p75NTR--live or let die*. Curr Opin Neurobiol, 2005. **15**(1): p. 49-57.
166. Roux, P.P. and P.A. Barker, *Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor*. Prog Neurobiol, 2002. **67**(3): p. 203-33.
167. Rogers, M.L., et al., *CD 271 (P75 neurotrophin receptor)*. J Biol Regul Homeost Agents, 2008. **22**(1): p. 1-6.
168. Huebner, K., et al., *The nerve growth factor receptor gene is at human chromosome region 17q12-17q22, distal to the chromosome 17 breakpoint in acute leukemias*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(5): p. 1403-7.
169. Crowley, C., et al., *Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons*. Cell, 1994. **76**(6): p. 1001-11.
170. Ruberti, F., et al., *Phenotypic knockout of nerve growth factor in adult transgenic mice reveals severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen, and skeletal muscle dystrophy*. J Neurosci, 2000. **20**(7): p. 2589-601.
171. Bogenmann, E., et al., *Generation of mice with a conditional allele for the p75(NTR) neurotrophin receptor gene*. Genesis, 2011. **49**(11): p. 862-9.
172. Lee, K.F., et al., *Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system*. Cell, 1992. **69**(5): p. 737-49.
173. Niklison-Chirou, M.V., et al., *TAp73 knockout mice show morphological and functional nervous system defects associated with loss of p75 neurotrophin receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(47): p. 18952-7.
174. Dokter, M., et al., *Implications of p75NTR for dentate gyrus morphology and hippocampus-related behavior revisited*. Brain Struct Funct, 2015. **220**(3): p. 1449-62.
175. Smeyne, R.J., et al., *Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene*. Nature, 1994. **368**(6468): p. 246-9.
176. Yeo, T.T. and W.L. Nowinski, *Functional neurosurgery aided by use of an electronic brain atlas*. Acta Neurochir Suppl, 1997. **68**: p. 93-9.
177. Levi-Montalcini, R. and P.U. Angeletti, *Nerve growth factor*. Physiol Rev, 1968. **48**(3): p. 534-69.
178. Schor, N.F., *The p75 neurotrophin receptor in human development and disease*. Prog Neurobiol, 2005. **77**(3): p. 201-14.

179. Cattoretti, G., et al., *Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections*. J Pathol, 1993. **171**(2): p. 83-98.
180. Caneva, L., et al., *Immuno-electron microscopy characterization of human bone marrow stromal cells with anti-NGFR antibodies*. Blood Cells Mol Dis, 1995. **21**(2): p. 73-85.
181. Hermida-Gomez, T., et al., *Bone marrow cells immunomagnetically selected for CD271+ antigen promote in vitro the repair of articular cartilage defects*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(7-8): p. 1169-79.
182. Thomson, T.M., et al., *Expression of human nerve growth factor receptor on cells derived from all three germ layers*. Exp Cell Res, 1988. **174**(2): p. 533-9.
183. Wheeler, E.F. and M. Bothwell, *Spatiotemporal patterns of expression of NGF and the low-affinity NGF receptor in rat embryos suggest functional roles in tissue morphogenesis and myogenesis*. J Neurosci, 1992. **12**(3): p. 930-45.
184. Cox, G., et al., *High abundance of CD271(+) multipotential stromal cells (MSCs) in intramedullary cavities of long bones*. Bone, 2012. **50**(2): p. 510-7.
185. D'ippolito, G., et al., *Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(7): p. 1115-22.
186. Shin, K.S., et al., *Characterization of Fetal Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells*. Int J Stem Cells, 2009. **2**(1): p. 51-8.
187. Shaer, A., et al., *Isolation and characterization of Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Placental Decidua Basalis; Umbilical cord Wharton's Jelly and Amniotic Membrane*. Pak J Med Sci, 2014. **30**(5): p. 1022-6.
188. Genbacev, O., L. Vicovac, and N. Larocque, *The role of chorionic cytotrophoblasts in the smooth chorion fusion with parietal decidua*. Placenta, 2015. **36**(7): p. 716-22.
189. ; Available from: <http://medicinase.com/pregnancy>.
190. Dzierzak, E. and C. Robin, *Placenta as a source of hematopoietic stem cells*. Trends Mol Med, 2010. **16**(8): p. 361-7.
191. Pasquinelli, G., et al., *Ultrastructural characteristics of human mesenchymal stromal (stem) cells derived from bone marrow and term placenta*. Ultrastruct Pathol, 2007. **31**(1): p. 23-31.
192. Sood, R., et al., *Gene expression patterns in human placenta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(14): p. 5478-83.
193. Caruso, M., M. Evangelista, and O. Parolini, *Human term placental cells: phenotype, properties and new avenues in regenerative medicine*. Int J Mol Cell Med, 2012. **1**(2): p. 64-74.

