



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI PASAJLARDAN ALINAN
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE ve FİBROBLAST
HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE IGF-I, IGFBP-3,
IGFBP-4 ve PAPP-A DÜZEYLERİNDEKİ
DEĞİŞİMİN ARAŞTIRILMASI**

BANU ÇETİNER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ve MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK
LİSANS PROGRAMI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Abdurrahman COŞKUN

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

Kurum : Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (x) Doktora ()

Anabilim Dalı : Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans Programı

Tez Sahibi : Banu ÇETİNER

Tez Başlığı : Farklı Pasajlardan Alınan Mezenkimal Kök Hücre ve Fibroblast Hücre Kültürlerinde IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-4 ve PAPP-A Düzeylerindeki Değişimin Araştırılması

Sınav Yeri : Acıbadem Üniversitesi, A Blok, 8. kat

Sınav Tarihi : 10.06.2015

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Jüri (Unvan, Adı, Soyadı)	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Abdurrahman COŞKUN (Danışman)	ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ	
Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ	ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ	
Doç. Dr. Fehime AKSUNGAR	ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun 18/6/2015 tarih ve 11 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mert ÜLGEN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

10.06.2015

Banu ÇETİNER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜRLER

Kök hücreler kendilerini yenileyebilme ve birçok hücre tiplerine farklılaşabilme özelliklerinden dolayı in-vitro çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda; serum-free kültürleri kullanılarak üretilen mezenkimal kök hücre ve fibroblast hücre kültürlerindeki büyüme ve gelişme sürecinde, IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-4 ve PAPP-A düzeylerindeki değişimi araştırmayı amaçladık. Elde edilecek anlamlı veriler doğrultusunda in-vitro ortamda bu analitlerin hücre farklılaşması üzerindeki etkisi hakkında bilgi sahibi olunabilir.

Çalışma sırasında örneklerin toplanmasındaki katkılarından dolayı Acıbadem Labcell Üretim Birimi Sorumlusu Hasan Aydın' a,

Örneklerin analiz edilmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen Acıbadem Labmed Araştırma Birimi Sorumlusu Murat Kolay' a,

Bu çalışmanın hayata geçmesini sağlayan ve bilgi birikimi ile bana yol gösteren değerli tez danışmanım Prof. Dr. Abdurrahman Coşkun' a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca katkıları olan tüm Tıbbi Biyokimya ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı hocalarıma ve bu çalışmanın istatistiksel hesaplamalar kısmındaki değerli desteklerinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Erdal Coşgun' a, çalışmanın yazım aşamasındaki değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Tanıl Kocagöz, Yrd. Doç. Dr. Cemaliye Akyerli Boylu' ya ve Yrd. Doç. Dr. Özge Can' a en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimim sırasında beni motive eden değerli arkadaşlarım ve eğitim hayatım boyunca bana her zaman destek olan aileme ve eşime sonsuz sevgilerimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ ONAYI	i
BEYAN	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜRLER	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	viii
TABLolar	ix
RESİMLER	x
GRAFİKLER	xi
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri Sistemi	6
2.1.1. Büyüme Hormonu Yapısı	6
2.1.1.1. Büyüme Hormonu Salınımı ve Biyolojik Etkisi	6
2.1.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF' ler)	7
2.1.2.1. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörlerinin Yapısı	7
2.1.2.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörleri (IGFR' ler)	8
2.1.2.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörlerinin Sentezi ve Biyolojik Etkileri	8
2.1.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri Bağlayıcı Proteinler (IGFBP' ler)	10
2.1.4. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri Bağlayıcı Protein Proteazları	11
2.2. Pregnancy–Associated Plasma Protein-A (PAPP-A)	13
2.2.1. PAPP-A Yapısının Belirlenmesi	13
2.2.2. PAPP-A' nın Yapısı ve İşlevi	13
2.2.3. PAPP-A' nın Sentez ve Salınımı	15
2.2.4. PAPP-A' nın Biyolojik Etkileri	16
2.2.5. PAPP-A' nın İn-vivo ve İn-vitro Düzenlenmesi	16
2.3. Kök Hücreler	17
2.3.1. Totipotent Kök Hücreler	18
2.3.2. Pluripotent Kök Hücreler	18
2.3.3. Multipotent Kök Hücreler	18
2.3.3.1 Embriyonik Kök Hücreler	18
2.3.3.2 Erişkin Kök Hücreler	19
2.3.3.2.A Hematopoetik Kök Hücreler	19
2.3.3.2.B Mezenkimal (Stromal) Kök Hücreler	19
2.3.3.2.C Fibroblast Hücreler	20
2.4. Kültür Ortamları	21
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	23
3.1. Doku Örneklerin Toplanması	23
3.2. Gereçler	23
3.2.1. Kimyasallar	23

3.2.2. Cihazlar	24
3.3. Yöntemler	24
3.3.1. Dokulardan Kök Hücrelerin Elde Edilmesi	24
3.3.2. Yağ ve Sinovial Dokudan Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi	24
3.3.3. Kemik İliğinden Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi	25
3.3.4. Deriden Fibroblast Hücrelerin Elde Edilmesi	26
3.3.5. Kök Hücrelerin Pasajlanmaları	28
3.3.6. Pasajlardan Örneklerin Alınması	28
3.4. Örneklerin Analiz Edilmesi	28
3.4.1. IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-4 Düzeylerinin ELISA Yöntemi ile Ölçümü	29
3.4.2. PAPP-A Düzeylerinin ELISA Yöntemi ile Ölçümü	32
3.4.3. IGFBP-3 Düzeylerinin Kemilüminesan Yöntemi ile Ölçümü	33
3.5. İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR	35
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	42
6. LİMİTASYONLAR	46
KAYNAKLAR	47

KISALTMALAR

GH: Büyüme hormonu

GHRH: Büyüme hormonu uyarıcı hormon

GHIH: Büyüme hormonu inhibe edici hormon

PAPP-A: Gebelikle-ilişkili plazma protein-A (Pregnancy-associated plasma protein A)

IGF-I, II: İnsülin-benzeri büyüme faktörü-I, II

IGFBP-(1,6): İnsülin-benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-(1,6)

MKH: Mezenkimal kök hücre

FH: Fibroblast Hücre

TGF- β : Transforming büyüme faktörü- β

TNF- α : Tümör nekroz faktör- α

IL 1- β : İnterlökin 1- β

IL 1- α : İnterlökin 1- α

IL-4: İnterlökin-4

IL-6: İnterlökin-6

IL-10: İnterlökin-10

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

VEGF: Vasküler endotel büyüme faktörü

ALS: Asit labil subunit

HGF: Hepatosit büyüme faktörü

PGE: Prostaglandin E

PDGF: Platelet-kaynaklı büyüme faktörü

M6F: Manno-6-fosfat

MMP: Matriksin metalloproteaz

proMBP: Eosinofil major temel protein

CCP: Komplement kontrol proteinleri

LNR: Lin12-Notch

PAPP-A2: Pappalisin-A2

STRO-1: Mezenkimal kök hücre belirteci-1

SH-2: Mezenkimal kök hücre belirteci-2

SH-3: Mezenkimal kök hücre belirteci-3

SH-4: Mezenkimal kök hücre belirteci-4

MEM: Minimal Gerekli Kültür Ortamı (Minimum Essential Medium)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Kültür Ortamı