194. Matikainen, T. and J. Laine, *Placenta--an alternative source of stem cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **207**(2 Suppl): p. 544-9.
195. Zhang, Y., et al., *Comparison of mesenchymal stem cells from human placenta and bone marrow*. Chin Med J (Engl), 2004. **117**(6): p. 882-7.
196. Nagamura-Inoue, T. and H. He, *Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility*. World J Stem Cells, 2014. **6**(2): p. 195-202.
197. Nanaev, A.K., et al., *Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord*. Placenta, 1997. **18**(1): p. 53-64.
198. Batsali, A.K., et al., *Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications*. Curr Stem Cell Res Ther, 2013. **8**(2): p. 144-55.
199. Troyer, D.L. and M.L. Weiss, *Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population*. Stem Cells, 2008. **26**(3): p. 591-9.
200. McElreavey, K.D., et al., *Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord*. Biochem Soc Trans, 1991. **19**(1): p. 29S.
201. Weiss, M.L. and D.L. Troyer, *Stem cells in the umbilical cord*. Stem Cell Rev, 2006. **2**(2): p. 155-62.
202. Ogawa, M., *Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells*. Blood, 1993. **81**(11): p. 2844-53.
203. Szilvassy, S.J., et al., *Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(22): p. 8736-40.
204. Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(6): p. 640-53.
205. Till, J.E. and C.E. Mc, *A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells*. Radiat Res, 1961. **14**: p. 213-22.
206. Morrison, S.J. and D.T. Scadden, *The bone marrow niche for haematopoietic stem cells*. Nature, 2014. **505**(7483): p. 327-34.
207. Mendelson, A. and P.S. Frenette, *Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration*. Nat Med, 2014. **20**(8): p. 833-46.
208. Kumar, S. and H. Geiger, *HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo*. Trends Mol Med, 2017. **23**(9): p. 799-819.
209. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
210. Lataillade, J.J., et al., *Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence*. Blood, 2008. **112**(8): p. 3026-35.

211. Shiozawa, Y. and R.S. Taichman, *Cancer Stem Cells and the Bone Marrow Microenvironment*. Bonekey Rep, 2012. **2012**(1).
212. Kirouac, D.C. and P.W. Zandstra, *Understanding cellular networks to improve hematopoietic stem cell expansion cultures*. Curr Opin Biotechnol, 2006. **17**(5): p. 538-47.
213. Ema, H., et al., *In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1281-8.
214. Takizawa, H., U. Schanz, and M.G. Manz, *Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells: mission accomplished?* Swiss Med Wkly, 2011. **141**: p. w13316.
215. Xie, J. and C. Zhang, *Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells*. Sci China Life Sci, 2015. **58**(9): p. 839-53.
216. Heinz, N., et al., *Comparison of Different Cytokine Conditions Reveals Resveratrol as a New Molecule for Ex Vivo Cultivation of Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem Cells*. Stem Cells Transl Med, 2015. **4**(9): p. 1064-72.
217. Verstegen, M.M., A.W. Wognum, and G. Wagemaker, *Thrombopoietin is a major limiting factor for selective outgrowth of human umbilical cord blood cells in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient recipient mice*. Br J Haematol, 2003. **122**(5): p. 837-46.
218. Sorrentino, B.P., *Clinical strategies for expansion of haematopoietic stem cells*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(11): p. 878-88.
219. Sauvageau, G., N.N. Iscove, and R.K. Humphries, *In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells*. Oncogene, 2004. **23**(43): p. 7223-32.
220. Zheng, J., et al., *Ex vivo expanded hematopoietic stem cells overcome the MHC barrier in allogeneic transplantation*. Cell Stem Cell, 2011. **9**(2): p. 119-30.
221. Zhang, C.C., et al., *Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3415-23.
222. Jing, D., et al., *Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells--modeling the niche compartments in vitro*. Haematologica, 2010. **95**(4): p. 542-50.
223. da Silva, C.L., et al., *A human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo expansion/maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cells*. Exp Hematol, 2005. **33**(7): p. 828-35.
224. McNiece, I., et al., *Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells*. Cytotherapy, 2004. **6**(4): p. 311-7.
225. Breems, D.A., et al., *Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of CD34+ mobilized peripheral blood stem cells*. Blood, 1998. **91**(1): p. 111-7.

226. Kim, D.H., et al., *Non-CD34+ cells, especially CD8+ cytotoxic T cells and CD56+ natural killer cells, rather than CD34 cells, predict early engraftment and better transplantation outcomes in patients with hematologic malignancies after allogeneic peripheral stem cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**(7): p. 719-28.
227. Bakhshi, T., et al., *Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture*. Transfusion, 2008. **48**(12): p. 2638-44.
228. Kelly, S.S., et al., *Ex vivo expansion of cord blood*. Bone Marrow Transplant, 2009. **44**(10): p. 673-81.
229. Tsukumo, S. and K. Yasutomo, *Notch governing mature T cell differentiation*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7109-13.
230. Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, and R.J. Lake, *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development*. Science, 1999. **284**(5415): p. 770-6.
231. Fiuza, U.M. and A.M. Arias, *Cell and molecular biology of Notch*. J Endocrinol, 2007. **194**(3): p. 459-74.
232. Ohtsuka, T., et al., *Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation*. EMBO J, 1999. **18**(8): p. 2196-207.
233. Shimizu, K., et al., *Binding of Delta1, Jagged1, and Jagged2 to Notch2 rapidly induces cleavage, nuclear translocation, and hyperphosphorylation of Notch2*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(18): p. 6913-22.
234. Nwabo Kamdje, A.H., et al., *Notch-3 and Notch-4 signaling rescue from apoptosis human B-ALL cells in contact with human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*. Blood, 2011. **118**(2): p. 380-9.
235. Hilton, M.J., et al., *Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 306-14.
236. Felli, M.P., et al., *Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development*. Int Immunol, 1999. **11**(7): p. 1017-25.
237. Chiba, S., *Notch signaling in stem cell systems*. Stem Cells, 2006. **24**(11): p. 2437-47.
238. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-6.
239. Butler, J.M., et al., *Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(3): p. 251-64.

240. Germain, R.N., *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 309-22.
241. Yasutomo, K., et al., *The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate*. Nature, 2000. **404**(6777): p. 506-10.
242. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
243. Maekawa, Y., et al., *Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4+ T cells*. Immunity, 2003. **19**(4): p. 549-59.
244. Pui, J.C., et al., *Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination*. Immunity, 1999. **11**(3): p. 299-308.
245. Radtke, F., et al., *Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1*. Immunity, 1999. **10**(5): p. 547-58.
246. Washburn, T., et al., *Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision*. Cell, 1997. **88**(6): p. 833-43.
247. Cruickshank, M.N. and D. Ulgiati, *The role of notch signaling in the development of a normal B-cell repertoire*. Immunol Cell Biol, 2010. **88**(2): p. 117-24.
248. Amsen, D., et al., *Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells*. Cell, 2004. **117**(4): p. 515-26.
249. Hoyne, G.F., et al., *Serrate1-induced notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4(+) T cells*. Int Immunol, 2000. **12**(2): p. 177-85.
250. Kuroda, K., et al., *Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway*. Immunity, 2003. **18**(2): p. 301-12.
251. Singh, N., et al., *Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis*. Exp Hematol, 2000. **28**(5): p. 527-34.
252. Koch, U., et al., *Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment*. J Exp Med, 2008. **205**(11): p. 2515-23.
253. Mohtashami, M., et al., *Direct comparison of Dll1- and Dll4-mediated Notch activation levels shows differential lymphomyeloid lineage commitment outcomes*. J Immunol, 2010. **185**(2): p. 867-76.
254. Besseyrias, V., et al., *Hierarchy of Notch-Delta interactions promoting T cell lineage commitment and maturation*. J Exp Med, 2007. **204**(2): p. 331-43.
255. Zuniga-Pflucker, J.C., *T-cell development made simple*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(1): p. 67-72.

256. Schmitt, T.M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro*. Immunity, 2002. **17**(6): p. 749-56.
257. de Pooter, R. and J.C. Zuniga-Pflucker, *T-cell potential and development in vitro: the OP9-DL1 approach*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(2): p. 163-8.
258. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
259. Mafi, R., et al., *Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature*. Open Orthop J, 2011. **5 Suppl 2**: p. 242-8.
260. Prockop, D.J., *Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms*. Mol Ther, 2009. **17**(6): p. 939-46.
261. Portmann-Lanz, C.B., et al., *Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration*. Am J Obstet Gynecol, 2006. **194**(3): p. 664-73.
262. Delorme, B. and P. Charbord, *Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells*. Methods Mol Med, 2007. **140**: p. 67-81.
263. Li, Z., et al., *Molecular characterization of heterogeneous mesenchymal stem cells with single-cell transcriptomes*. Biotechnol Adv, 2013. **31**(2): p. 312-7.
264. Buhring, H.J., et al., *Novel markers for the prospective isolation of human MSC*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1106**: p. 262-71.
265. Mabuchi, Y., et al., *Prospective isolation of murine and human bone marrow mesenchymal stem cells based on surface markers*. Stem Cells Int, 2013. **2013**: p. 507301.
266. Tormin, A., et al., *Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC) based on gene expression profiling of functionally defined MSC subsets*. Cytotherapy, 2009. **11**(2): p. 114-28.
267. Churchman, S.M., et al., *Transcriptional profile of native CD271+ multipotential stromal cells: evidence for multiple fates, with prominent osteogenic and Wnt pathway signaling activity*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(8): p. 2632-43.
268. Hass, R., et al., *Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC*. Cell Commun Signal, 2011. **9**: p. 12.
269. Wang, H.S., et al., *Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord*. Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1330-7.
270. Pelekanos, R.A., et al., *Isolation and Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Human Placenta Tissue*. J Vis Exp, 2016(112).

271. Ayuzawa, R., et al., *Naive human umbilical cord matrix derived stem cells significantly attenuate growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo*. Cancer Lett, 2009. **280**(1): p. 31-7.
272. Vellasamy, S., et al., *Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue*. World J Stem Cells, 2012. **4**(6): p. 53-61.
273. Ilancheran, S., Y. Moodley, and U. Manuelpillai, *Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair?* Placenta, 2009. **30**(1): p. 2-10.
274. In 't Anker, P.S., et al., *Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta*. Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1338-45.
275. Kranz, A., et al., *Transplantation of placenta-derived mesenchymal stromal cells upon experimental stroke in rats*. Brain Res, 2010. **1315**: p. 128-36.
276. Li, X., et al., *Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation*. Int J Mol Med, 2014. **34**(3): p. 695-704.
277. Smith, J.R., et al., *Standardizing Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells for Translation to Clinical Use: Selection of GMP-Compliant Medium and a Simplified Isolation Method*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 6810980.
278. Lei, J., et al., *A simple and biosafe method for isolation of human umbilical vein endothelial cells*. Anal Biochem, 2016. **508**: p. 15-8.
279. La Rocca, G., et al., *Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers*. Histochem Cell Biol, 2009. **131**(2): p. 267-82.
280. Rubtsov, Y., et al., *Molecular Mechanisms of Immunomodulation Properties of Mesenchymal Stromal Cells: A New Insight into the Role of ICAM-1*. Stem Cells Int, 2017. **2017**: p. 6516854.
281. Herrmann, J.L., et al., *Preconditioning mesenchymal stem cells with transforming growth factor-alpha improves mesenchymal stem cell-mediated cardioprotection*. Shock, 2010. **33**(1): p. 24-30.
282. Kyurkchiev, D., et al., *Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells*. World J Stem Cells, 2014. **6**(5): p. 552-70.
283. Silini, A.R., et al., *The Long Path of Human Placenta, and Its Derivatives, in Regenerative Medicine*. Front Bioeng Biotechnol, 2015. **3**: p. 162.
284. Friedman, R., et al., *Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**(12): p. 1477-86.
285. Bongso, A. and C.Y. Fong, *The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord*. Stem Cell Rev, 2013. **9**(2): p. 226-40.