RPMI-1640: Roswell Park Memorial Isnitute (RPMI)- 1640

DMEM/F-12: Dulbecco's Modified Eagle Kültür Ortamı/Nutrient Mixture F-12

FBS: Fetal sığır serum

BSA: Sığır serum albümin

PBS: Fosfat tamponlu serum fizyolojik

MNH: Mononükler hücre

SVF: Stromal vasküler fraksiyon

ELISA: Enzim-Bağlantılı Immunosorbent Analiz (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

TMB: Tetrametilbenzidin

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil-1. PAPP-A' nın yapısı	14
Şekil-2. PAPP-A' nın sentez ve salınımı	15
Şekil-3. IGF sinyalinin PAPP-A ilişkili kontrolü	16

TABLÖLAR

Sayfa No

Tablo-1. MKH ve FH kaynakları ve kültür içeriği	23
Tablo-2. Serum-free kültür ortamı için kullanılan destekleyici kültür içeriği	27
Tablo-3. PAPP-A, IGF-I ve IGFBP-4 düzeylerinin pasajlara göre genel tanımlayıcı bilgileri	35

RESİMLER

Sayfa No

Resim-1. ELISA yönteminde TMB solüsyonu konulduktan sonraki renk oluşumu	31
Resim-2. ELISA yönteminde stop solüsyonu konulduktan sonraki renk değişimi	31
Resim-3. ELISA yönteminde stop solüsyonu konulduktan sonraki renk değişimi	32

GRAFİKLER

Sayfa No

Grafik-1. PAPP-A yöntemi için kalibrasyon eğrisi	36
Grafik-2. IGF-I yöntemi için kalibrasyon eğrisi	36
Grafik-3. IGFBP-3 yöntemi için kalibrasyon eğrisi	37
Grafik-4. IGFBP-4 yöntemi için kalibrasyon eğrisi	37
Grafik-5. 1., 2. ve 3. pasajlardaki PAPP-A düzeyleri arasındaki fark	38
Grafik-6. 1., 2. ve 3. pasajlardaki IGFBP-4 düzeyleri arasındaki fark	39
Grafik-7. Farklı pasajlardaki PAPP-A ve IGFBP-4 düzeyleri arasındaki ilişki	40
Grafik-8. Farklı pasajlardaki PAPP-A, IGF-I ve IGFBP-4 düzeyleri	40

ÖZET

İnsülin-benzeri büyüme faktörleri (IGF' ler) hücre büyümesi ve farklılaşması için gerekli faktörlerdir. Gebelikle-ilişkili plazma protein-A (Pregnancy-associated plasma protein-A, PAPP-A), IGF-I bağlı İnsülin-benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-4' ü (IGFBP-4) proteolitik olarak parçalayarak, IGF-I' in aktivasyonunu sağlar. PAPP-A IGFBP-4' ten başka IGFBP-2 ve 5' e karşı afinite gösterirken, IGFBP-3 karşı afinitesi yoktur. İn-vitro ortamda osteosit, kondrosit, fibroblast gibi birçok hücre tipine dönüşebilen mezenkimal kök hücrelerden (MKH); IGF' ler, Transforming büyüme faktörü- β (TGF- β), Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), İnterlökin (IL)-10, IL-6 gibi birçok büyüme faktörü ve sitokin salgılanır. Bu nedenle IGF-I ile metabolizmasını düzenleyen faktörler, bu hücrelerden salınarak serumdan yoksun (serum-free) kültür ortamlarında gözlenebilirler. Bu kültürler hayvan kaynaklı serum bileşenleri içermezler. Ancak, hücrelerin büyüme ve gelişmesini destekleyici bileşenler eklenebilir. Çalışmamızda; PAPP-A, IGF-I, IGFBP-3 ve IGFBP-4' ün MKH ve fibroblast hücre (FH) kültür ortamlarındaki varlığını araştırmayı amaçladık. MKH ve FH kültürlerinde art arda yapılan 3 pasajdan alınan kültür örneklerinde ELISA ve kemilüminesan yöntemi kullanarak bu analitlerin düzeyleri ölçüldü. Bu bilgiler doğrultusunda kültür ortamlarında ölçülen IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-4 ve PAPP-A' nın MKH ve FH' lardan salındığını düşünülebiliriz. Analiz sonuçlarına göre; MKH ve FH kültürlerinde art arda yapılan pasajlarda PAPP-A ve IGFBP-4 düzeyleri anlamlı bir şekilde artarken, IGF-I düzeylerinde azalma gözlemlendi. Kültür ortamındaki IGF-I düzeylerinin azalması, IGFBP-4 düzeylerinin PAPP-A düzeylerine oranla daha fazla artmasıyla ilişkilendirilebilir. IGFBP-3 (ELISA, kemilüminesan) okuma aralığının dışında kaldığı için sayısal değer verilemedi. Bu çalışmadan elde edilen veriler, gelecekte yapılacak olan çalışmalarda in-vitro ortamda IGF-I, IGFBP-3 IGFBP-4 ve PAPP-A düzeylerinin hücre farklılaşması üzerindeki etkisinin incelenmesi açısından önemli olabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Sözcükler: IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-4, Mezenkimal kök hücreler, PAPP-A

SUMMARY

Insulin-like growth factors (IGFs) are necessary for cellular growth and differentiation. Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) induces the activation of IGF-I by proteolytic degradation of IGF-I dependent insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4). PAPP-A has also affinity to IGFBP-2 and IGFBP-5, but it does not have affinity against IGFBP-3. Mesenchymal stem cells (MSCs) which can differentiate to osteocytes, chondrocytes, fibroblasts and many different cell types, secrete IGFs, Transforming growth factor- β (TGF- β), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Vascular endothelial growth factor (VEGF), Interleukin-10 (IL-10), IL-6 like growth factors and cytokines in in-vitro conditions. Therefore, IGF-I and other factors that regulate the metabolism of IGF-I can be secreted from these cells and observed in serum free media. These media do not contain animal-derived serum components. However, supplementary components can be added to serum-free media to support the growth and development of cells. In our study, we aimed to investigate the presence of IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-4 and PAPP-A in culture media of MSC and fibroblast cells (FC). The concentration of these analytes which were obtained from three successive passages of MSC and FC culture media, were measured by ELISA and chemiluminescence. Along with this information, we can suppose that IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-4 and PAPP-A are secreted from MSCs and FCs. According to our results, PAPP-A and IGFBP-4 concentrations increased whereas IGF-I concentrations decreased in successive passages of MSCs and FCs culture media. Decreased concentrations of IGF-I in culture media may be associated with the increased levels of IGFBP-4 compared to PAPP-A levels. We could not determine the exact concentration of IGFBP-3 (with either ELISA or chemiluminescence) because it was outside the reading range. Our data indicated the importance of the effect of IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-4 and PAPP-A concentrations on cell differentiation which should be considered in future in-vitro studies.