286. Hwang, J.H., et al., *Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow*. J Korean Med Sci, 2009. **24**(4): p. 547-54.
287. Rouas-Freiss, N., et al., *The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5249-54.
288. Le Bouteiller, P., *HLA-G in the human placenta: expression and potential functions*. Biochem Soc Trans, 2000. **28**(2): p. 208-12.
289. Meesuk, L., et al., *The immunosuppressive capacity of human mesenchymal stromal cells derived from amnion and bone marrow*. Biochem Biophys Rep, 2016. **8**: p. 34-40.
290. Chen, H., et al., *Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells: immune property genes assay and effect of transplantation on the immune cells of heart failure patients*. Cell Immunol, 2012. **276**(1-2): p. 83-90.
291. Ding, D.C., et al., *Characterization of HLA-G and Related Immunosuppressive Effects in Human Umbilical Cord Stroma-Derived Stem Cells*. Cell Transplant, 2016. **25**(2): p. 217-28.
292. Carosella, E.D., et al., *HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance*. Adv Immunol, 2003. **81**: p. 199-252.
293. Gotterstrom, C., et al., *Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells*. Am J Obstet Gynecol, 2004. **190**(1): p. 239-45.
294. Riviere, I., C.E. Dunbar, and M. Sadelain, *Hematopoietic stem cell engineering at a crossroads*. Blood, 2012. **119**(5): p. 1107-16.
295. Ng, A.P. and W.S. Alexander, *Haematopoietic stem cells: past, present and future*. Cell Death Discov, 2017. **3**: p. 17002.
296. Zhang, Y. and Y. Gao, *Novel chemical attempts at ex vivo hematopoietic stem cell expansion*. Int J Hematol, 2016. **103**(5): p. 519-29.
297. Ghazanfari, R., et al., *Human Non-hematopoietic CD271(pos)/CD140a(low/neg) Bone Marrow Stroma Cells Fulfill Stringent Stem Cell Criteria in Serial Transplantations*. Stem Cells Dev, 2016.
298. Urbanek, K., et al., *Notch signaling pathway and gene expression profiles during early in vitro differentiation of liver-derived mesenchymal stromal cells to osteoblasts*. Lab Invest, 2017. **97**(10): p. 1225-1234.
299. Shi, R., et al., *Notch pathway gene expression after co-culture of umbilical cord mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells*. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2012. **28**(8): p. 793-6.
300. Arutyunyan, I., et al., *Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 6901286.

301. Battula, V.L., et al., *Prospective isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human placenta using a frizzled-9-specific monoclonal antibody*. Differentiation, 2008. **76**(4): p. 326-36.
302. Cohen, D.M., and Chen, C.S. 2008; Available from: <http://www.stembook.org>.



8. EKLER

EK 1. Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzinleri



Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/
Sayı: 52338575 -106

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

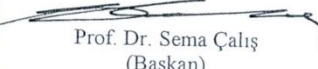
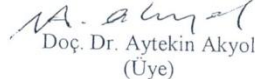
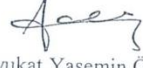
TOPLANTI TARİHİ	: 27.08.2015 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI	: 2015/07
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2015/68
KARAR NUMARASI	: 2015/68 – 10
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	Yrd. Doç. Dr. Fatima AERTS KAYA
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	Gözde AYDIN, Gülen GÜNEY, Aysun SARIKAYA ve Parisa SHARAFI
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Barış ULUM ve Trui VISSER
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 90 adet NSGW41 fare modeli ve 96 adet RAG2 nakavt fare modeli

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Fatima AERTS KAYA'nın araştırma yürütücüsü olduğu 2015/68 kayıt numaralı **"Kalıtsal Hastalıklarda Hematopoetik Kök Hücre Tedavisinin Geliştirilmesi"** isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU GÜNDEMİ - İMZA SİRKÜLERİ
TOPLANTI TARİHİ : 27.08.2015 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI : 2015/07
TOPLANTI SAATİ : 13.30

 Prof. Dr. Sema Çalış (Başkan)	 Prof. Dr. Nüket Örnek Büken (Üye)	 Prof. Dr. M. Yurdum Sara (Üye)
 Prof. Dr. Neslihan H. Dikmenoğlu Falkmarken (Üye)	 Prof. Dr. Belgin Can (Üye)	 Prof. Dr. Mehmet Ali Onur (Üye)
- İZİMLİ - Doç. Dr. Hakan EL (Üye)	 Doç. Dr. Aytekin Akyol (Üye)	- İZİMLİ - Doç. Dr. Ersoy KONAŞ (Üye)
- İZİMLİ - Doç. Dr. İlyas Onbaşılar (Üye)	 Doç. Dr. Mehmet Alper Çetinkaya (Üye)	 Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide Tel (Üye)
- İZİMLİ - Mevlüt Öksüzoğlu (Üye)	 Avukat Yasemin Özselçuk (Üye)	



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Sayı: 16969557 - 352

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 27.02.2013 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2013/04
Proje No : GO 13/156 (Değerlendirme Tarihi 13.02.2013)
Karar No : GO 13/156 - 17

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, öğretim görevlilerinden Dr. Fatime S.F Aerts Kaya'nın sorumlu araştırmacı olduğu Uzm. Bio. Gözde Aydın, Dr. Tülay Karaağaç Akyol, Dr. Belgin Altun, Doç. Dr. Özgür Özyüncü ve Prof. Dr. Duygu Çetinkaya ile birlikte çalışacakları GO 13/156 kayıt numaralı ve **"CD271 Antikoru Kullanılarak İzole Edilen Multipotent Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Hematopoetik Kök Hücrelerin Ko-Kültürü Sonrasında İn Vitro ve İn Vivo Lenfohematopoezin Optimizasyonu"** başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan da etik onay alınması koşuluyla uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurtan Akarsu