Key Words: IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-4, Mesenchymal stem cells, PAPP-A

1. GİRİŞ ve AMAÇ

PAPP-A, ilk kez 1974 yılında Lin ve arkadaşları tarafından gebe kadınların plazmalarında bulunan 4 proteinden biri olarak izole edilmiştir (1). 1990' lı yıllarda PAPP-A, gebelerde Down Sendromu taramasında bir belirteç olarak kullanılmaya başlamıştır (2, 3). O yıllarda pek çok laboratuvar çeşitli hücre kültürlerinde IGFBP-4' e karşı proteaz aktivitesi olan bir protein bildirmişler (4-6). 1999' da Lawrence ve arkadaşları insan fibroblast kültür ortamından IGF-I bağımlı IGFBP-4 proteazı izole ederek yapısını incelemişler ve bu proteinin PAPP-A olduğunu bildirmişler (4). Yapılan çok sayıda farklı çalışmalarda PAPP-A'nın sadece gebelik ile ilişkili olmadığı kemik, böbrek, testis, kolon ve diğer yetişkin ve fetal dokular gibi birçok dokuda da sentezlendiği bildirilmiştir (7-9).

IGF sistemi; büyüme hormonu (GH), IGF-I ve IGF-II, IGFBP' ler (6 farklı bağlayıcı protein), hedef hücrelerdeki IGF (I-II) reseptörlerinden ve IGFBP proteazlarından (metalloproteazlar, kathepsinler ve serin proteazları) oluşmaktadır (10, 11). PAPP-A bir metalloproteaz olup, IGFBP-4, IGFBP-2 ve IGFBP-5' e karşı proteolitik aktivite göstermektedir. Ancak, IGFBP-3' e karşı afinitesi yoktur (12).

Osteoblast kültürlerinde yapılan çalışmalarda PAPP-A salınımının TGF- β , TNF- α , IL1- β ve IL-4 gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından uyarıldığı belirlenmiştir (13, 14). Bu salınımın uyarılmasında fizyolojik etkenlerin yanında oksidatif stres, inflamatuvar hadiseler gibi patolojik etkenler rol oynamakla birlikte pasaj sayısının artması gibi faktörler de etkilidir (10, 15).

IGFBP' ler karaciğer, plasenta, böbrek, fibroblastlar gibi birçok hücre tarafından sentezlenirler (16). IGFBP' lerin sentez ve salınımında IGF-I ile GH önemli rol oynar (17). Bunun yanı sıra TNF- α , IL 1- α ve IL 1- β ' nin da IGFBP-3 ve 4' ün sentezi ve salınımı üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (16, 18).

IGFBP-4, IGF-I' e güçlü bir affinite ile bağlanır ve IGF-I' in hücre yüzeyindeki reseptörü ile etkileşmesini engeller. PAPP-A, IGFBP-4' ü proteolitik olarak

parçalayarak IGF-I' e olan afinitesini azaltır (10). Böylece serbestleşen IGF-I hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterir. IGF-I' in en önemli etkisi hücre büyümesi ve farklılaşma üzerinedir (3, 10). IGF' in sentezlenmesinde GH önemli rol oynar. Buna karşın insan adipoz doku kültürlerinde yapılan bir çalışmada TNF- α ve IL 1- β ' nın IGF-I' in sentezini inhibe ettiği de gözlenmiştir (18).

Mezenkimal kök hücreler dokulardan kolay izole edilmesi ve in-vitro ortamda hızlı üreyip birçok hücre tipine farklılaşma özelliklerinden dolayı kök hücre çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (19). MKH' lar kültür ortamında osteoblastlar, kondrositler, adipositler, miyositler, fibroblastlar ve stromal hücreler gibi birçok hücre tiplerine farklılaşabilirler (20). Bu farklılaşma sırasında MKH' lardan birçok büyüme faktörü ve sitokin salgılanmaktadır (19, 21). Bunlar; IGF' ler, TGF- β , TNF- α VEGF, HGF, PGE, IL-10, IL-6 vb. gibi faktörler ve sitokinlerdir (19-21).

Kök hücre çalışmalarında kullanılan birçok farklı kültür tipi vardır. Bu kültür tipleri kültürün içeriğine, hücre tipine ve amacına göre değişkenlik gösterebilir (21). Bu çalışmada, içine destekleyici kültür olarak inorganik tuzlar, aminoasitler, vitaminler, hormonlar, yağ asitleri, büyüme faktörleri (FGF, PDGF), proteinler vb. gibi hücrelerin büyüme ve gelişmesini destekleyecek bileşenler konulmuş olan serum-free kültürleri kullanıldı. Serum-free kültürleri içeriğinde hayvansal serum bileşenleri bulunmamaktadır, ancak çalışmanın türüne göre kültür ortamına bazı bileşenler eklenebilir (21). Bu nedenle içeriğine herhangi bir bileşen eklenmemiş olan serum-free kültürlerinden izole edilen faktörlerin, kültür ortamlarında var olan hücreler tarafından salınacağı düşünülmektedir. Çalışmamızda; serum-free kültürleri kullanılarak üretilen MKH ve FH' ların farklılaşma sürecinde, kültür ortamında IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-4 ve PAPP-A düzeylerindeki değişimi araştırmayı amaçladık.

Bu çalışmada farklı pasajlardan alınan MKH ve FH kültür örneklerindeki IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-4 ve PAPP-A düzeylerindeki değişimin araştırılması in-vitro ortamda bu analitlerin hücre farklılaşması üzerindeki etkisinin anlaşılması ve kök

hücre çalışmalarında kullanılacak yeni kültür ortamlarının üretilmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri Sistemi

IGF sistemi; büyüme hormonu (GH), IGF' ler (I-II), IGF reseptörleri (IGFR-I, IGFR-II, insülin reseptörü), IGFBP' ler ve IGFBP proteazlarının bulunduğu bir sistemdir (22).

2.1.1. Büyüme Hormonunun Yapısı

Büyüme hormonu, hipofiz bezinin anterior lobunun somatotrop hücrelerinden sentezlenir. GH, prolaktin ve plasental korionik somatomammotropin ile yapısal benzerlik gösterir. GH' ın tek zincirli polipeptit yapısı 191 aminoasitten oluşur ve 22 kDa ağırlığındadır. Yapısında 53. ile 165. ve 182. ile 189. aminoasitler arasında olmak üzere iki adet disülfid bağı yer almaktadır GH' ın yarılanma süresi 20-50 dakika arasında değişir (23).