(Başkan)

9 Prof. Dr. Melahat Görduysus

(Üye)

İZİNLİ

2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken

(Üye)

10. Doç. Dr. R. Köksal Özgül

(Üye)

3. Prof. Dr. Cansın Saçkesen

(Üye)

11. Doç. Dr. M. Yıldırım Sara

(Üye)

4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu

(Üye)

12. Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan

(Üye)

5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer

(Üye)

İZİNLİ

13 Doç. Dr. S. Kutay Demirkan

(Üye)

6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay

(Üye)

KATILMADI

14. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl

(Üye)

7. Prof. Dr. Songül Vaizoglu

(Üye)

15. Av. Meltem Onurlu

(Üye)

8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal

(Üye)



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

Sayı : 16969557-548

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 29.04.2015 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2015/09
Proje No : GO 15/268 (Değerlendirme Tarihi: 01.04.2015)
Karar No : GO 15/268 - 11

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim üyelerinden Prof.Dr. Duygu ÇETİNKAYA ile Yrd.Doç.Dr. Fatima AERTS KAYA'nın sorumlu araştırmacısı oldukları, Dr. Parisa SHARAFI, Uzm.Bio. Gözde AYDIN, Doç.Dr. Özgür ÖZYÜNCÜ, Doç.Dr. Deniz Çağdaş AYVAZ ve Prof.Dr. İlhan TEZCAN ile birlikte çalışacakları, GO 15/268 kayıt numaralı ve **"Primer İmmün Yetmezliği Tedavisi için İleri Hücresel Terapiler (CELL-PID)"** başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|---|--|
| 1.Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan) | 9 Prof. Dr. Rahime Nohutçu (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye) | 10. Prof. Dr. R. Köksal Özgül (Üye) |
| İZİNLİ | 11. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım Sara (Üye) | İZİNLİ |
| 4. Prof. Dr. Seyda F. Müftüoğlu (Üye) | 12. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye) | 13 Prof. Dr Leyla Dinç (Üye) |
| İZİNLİ | İZİNLİ |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | 14. Prof. Dr. Hatice Doğan Buzoğlu (Üye) |
| İZİNLİ | 15. Av. Meltem Onurlu (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Ali Düzova (Üye) | |
| 8. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöi (Üye) | |

9. ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Gözde AYDIN

Doğum Yeri ve Tarihi: Altındağ, ANKARA/02-11-1987

Uyruğu: T.C.

İletişim Adresi: 9 Eylül sok. No:50/8 İncesu/Ankara

Telefon: 0553-874-31-44

E-mail: gzdaydin22@hotmail.com

II. Eğitim

2011-2018

Hacettepe Üniversitesi

Kök Hücre Doktora, Kök Hücre Bilimler Anabilim Dalı

Doktora Akademik Ortalama:3.78

Tez başlığı: Değişik kaynaklı MKH'lerin detaylı

karakterizasyonu, lenfohematopoezi destekleyici özellikleri ve izolasyonunda CD271 antijeninin önemi

2008-2011

Hacettepe Üniversitesi

Yüksek Lisans, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Akademik Ortalama:3.12

Tez başlığı: Karaciğer ve meme kanseri hücrelerinde çoklu ilaç direnci ve apoptotik proteinlerin gen ekspresyon düzeylerinin incelenmesi

2004-2008

Ankara Üniversitesi

Lisans, Fen Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Lisans Akademik Ortalama:3.80

III. Mesleki Deneyimi

2016- Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Cebeci kampüsü, Kordon
Kanı Bankası

IV. Bilimsel Faaliyet

Yayınlar

- **Gözde Aydın**, Ayşe Ercan. Gene Expression Levels of Apoptotic Proteins and Multidrug Resistance Genes in HEPG2 Cells. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* 2012:32(2),119-132.
- **Aydın G**, Özyüncü Ö, Günel-Özcan A, Kuşkonmaz B, Uçkan-Çetinkaya D, Aerts-Kaya F. Prospectively isolated CD271+ Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells support in vitro expansion of and lymphopoietic differentiation CD34+ Hematopoietic Stem Cells. *Hazırlanmaktadır*.
- Sarıkaya A, **Aydın G**, Özyüncü Ö, Şahin E, Uçkan-Çetinkaya D, Aerts-Kaya F. Comparison of immune modulatory properties of bone marrow and placenta-derived mesenchymal stem cells. *Int J Stem Cells'e submit edilmiştir*.
- Aerts-Kaya F, Kilic E, Köse S, **Aydın G**, Cagnan I, Kuşkonmaz B, Uçkan-Cetinkaya D. Effect of G-CSF treatment on the hematopoietic microenvironment in healthy humans. *Biol Blood Marrow Transplant'a submit edilmiştir*.

Poster ve Özetler/Bildiriler

- F. Aerts Kaya, E. Kilic, **G. Aydın**, S. Kose, I. Cagnan, Ö. Gültekin, B. Kuskonmaz, D. Uçkan. Differential Cytokine Expression Profile of Healthy Human Bone Marrow Plasma Samples from the Endosteal and Vascular Region. ISEH Annual Scientific Meeting 2013 Vienna, Austria. Poster P1145. *Exp Hematol* 2013: 41(8), Suppl 1: S61.
- F. Aerts Kaya, S. Kose, **G. Aydın**, I. Cagnan, S. Bocutcu, B. Kuskonmaz, D. Uçkan. Effects of in-vivo G-CSF Stimulation on Cytokine Levels in Bone Marrow Plasma

Samples From Healthy Donors. ISEH Annual Scientific Meeting 2013 Vienna, Austria. Poster P1143. Exp Hematol 2013; 41(8), Suppl 1: S60.