2.1.1.1 Büyüme Hormonunun Salınımı ve Biyolojik Etkisi

GH salınımı pulstatildir. GH' ın sentezi ve salınımı hipotalamik nöropeptitler tarafından kontrol edilir (24, 25). GH' ın sentezlenmesinde ve salgılanmasında birçok hormon, nörotransmitter (serotonin, dopamin, GABA vb.) ve metabolik faktörler rol oynamaktadır (26). Bunlardan en önemlileri; hipotalamustan salınan GH salgılatıcı hormon (GHRH), Somatostatin (GH inhibe edici hormon veya GHIH,) ve mideden salınan Ghrelin'dir (23, 26). Bu faktörlerden birinin eksikliği ya da fazlalığı hipofizden GH salınımını etkilemektedir. GHRH, ghrelin, östrojen, testosteron, GH salınımını artırırken, somatostatin, glikoz, kortizol, serbest yağ asitleri, GH salınımını azaltır (24, 27).

Bunların yanı sıra GH salınımı üzerinde etkili olan bir diğer faktör IGF-I' dir. IGF-I' in başlıca sentez yeri karaciğerdir. GH karaciğeri uyarak IGF-I' in sentez ve salınımını uyarır. IGF-I' de otokrin ve parakrin etkisiyle büyüme ve farklılaşmada rol

oynar. Serumda IGF-I' in artması hipofiz bezi üzerinde negatif geri bildirim yapar ve sonuçta GH' in sentez ve salınımını baskılanmış olur (24, 27).

GH' in esas etkisi büyüme ve gelişme üzerine olup, bu etkisini birçok doku ve organ üzerinde gösterir. Ayrıca protein, lipit ve karbonhidrat metabolizmalarında da rol oynar (25). GH büyüme ve gelişme üzerindeki etkisini IGF-I ile birlikte gösterir (24).

2.1.2. İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF' ler)

Büyüme hormonuna bağlı olarak izole edilen büyüme faktörü, ilk kez 1957 yılında Salmon ve Daughaday tarafından kırkırdakta sülfat bileşimini arttırmasından dolayı sülfasyon faktörü olarak tanımlandı (28). 1970' li yılların başlarında bu büyüme faktörleri, insüline benzer yapısal özellik göstermeleri nedeniyle “insülin benzeri büyüme faktörü” olarak isimlendirildi (28, 29). Daha sonraları yapılan çalışmalarda IGF' in iki farklı peptit yapısının olduğu belirlendi. Bu yapılar IGF-I ve IGF-II olarak adlandırıldı (30-32).

2.1.2.1. İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörlerin Yapısı

IGF' ler hemen hemen tüm organların fonksiyonlarında etkili hücre büyümesi ve farklılaşması için gerekli, önemli metabolik ve mitojenik faktörlerdir (33). IGF' ler tek zincirli polipeptitlerdir. IGF-I 7,6 kDa ağırlığında olup yapısında 70 aminoasit bulunur. IGF-II ise 7,4 kDa ağırlığında olup, yapısında 67 aminoasit vardır (22, 30, 34).

IGF' ler yapı olarak insülinde daha çok proinsülinle benzerlik gösterirler. Her iki IGF molekülünde proinsüline benzer olarak A, B ve C zincirleri bulunurken IGF' ler de ayrıca bir D zinciri vardır (22). IGF-I ile proinsülin arasında yapılarındaki aminoasit dizilimi açısından %43 oranında yapı benzerliği bulunurken, IGF-II ile proinsülin arasında %41 oranında yapı benzerliği bulunmaktadır. Bunların yanı sıra

IGF-I ve IGF-II arasında %62 oranında yapı benzerliği bulunur (30, 35). Bu yapısal benzerlik nedeniyle insülin reseptörleri de IGF' lere duyarlıdır (30, 36).

2.1.2.2. İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörlerinin Reseptörleri (IGFR' ler)

IGF' ler etkilerini hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Her IGF molekülünün güçlü bir afinite ile bağlandığı bir reseptörü vardır. Bunlar IGF-I reseptörü ve IGF-II reseptörü diye tanımlanır. IGF' ler kendi reseptörleri haricinde birbirlerinin reseptörlerine de düşüğe olsa bir afinite gösterirler. Bunların yanı sıra IGF-I hücre membranlarındaki insülin reseptörlerine düşük bir affinite ile bağlanabilir. Bu afinite IGF-I reseptörü ile insülin reseptörü arasında yapısal olarak bir benzerlik olmasından kaynaklanır (37).

IGF-I ve insülin reseptörleri; tirozin kinaz ailesinin üyeleri olup, heterotetramer yapıdaki glikozillenmiş 2 α , 2 β alt ünitelerinin aminoasit dizilimleri benzerlik gösterir. Yapıdaki α ve β alt üniteler birbirlerine disülfid bağları ile bağlanmıştır. IGF-I, reseptörün α alt ünitesine bağlanması ile β alt ünitesinde otofosforilasyon meydana gelir ve tirozin kinaz aktivitesi başlatılmış olur (22, 38, 39).

IGF-II reseptörü (300 kDa) ise tek zincirli polipeptit yapısında olup ekstraselüler zinciri takiben kısa bir intraselüler zincirle sonlanan bir transmembran proteindir. Bunun yanı sıra IGF-II reseptörü, yapısal olarak mannoz 6-fosfat (M6P) reseptörüyle benzer olduğundan IGF-II, M6P reseptörüne karşı da güçlü bir afinite gösterir (39, 40).

2.1.2.3 İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörlerinin Sentezi ve Biyolojik Etkileri

IGF' ler primer olarak karaciğerde sentezlenmesinin yanı sıra böbrek, ovaryum, testis, plasenta, pankreas, deri vb. gibi periferal doku ve organlarda da sentezlenirler (24).

Büyüme ve gelişmede önemli rol oynayan IGF' ler yağ, karbonhidrat ve protein metabolizmasında da görev alırlar. IGF' lerin bu metabolizmalar üzerindeki etkileri insüline benzemektedir (30, 39).

IGF' ler fetal dönemden başlayıp hayatın sonuna kadar sentezlenirler. Sentezi yaşa göre değişkenlik gösterir. Büyüme çağında artarken yaşlılıkta azalır. IGF-II daha çok fetal dönemde bulunur ve doğumla birlikte azalır (22, 30). IGF-I ise fetal dönemde az seviyede bulunurken doğumdan sonra giderek artış gösterir (22). IGF' lerin sentez ve salgılanmasında GH, oksidatif stres, uyku, inflamatuvar olaylar gibi önemli faktörlerde rol oynamaktadır (31).

IGF-I' in sentezlenmesindeki en önemli faktör GH olmasının yanı sıra beslenme durumu ve insülin de önemli rol oynar. GH, IGF-I' in sentezlenmesi ve salgılanması için karaciğeri ve diğer periferik dokuları uyarır. Bunun yanı sıra dolaşımdaki IGF-I çok az miktarda karaciğerden direkt hormon olarak salgılanmaktadır (22). Ayrıca TNF- α ve IL 1- β gibi proinflamatuvar sitokinler de IGF-I' in sentezlenmesinde etkilidir (18). İnsan adipoz doku kültürlerinde yapılan bir çalışmada bu sitokillerin IGF-I' in sentezini inhibe ettiği gözlenmiştir (18).

IGF-I kas ve kemiklerde miyoblastik ve osteoblastik dokuların farklılaşmasında da rol oynamaktadır (41, 42). Bunların yanı sıra IGF-I; migrasyon (43), apoptozis (44), hücre döngüsünün düzenlenmesi ve mitogenezis (45) gibi birçok mekanizmada da rol oynamaktadır.

IGF' ler plazmada bağlayıcı proteinlerine bağlanarak dolaşırlar. Bunlar IGFBP' ler olup, IGF' lerin %99' unu kendilerine bağlarlar. IGF' lerin %1' lik kısmı ise plazmada serbest halde dolaşır (46).

2.1.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Proteinler (IGFBP' ler)

IGF' ler dolaşımında bazı özgül proteinlere bağlanarak taşınırlar. Bu proteinler IGFBP' ler olup, yapısında 216 ile 289 arası aminoasit içeren ve 6 farklı bağlayıcı proteinden oluşan bir ailedir. IGFBP' ler yapı olarak birbirine çok benzeyen C-terminal, N-terminal ve bu ikisi arasında kalan merkezi bölge olmak üzere 3 domainden oluşurlar. IGF' ler bu domainlere bağlanırlar. Her IGF' in bağlanabildiği bir domaini veya domainleri vardır (47, 48).

IGFBP' ler dolaşımında ikili ya da üçlü kompleksler halinde bulunurlar. İkili kompleks IGF' lerin IGFBP' lere bağlanmasıyla, üçlü kompleks ise IGF-I' in IGFBP-3 ve asit labil subunitlere (ALS) bağlanmasıyla oluşur. Serumdaki IGF-I' lerin % 95' i üçlü kompleks halinde bulunurken %5' ten az bir kısmı diğer IGFBP' lere bağlı halde bulunur. IGF-I' lerin çok az bir kısmı dolaşımında serbest halde bulunur (47, 49).

IGFBP' ler IGF' lerle kompleks oluşturduğu zaman dolaşımdaki yarılanma süreleri uzar. Normalde IGFBP' lerin yarılanma süresi 30-90 dakika iken IGF' lerin 10 dakikadır. IGFBP-3' ün IGF-I ve ALS ile yaptığı üçlü kompleksin yarılanma süresi ise yaklaşık 12 saattir (49-51).

IGFBP' ler genel olarak karaciğer, böbrek, plasenta fibroblastlar gibi birçok hücre tarafından sentezlenirler (16). IGFBP' lerin salınımının düzenlenmesinde IGF-I ve GH önemli rol oynamaktadır. GH ve IGF-I' den başka TNF- α , IL 1- α ve IL 1- β gibi sitokinlerde IGFBP' lerin salınımında rol oynamaktadır. İnsan fibroblast kültürlerinde yapılan çalışmada TNF- α ve IL 1- β ' nin, IGFBP-3 ve IGFBP-4' sentezini azalttığı belirlenmiştir (16). Kondrosit kültürlerinde yapılan başka bir çalışmada ise TNF- α ve IL 1- α ' nin IGFBP-3 sentezini arttırırken, IGFBP-4 sentezini etkilemediği gözlemlenmiştir (52).

IGFBP-3' ün serumda glikozile olan (40-44 kDa) ve olmayan (29 kDa) 2 formu bulunur. IGFBP-3 serum düzeyleri yaşa bağlı olarak değişir. Doğumla birlikte düşük

olarak başlayan IGFBP-3 serum düzeyleri, çocukluk dönemi boyunca artar. IGFBP-3 dolaşımında en çok bulunan IGFBP' dir. IGFBP-3' ün ALS ile birlikte başlıca sentez yeri karaciğerdir. IGFBP-3 hepatik endotel ve Kupffer hücreleri tarafından üretilir (49).

IGFBP-4' ler de serumda glikozile olan (28 kDa) ve olmayan (24 kDa) formları bulunur. IGFBP-4' lerin tüm biyolojik sıvılarda bulunduğu belirlenmiştir. IGFBP-4' ler fibroblastlar, nöroblastoma, prostat ve kemik hücreleri tarafından üretilmektedir. IGFBP-4 serum düzeyleri fizyolojik değişikliklerin yanı sıra yaşa bağlı olarak da değişkenlik göstermektedir (49).

IGFBP' ler IGF' leri kendilerine bağlayıp, etkilerini göstermelerini engellerler. IGF' lerin biyolojik etkilerini gösterebilmeleri için, IGFBP' lerin kendilerine özgül proteazlar tarafından parçalanıp IGF' leri serbest bırakmaları gerekmektedir. Serbest kalan IGF' ler hücre yüzeylerindeki reseptörlerine bağlanarak biyolojik etkilerini gösterirler (49).

2.1.4. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein Proteazları

IGFBP proteazları ilk kez hamile kadınlarda, serumda en çok bulunması ile bilinen IGFBP-3' e karşı proteolitik aktivite göstermesi ile tanımlanmıştır (49).

IGF' lerin etkilerini gösterebilmeleri için IGFBP' lerin parçalanmaları gerekmektedir. Fragmentlere ayrılmış IGFBP' lerin IGF' lere ilgisi azalır, böylelikle IGF' ler etkilerini göstermek üzere reseptörlerine bağlanırlar. En çok bilinen IGFBP proteazları; serin proteazları (kallikrein benzeri proteazlar), kathepsinler, metalloproteinazlardır (11).

Serin proteazları, seminal plazmada bulunan ilk IGFBP proteazları olup, kallikrein proteazları olarak da bilinirler. Bu proteazlar; IGFBP-3, 4, 5 ve 6' ya karşı proteolitik aktivite gösterirler (49). İn-vitro ortamda yapılan bir çalışmada düz kas

hücrelerden salınan kalsiyum bağımlı serin proteazların IGFBP-4' e karşı proteolitik aktivite gösterdiği belirtilmiştir (12).

Kathepsinler, lizozomal proteinazlar olup birçok normal ve malign dokularda bulunurlar. Bu proteazlar pH 4-5.5 arası aktiftir. Kathepsinler IGFBP' leri (1-5) proteolitik olarak parçalayan proteazlardır (49).

Metalloproteazların katalitik aktiviteleri için bir metal ( inko) iyonu gereklidir. IGFBP' lerin proteolitik parçalanmasında görevli olan matriksin (MMP), adamalisin ve pappalisin (PAPP-A) olmak üzere 3 farklı metalloproteaz vardır (49). Yapılan in-vitro çalışmada PAPP-A' nın fibroblast ve vasküler düz kas hücrelerinde IGFBP-4' e karşı proteolitik aktivitesi olduğu gösterilmiştir (12). PAPP-A' nın IGFBP-4 yanı sıra IGFBP-5 ve IGFBP-2' ye karşı da afinitesi vardır (10).