- F. Aerts Kaya, I. Cagnan, **G. Aydin**, S. Kose, A. Semerci, B. Kuskonmaz, D. Uçkan. Assessment of Human Bone Marrow Plasma Samples Suggests A Different Role for Mesenchymal Stromal Cells in Distinct Areas Mediated by PDGF-BB/PDGF-R. ISEH Annual Scientific Meeting 2013 Vienna, Austria. Poster P1144. Exp Hematol 2013; 41(8), Suppl 1: S61.
- Fatima Aerts Kaya, **Gözde Aydin**, Özgür Özyüncü, Selin Aytaç Eyüpoğlu, Duygu Uçkan. Expansion of hematopoietic stem/progenitor cells from bone marrow, peripheral blood and umbilical cord blood under serum-free conditions by co-culture with plastic adherent or CD271+ mesenchymal stromal cells. ESGCT and SETGyC Collaborative Congress 2013 Madrid, Spain. doi:10.1089/hum.2013.2513. Poster P110. Hum Gene Ther 2013.
- Fatima Aerts Kaya, **Gözde Aydin**, Duygu Uçkan. Isolation and Characterization of Prospectively Isolated CD271+ Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cells. ESGCT and SETGyC Collaborative Congress 2013 Madrid, Spain. doi:10.1089/hum.2013.2513. Poster P118. Hum Gene Ther 2013.
- Fatima Aerts Kaya, Ilgın Çağnan, Sevil Köse, **Gözde Aydin**, Barış Kuşkonmaz, Duygu Uçkan. Sağlıklı insan kemik iliği endosteal ve santral bölgelerinde sitokin ekspresyonları ve G-CSF etkisi. 39. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya, Turkey. Oral, S-35, p42-43.
- Fatima Aerts Kaya, **Gözde Aydin**, Selin Aytaç Eyüpoğlu, Duygu Uçkan. Kemik iliğinden prospektif izolasyon yapılarak elde edilen CD271+ Mezenkimal Stromal Hücrelerin *in vitro* hematopoezi destekleyici etkisi. 39. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya, Turkey. Presented Poster, TP-02, p76-77. TÜRK HEMATOLOJİ DERNEĞİ BİLDİRİ ÖDÜLLERİ Poster Award.
- Fatima Aerts Kaya, Gülen Güney, **Gözde Aydin**, Rüveyda Dönmez, Baris Kuskonmaz, Duygu Uçkan. Platelet derived growth factor-BB inhibits proliferation of human bone marrow derived multipotent mesenchymal stem cells in presence of fetal calf serum and rapidly suppresses PDGF-Rb expression.

Abstract #3717, PB1901. EHA 2014, Milano, Italy. *Haematologica* June 1, 2014:99(S1), p 727.

- Fatima Aerts Kaya, Gülen Güney, **Gözde Aydın**, Baris Kuskonmaz, Duygu Uçkan. Imatinib and platelet derived growth factor cooperate in inhibition of mesenchymal stem cell proliferation and suppression of platelet derived growth factor receptor expression. Abstract #3719, PB1535. EHA 2014, Milano, Italy. *Haematologica* June 1, 2014:99(S1), p594-5.
- Gülen Güney, Fatima Aerts Kaya, **Gözde Aydın**, Rüveyda Dönmez, Baris Kuskonmaz, Duygu Uçkan. Sağlıklı insan kemik iliği mikroçevresi ve Mezenkimal Kök Hücrelerde Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) ve Reseptörünün (PDGF-R) incelenmesi. Abstract S-05. 1. Kemik İliği Transplantasyonu ve Hücrel Tedaviler Kongresi 2014. Kocaeli, Turkey. Oral presentation.
- Gülen Güney, Fatima Aerts Kaya, **Gözde Aydın**, Baris Kuskonmaz, Duygu Uçkan. Sağlıklı insan Mezenkimal Kök Hücre farklılaşması, çoğalması ve PDGF-R ekspresyonu üzerinde İmatinib Mesylate'ın etkisi. Abstract P-19. 1. Kemik İliği Transplantasyonu ve Hücrel Tedaviler Kongresi 2014. Kocaeli, Turkey. Poster.
- **Gözde Aydın**, Fatima Aerts Kaya, Gülen Güney, Duygu Uçkan. Kemik iliğinden prospektif olarak izole edilen CD271+ ve Plastik-Aderan Mezenkimal Kök Hücre özelliklerinin karşılaştırılması ve hematopoez destekleyici özelliklerinin araştırılması. Abstract S-16. 1. Kemik İliği Transplantasyonu ve Hücrel Tedaviler Kongresi 2014. Kocaeli, Turkey. Oral presentation.
- **Gözde Aydın**, Fatima Aerts Kaya, Duygu Uçkan. Enzimatik ve non-enzimatik kaldırma yöntemlerin hematopoetik ve mezenkimal kök hücre yüzey reseptörlerin ve CXCR4 ifadelerine üzerine olan etkisi. Abstract P-35. 1. Kemik İliği Transplantasyonu ve Hücrel Tedaviler Kongresi 2014. Kocaeli, Turkey. Poster.
- **Gözde Aydın**, Fatima Aerts Kaya, Ilgın Çağnan, Ayşen Günel-Özcan, Duygu Uçkan-Çetinkaya. Gene expression of Notch receptors and ligands by plastic adherent and prospectively isolated MSCs. Abstract. ESGCT 2014, The Hague, The

Netherlands. Poster P188. *Hum Gen Ther* Oct. 2014: A116. DOI: 10.1089/hum.2014.2536.abstracts