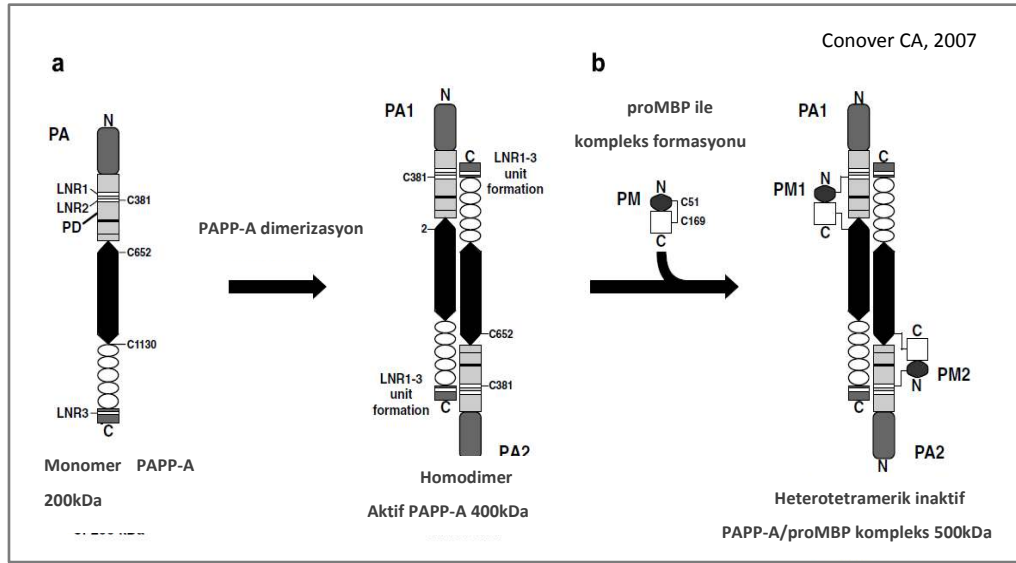
2.2. Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-A)

2.2.1 PAPP-A Yapısının Belirlenmesi

PAPP-A ilk kez 1974 yılında Lin ve arkadaşları tarafından gebe kadınların plazmalarında yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur (1). O yıllarda plasenta kaynaklı olduğu düşünülen PAPP-A gebe kadınların plazmalarında bulunan 4 proteinden biri olarak izole edilmiştir (1). 1990'lı yıllara kadar PAPP-A'nın biyolojik işlevi bilinmemesine rağmen, o yıllarda gebelerde Down Sendromu taramasında bir belirteç olarak kullanılmaya başlanmıştır (2, 3) 1990'lı yıllarda pek çok laboratuvar çeşitli hücre kültürlerinde IGFBP-4'e karşı proteaz aktivitesi olan bir protein bildirmişler. 1999' da Lawrence ve arkadaşları insan fibroblast kültür ortamından IGF I' e bağımlı IGFBP-4 proteazı izole ederek yapısını inceleyerek ve bu yapının PAPP-A olduğunu bildirmişler (4-6). PAPP-A' nın proteolitik aktivitesi için IGFBP-4' e bağlı IGF-I veya IGF-II' ye ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir (3, 53).

2.2.2 PAPP-A' nın Yapısı ve İşlevi

PAPP-A bir metalloproteaz olup metzincin alt ailesine ait bir enzimdir (54) Monomer PAPP-A 200 kDa' dur (4). PAPP-A'nın iki formu (proteolitik olarak aktif olan ve olmayan) bulunmaktadır (55, 56). Proteolitik olarak aktif olan PAPP-A homodimer şeklinde olup 400 kDa' dır (55). Proteolitik olarak aktif olmayan PAPP-A ise ProMBP (eosinophil major basic protein) ile heterotetramerik kompleks oluşturur. Bu kompleks 500 kDa olup, sadece gebe kadınların plazmalarında bulunur (10, 56).



Şekil 1. PAPP-A' nın yapısı. a. Monomer, homodimer yapısı, b. PAPP-A/proMBP heterotetramerik kompleks (3).

Monomer PAPP-A 1546 aminoasitten oluşan bir polipeptiddir. 5 major domaininden oluşur. Bunlar sırasıyla; N-terminal domain, proteolitik domain, merkezi domain, komplemant kontrol proteinleri (CCP) içeren (5 modül) domain ve kısa bir C-terminal domaininden oluşur (3).

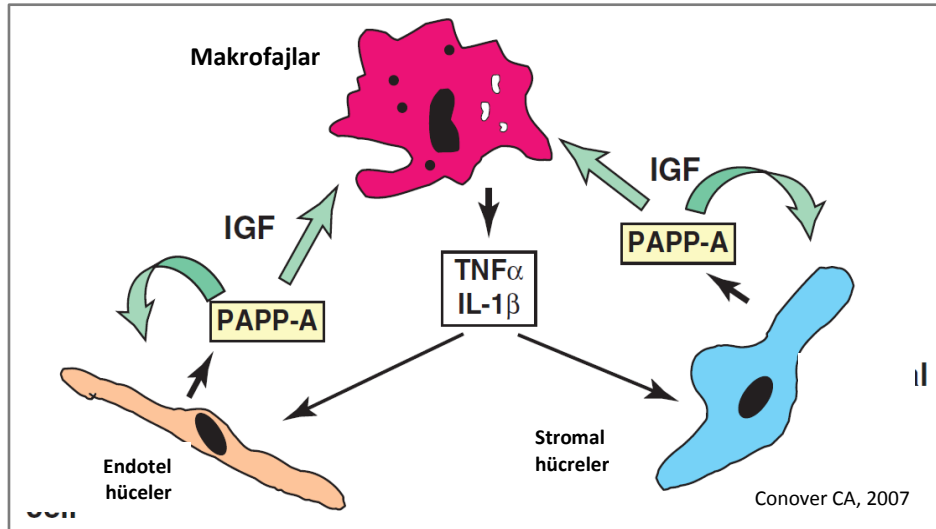
N-terminal domain ilk 243 aminoasiti içerir ve yapı olarak laminin G benzeridir. Proteolitik domain ise yaklaşık 350 aminoasitten oluşur ve PAPP-A' nın IGFBP' lere karşı proteolitik aktivite gösterdiği domaindir. Ayrıca bu domainin yapısında çinko bağlayıcı sekans bulunur. Bu sebeple metzincin ailesindendir. Merkezi domain ise yaklaşık 500 aminoasitten oluşur, fakat yapısı henüz belirlenmemiştir. CCP domaininde her bir CCP yaklaşık 60 aminoasit içerir ve CCP-3, 4 modülleri PAPP-A' nın hücre yüzeyine bağlanmasında görevlidirler. PAPP-A, hücre yüzeyindeki heparan sülfat proteoglikana, yapısındaki CCP-3, 4 modüllerinden bağlanır. Son olarak PAPP-A' nın yapısında yaklaşık 70 aminoasitten oluşan kısa bir C-terminal domaini bulunur. Bunların yanı sıra PAPP-A' nın yapısında Lin12-Notch (LNR) diye adlandırılan 3 farklı modül bulunur. LNR-1 ve LNR-2 proteolitik domainde yer alırken, LNR-3 C-terminal domainde bulunur (3, 10).

Metzincin ailesinde PAPP-A' dan başka PAPP-A2 (pappalisin2) proteini de bulunur. Bu protein PAPP-A ile homolog olup, aralarında %46 oranında sekans benzerlikleri vardır. PAPP-A2, PAPP-A gibi IGFBP-5' e karşı proteolitik aktivite gösterirken, PAPP-A' dan farklı olarak IGFBP-4' e karşı inaktiftir. PAPP-A2' nin fizyolojik rolü tam olarak açıklanamasa da, hamilelikte ve vücut büyüklüğünün düzenlenmesinde rolü olduğu belirtilmiştir (10).

2.2.3 PAPP-A' nın Sentez ve Salınımı

PAPP-A başlıca gebelik sırasında plasental sinsitiotrofoblastlarda sentezlenmesinin yanı sıra, gebelik dışında fibroblastlarda, osteoblastlarda, vasküler düz kas hücrelerinde, ovaryumda ve diğer yetişkin ve fetal dokular gibi birçok dokuda sentezlenirler (3, 10).

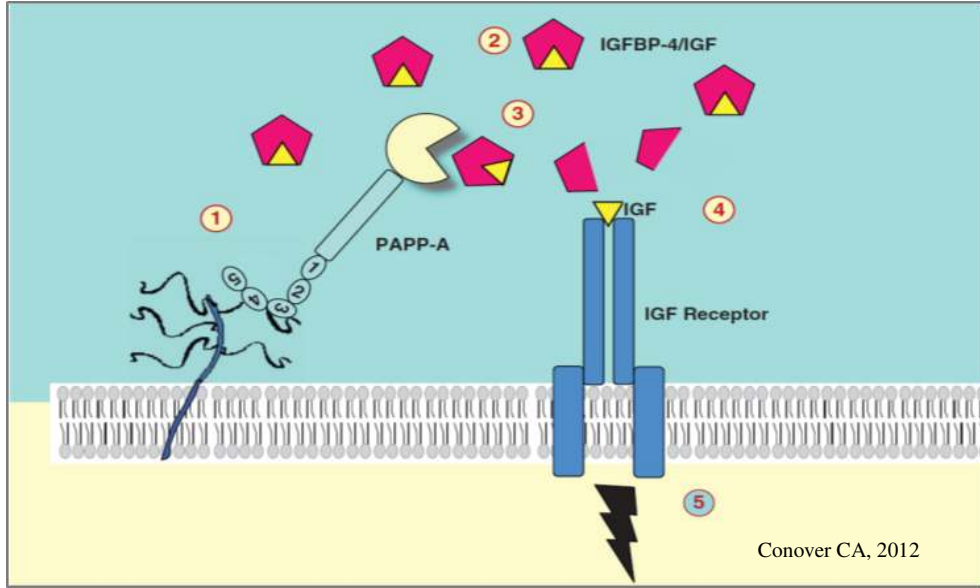
Makrofajların kendileri PAPP-A salgılamazlar. Doku hasarı, oksidatif stresin artması, inflamatuvar hadiseler gibi çok sayıda patolojik durumlar makrofajlardan TGF- β , TNF- α , IL 1- β ve IL-4 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına neden olur. Makrofajlardan salınan bu sitokinler çevre dokulardan ve hücrelerden (endotel hücreler, stromal hücreler, osteoblastlar vb.) PAPP-A salınımını uyarırlar (10, 14).



Şekil 2. PAPP-A' nın sentez ve salınımı (3). PAPP-A' nın sentez ve salınımında makrofajlardan salınan proinflamatuvar sitokinler önemli rol oynar.

2.2.4 PAPP-A' nın Biyolojik Etkileri

PAPP-A' nın esas etkisi IGFBP' ler üzerinedir. PAPP-A, IGFBP-4' ü proteolitik olarak parçalayarak IGF-I' e olan afinitesini azaltır. Böylece serbestleşen IGF' ler hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterir (3, 10)



Şekil 3. IGF sinyalinin PAPP-A ilişkili kontrolü. 1. PAPP-A, yapısındaki CCP-3,4 ile hücre yüzeyindeki heparan sülfat proteoglikana bağlanır. 2. IGFBP-4 ve IGF kompleksi. 3. PAPP-A, IGF bağlı IGFBP-4' ü proteolitik olarak parçalar. 4. IGF' ler hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanır. 5. IGF' ler büyüme, farklılaşma, mitogenesis vb. gibi yaşamsal mekanizmalarda rol oynar (10).

PAPP-A' nın IGFBP-4' den başka IGFBP-2 ve IGFBP-5'i de proteolitik olarak parçaladığı belirlenmiştir. Fakat IGFBP-3' karşı afinitesi yoktur. PAPP-A'nın IGFBP' lerden başka bir substratla etkileşime girip girmediği hala bilinmemektedir (10).

2.2.5 PAPP-A' nın İn-vivo ve İn-vitro Düzenlenmesi

Yapılan in-vivo çalışmalarda, PAPP-A ekspresyonunun artışı ilk kez koroner arterlerde belirlendi (3, 57). Bunun yanı sıra PAPP-A ekspresyonunun vasküler hasarda (58), yara iyileşmesinde (59), doku ve kemik remodellenmesinde,

folikülogenezisde, plasental gelişimde (60) ve aterosiklerotik plak oluşumu gibi patolojik durumlarda da arttığı gösterilmiştir (61).

İn-vitro osteoblast kültürlerinde yapılan çalışmalarda oksidatif stres ve doku hasarına karşı makrofajlardan salınan TNF- α ve IL 1- β gibi proinflamatuvar sitokinlerin PAPP-A ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (3). TNF- α ve IL 1- β ' nın PAPP-A ekspresyonunu arttırdığı görülse de, TGF- β ' nın PAPP-A ekspresyonunu arttırmada çok daha önemli rolü olduğu belirtilmiştir (13, 14).

İnsan MKH kültürlerinde yapılan çalışmalarda kök hücrelerden birçok büyüme faktörü ve sitokinlerin salındığı belirlenmiştir (21). Bu büyüme faktörleri ve sitokinlerden bazıları; IGF' ler TGF- β , TNF- α , VEGF, HGF, PGE, IL-10, IL-6 vb. gibidir. MKH' lerden salınan TGF- β ve TNF- α , PAPP-A ekspresyonun uyarılmasında güçlü bir faktördür (13). Bu nedenle MKH kültürlerinde yapılan çalışmalarda, kültür ortamlarında PAPP-A ve IGF-I' in varlığından söz edilebilir. Ayrıca IGF-I, TNF- α , IL 1- α ve IL 1- β ' nın IGFBP-3 ve 4 salınımı üzerinde etkili olmasından dolayı bu bağlayıcı proteinlerinde kültür ortamlarında bulunduğu düşünülebilir (16).