- **Gozde Aydin**, Fatima Aerts-Kaya, Aysen Gunel-Ozcan, Duygu Uckan-Cetinkaya. Gene expression of Notch receptors and ligands by human Mesenchymal Stem Cells from different tissues. Abstract EBMT15-ABS-2697. EBMT 2015. Poster P053. *Bone Marrow Transplant* 2015(50), Supplement 1, S144.
- **Gozde Aydin**, Fatima Aerts-Kaya, Duygu Uckan-Cetinkaya. Comparison of different enzymatic and non-enzymatic methods on cell surface expression of CXCR4 by human CD34+ Hematopoietic Stem Cells and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Abstract EBMT15-ABS-2688. EBMT 2015. Poster P032. *Bone Marrow Transplant* 2015(50), Supplement 1, S133.
- İnci Cevher, Parisa Sharafi, **Gözde Aydin**, Ayşen Günel-Özcan, Duygu Uçkan-Çetinkaya, Fatima Aerts-Kaya. Use of Mesenchymal Stem Cells as Feeder Cells to Support In Vitro T- and B-Cell Differentiation of Hematopoietic Stem Cells. Abstract ICMM 2015. Poster.
- Parisa Sharafi, **Gozde Aydin**, Duygu Uçkan-Çetinkaya, Gerard Wagemaker, Fatima Aerts-Kaya. Comparison of different serum-free media for in vitro expansion of Hematopoietic Stem Cells. Abstract ESGCT 2015, Helsinki, Finland. P212. *Hum Gene Ther*. 2015. 26(10). A89.
- **Gozde Aydin**, Duygu Uçkan-Çetinkaya, Fatima Aerts-Kaya. Prospectively isolated CD271+ Mesenchymal Stem Cells support expansion of Hematopoietic Stem Cells with lymphohematopoietic differentiation potential. Abstract ESGCT 2015, Helsinki, Finland. P213. *Hum Gene Ther*, 2015. 26(10). A89.
- Aysun Sarikaya, **Gözde Aydin**, Özgür Özyüncü, Elvan Özbek, Duygu Uçkan-Çetinkaya, Fatima Aerts Kaya. Comparison of immuno-modulatory and differentiation capacities of Mesenchymal Stem Cells derived from bone marrow and placental tissue. Abstract UHEK 2016, İzmir, Turkey. Oral. *Cell & Tissue Biology Research* 2016(5): S20, p108-109.
- **Gözde Aydin**, Özgür Özyüncü, Duygu Uçkan-Çetinkaya, Fatima Aerts-Kaya. CD271+ bone marrow cells support in vitro expansion and lymphopoietic

differentiation of human CD34+ hematopoietic stem cells. Abstract ESGCT 2016, Florence, Italy. Human Gene Therapy (2016) 27:A72, P087. DOI: 10.1089/hum.2016.29035.abstracts.

- S Oncul, **G Aydın**, G Ucar, A Ercan. Investigation of p53 codon 72 polymorphism and cytotoxicity in Hepg2, Mcf-7 and Hek293 cell lines: sw01. w5–24. The Febs Journal 280 (1), 85-86.
- Akin HY, Yurdakul P, **Aydın G**, Dalva K, Beksac M. Ex vivo Expansion of Human Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells (HSCs) with Valproic Acid (VPA) or Neurotrophic Factor (NTF). ISCT 2017, 3-6 Mayıs 2017, Londra, İngiltere.
- Beksac M, Yurdakul P, Akin HY, Aydın G, Bunsuz Şengün M, Şahin U, Merter M, Dalva K. Multipl miyelomda kalıtsal immün kontrol noktalarına yönelik bir analiz: İnhibitör ve aktive edici tip Killer Immunoglobulin like Reseptörleri (KIR) ve ligandları HLA- Grup C1 ve C2 nin sıklığı. 43. Ulusal Hematoloji Kongresi, 1-4 Kasım 2017, Antalya, Türkiye sözlü sunum.
- Beksac M, Yurdakul P, Akin HY, **Aydın G**, Bunsuz Şengün M, Şahin U, Merter M, Dalva K. A Preliminary Analysis of Inherited Immune Checkpoint Control in Multiple Myeloma: Relative Frequency of Inhibitory or Activating Type Killer Immunoglobulin like Receptors and Their Cognate Ligands HLA-C1 and -C2. 59th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting & Exposition, 9-12 Aralık 2017, Atlanta, GA, ABD.
- Yurdakul P, Akin HY, **Aydın G**, Bunsuz-Sengun M, Turasan E, Dalva K, Beksac M. Impact of Mesenchymal Stromal Cells on in vitro growth of fresh human myeloma plasma cells and autologous/cord blood NK Cell mediated cytotoxicity. ISCT 2018, 2-5 Mayıs 2018, Montreal, Kanada.

Sunumlar:

- Hacettepe Üniversitesi, 2. Kök Hücre günü oral sunum: Hematopoetik Kök Hücre Ekspansiyonu, 19 Kasım 2014
- Uluslararası 1. Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Kongresi, Kocaeli, 20-23 Mart 2014, oral sunum: “Kemik iliğinden Prospektif Olarak İzole Edilen CD271+ ve

Plastik-Aderan Mezenkimal Kök Hücre Özelliklerinin Karşılaştırılması ve Hematopoez Destekleyici Özelliklerinin Araştırılması”

- Türk Hematoloji Derneği, 39. Ulusal Hematoloji Kongresi’ni ve 8. Balkan Hematoloji Günü, 23-26 Ekim 2013, oral sunum, “Kemik İliğinden Prospektif İzolasyon Yapılarak Elde Edilen CD271+ Mezenkimal Stromal Hücrelerin in vitro Hematopoezi Destekleyici Etkisi”, Deneysel Hematoloji Ödülü

Ödüller

- Fatima Aerts Kaya, **Gözde Aydın**, Selin Aytaç Eyüpoğlu, Duygu Uçkan. Kemik iliğinden prospektif izolasyon yapılarak elde edilen CD271+ Mezenkimal Stromal Hücrelerin *in vitro* hematopoezi destekleyici etkisi. 39. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya, Turkey. Presented Poster, TP-02, p76-77. Türk Hematoloji Kongresi Bildiri Ödülleri poster ödülü.
- Meral Beksaç, Pinar Yurdakul, H. Yalim Akin, **Gözde Aydın**, Merve Bunsuz Şengün, Uğur Şahin, Mustafa Merter, Klara Dalva. Multipl Miyelomda, Killer Immunoglobulin-Like Reseptörleri (Kir) ve Ligandları ile HLA-grup C1 ve C2’nin sıklığı. 43. Ulusal Türk Hematoloji Kongresi Bildiri Ödülleri poster ödülü.

Burslar

- EU-FP7, Proje no: HEALTH-2010-261387-CELL-PID, Proje Adı: “Advanced cell-based Therapies for the treatment of Primary ImmunoDeficiency”
- ERASMUS bursu, 2007.

Katılınan Program/Kurslar

- Deneysel Hayvanları Kullanım Kursu ve Sertifika programı, Kobay D.H.L. A.Ş., 2013, Ankara
- Pedagojik formasyon eğitim programı, Ankara Üniversitesi, 2011, Ankara
- Wall Street Institute, Mastery stage, İngilizce kursu, 2008, Ankara

Katılan Sempozyumlar/Kongreler

- 2008, XX. National Biochemistry Congress, Kapadokya/Turkey
- 2009, XXI. National Biochemistry Congress, Istanbul/Turkey
- 2011, 1st International Conference/Workshop On Stem Cell Research &Applications, Kayseri/ Turkey
- 2011, EU FP7 CELL-PID project annual meeting, Switzerland
- HÜKÖK 1. Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp günü, 2012, Ankara
- 2012, Test Animal Use in Scientific Research Program, Ankara/Turkey
- 2012, CELL-PID EU FP7 project annual meeting, Italy
- 2013, Regenerative Medicine Symposium, Çanakkale/Turkey
- 2013, The 2nd Helmsley Stem Cell Symposium, Weizmann Institute of Science, Israel
- 2014, 1st Congress on Stem Cell and Cell Therapies, Kocaeli/Turkey
- 2014, 17th annual congress, ESGCT, The Hague, Holland
- 2015, *EBMT 2015*, 41st Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, Istanbul/Turkey
- 2015, TÜBA-Kök Hücre Tedavilerine Güncel Yaklaşımlar Sempozyumu, Ankara
- 2015, *ISSCR 2015*, 13th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, Stockholm, İsveç
- 2016, TÜBA 3rd International Stem Cell Course: “Innovative Cell Therapies in Hematologic-Oncology”,Antalya
- 2016, Molecular Medicine Symposium, İstanbul/Turkey

Yurt içi ve Yurt dışı Stajlar

- MESA hastanesi, Biyokimya, Mikrobiyoloji, Patoloji, 2006 (staj)
- Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik anabilim dalı, 2007 (staj)
- Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya anabilim dalı, Biyokimya lab dersleri asistanlık, (2011-2013)
- Max Planck Institute- CRTD and BIOTECH, Dresden/Almanya, 2012 (staj)
- Weizmann Institute-Immunology department-Rehovot/Israel, 2013 (proje/staj)

- Ghent Üniversitesi, Belçika, 2007 (eğitim)

Projeler

- EU-FP7, Proje no: HEALTH-2010-261387-CELL-PID, Proje Adı: “Advanced cell-based Therapies for the treatment of Primary ImmunoDeficiency”
- 013D02102001 HÜ-BAP project 2013-2017 Plasenta, kordon kanı ve kemik iliğinden izole edilen CD271+ MKH’lerin immün özelliklerinin karakterizasyonu ve immünohematopoez-destekleyici özelliklerinin incelenmesi.
- TUBİTAK 3501, 115S579 kodlu “Killer Immunoglobulinlike Receptor Genotipinin Kordon Kanı Kaynaklı Doğal Öldürücü Hücrelerinin in Vitro Anti Miyelom Yanıtı Etkisi ve Otolog Anti Miyelom Etki ile Karşılaştırılması”

Yabancı diller:

- İngilizce: İleri düzeyde
- Almanca: Orta düzeyde
- Flemenkçe/Hollandaca/: Başlangıç düzeyde
- İbranice/İtalyanca: Başlangıç düzeyde

Labaratuvar deneyimleri:

Primer ve hücre hatları, dental pulpa hücre kültürü, Hematopoetik ve Mezenkimal Kök hücre kültürü, Moleküler biyoloji teknikleri (DNA, RNA izolasyonu, PCR, qRT-PCR, SDS-PAGE, Jel elektroforezi vb.), Western Blot, Hücre transdüksiyonu, Plazma ve NK hücre izolasyonu, ko-kültür çalışmaları, sitotoksosite deneyleri, ELISA, Sitokin array, Kemik iliğinden plazma hücre ve CD271+ kök hücre izolasyonu, MACS, FACS, fare çalışmaları (NSG ve NSGW41 transgenik immünyetmezlikli fare modelleri), kemik iliği ve kordon kanı nakli, immünohistokimya, Bradford, sitogenetik. Bilgisayar ve temel Microsoft ofis programları (Excel, Word, Power Point), temel istatistik hesaplamaları ve grafik çizimleri