2.3. Kök Hücreler

Kök hücreler kendilerini yenileyebilme özelliğinde olup vücut ve laboratuvar ortamlarında, uygun şartlar sağlandıklarında birçok özelleşmiş hücre tipine dönüşebilen farklılaşmamış hücrelerdir (62).

Hücrelerin bölünme kapasitelerini kromozomların uç kısımlarında bulunan ve tekrarlanan “TTAGGG” dizilerinden oluşan “telomer” adı verilen DNA zincirleri belirler. Hücreler bölündükçe zamanla telomerler kısalır. Telomerlerin korunması telomeraz enzimi sayesinde olur. Bir hücrede telomeraz enzimi ne kadar aktif ise telomer uzunluğu o kadar korunabilir. Kök hücrelerde telomeraz aktivitesi fazladır, bu nedenle hücreler uzun süre bölünebilirler (63).

Kök hücrelere farklılaşma tiplerine göre temel olarak 3 grup altında toplanırlar. Bunlar; totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücrelerdir (64).

2.3.1 Totipotent Kök Hücreler: Tek bir hücreden tam bir organizmayı oluşturabilecek olan kök hücrelerdir. Bu kök hücreler zigot oluşumundan sonra ilk 4 gün içinde (erken embriyonik evre/morula) kültüre alınması gerekmektedir (65).

2.3.2 Pluripotent Kök Hücreler: Zigot oluşumunun 5. gününden itibaren blastositin iç tabakasından (inner membran cell) alınan kök hücreler pluripotent kök hücreler olarak adlandırılırlar. Pluripotent kök hücreler 3 somatik germ tabakasını (ektoderm, mesoderm, endoderm) oluşturabilme yeteneğindedir. Hemen hemen bütün dokuları oluşturabilmelerine rağmen bu kök hücreler totipotent kök hücrelerin aksine tam bir organizmayı oluşturamazlar (62, 66).

2.3.3 Multipotent Kök Hücreler: Pluripotent kök hücreler biraz daha özelleşmiş olan multipotent kök hücrelere dönüşürler. Bu kök hücreler daha sınırlı sayıda hücre tipine farklılaşabilen hücrelerdir (62).

Kök hücreler elde edildiği kaynağa göre de farklılık gösterirler. Elde edilen kaynaklarına göre kök hücreler temel olarak; embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler olarak 2 gruba ayrılmaktadır (62).

2.3.3.1 Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücrelerle ilgili ilk çalışma Evans ve Kaufman tarafından 1981 yılında yapılmıştır. Evans ve Kaufman fare blastositlerin iç hücre tabakasından (inner membran cell) kök hücreleri elde ettiler (67).

Embriyonik kök hücreler pluripotent hücreler olup, organizmadaki 3 farklı embriyonik tabakaları (ektoderm, mesoderm, endoderm) oluşturabilme yeteneğindedirler. Bu kök hücreler embriyonun erken gelişim evresinde oluşan blastositin iç hücre tabakasından (inner membran cell) toplanır ve özel besiyeri ortamında kültüre alınıp, çoğaltılarak elde edilirler (68-70).

2.3.3.2 Erişkin (Adult) Kök Hücreler

Erişkin kök hücreler, embriyonik kök hücrelere göre gelişmenin daha ileriki safhalarında elde edilirler. Erişkin kök hücreler genellikle multipotent kök hücreler olup, kendi kendini yenilemenin yanı sıra daha çok elde edildikleri doku hücrelerine dönüşme potansiyelindedirler (70, 71).

Erişkin kök hücreler başta kemik, kan ve yağ doku olmak üzere beyin, bağırsak, sinir sistemi, deri, karaciğer gibi doku ve organlardan da elde edilirler. Hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal (stromal) kök hücreler en yaygın kullanılan erişkin kök hücrelerdir (72).

2.3.3.2.A Hematopoetik Kök Hücreler

Hematopoetik kök hücreler kendilerini yenileyebilmenin yanı sıra farklı hücre tiplerine de dönüşebilen erişkin kök hücreleridir. Bu kök hücreler; eritrositler, lökositler (B-lenfositler, T-lenfositler, nötrofiller, bazofiller, eozinofiller, makrofajlar), trombositler vb. gibi tüm kan hücrelerini oluşturabilme yeteneğindedirler. Kemik iliği, periferik kan, kordon kanı hematopoetik kök hücrelerin elde edildiği başlıca kaynaklardır. Hematopoetik kök hücreler daha çok hücrel tedavilerde kullanılır (62).

2.3.3.2.B Mezenkimal (Stromal) Kök Hücreler

Mezenkimal (stromal) kök hücreler ilk kez 1976 yılında Fridenstein tarafından kemik iliğinde tanımlanmıştır (73). MKH' ler osteoblastlar, kondrositler, adipositler, endotel hücreler, miyositler, stromal hücreler, fibroblastlar vb. gibi hücrelere kolaylıkla farklılaşabilen multipotent kök hücrelerdir (21, 74).

MKH' ler başlıca kemik iliği olmak üzere kas, kıkırdak, sinovial sıvı, adipoz doku, deri, göbek kordonu vb. gibi kaynaklardan elde edilebilirler (73, 74).

MKH' lerin elde edildiği dokular homojen olmayıp birçok farklı tipte hücreler bulundurmaktadır. MKH' lerin homojen olarak elde edilebilmesi için fenotipik özelliklerinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu hücreler morfolojik olarak iğ şeklinde olup fibroblastlara benzemektedirler. En önemli farkları nükleus yerleşiminin fibroblastlarda asimetrik olup, bu hücrelerde simetrik olmasıdır. Bunun yanı sıra MKH' ler STRO-1, SH-2, SH-3, SH-4 gibi hücre yüzey belirteçleri eksprese ederler. Bu sayede MKH' leri in-vitro ortamda diğer hücre tiplerinden ayıralabilir (74, 75).

Kök hücre çalışmalarında mezenkimal kök hücreler hızlı üreme ve birçok hücre tipine farklılaşma özelliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Mezenkimal kök hücreler bu farklılaşma sırasında birçok büyüme faktörü ve sitokin salgırlar. Bunlar; IGF' ler, TGF- β , VEGF, HGF, PGE, IL-10, IL-6 vb. gibi faktörler ve sitokinlerdir (19, 21).

MKH' ler dokularda çok az sayıda bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmalarda kullanılmak için in-vitro kültür ortamında çoğaltılıp saflaştırılması gerekir.

2.3.3.2.C Fibroblast Hücreler

Mezoderm kaynaklı olan, fibroblast hücreler yaygın kullanılan yetişkin hücrelerdir. Fibroblastlar; uzun iğ şeklinde olup, nükleusların hücredeki konumlanması bakımından MKH' lardan ayrılırlar (76). Fibroblastlar başlıca kollojen ve fibronektin üretiminden sorumludur. Bunun yanı sıra vücut gelişiminde, organogenezisde, yara iyileşmesinde önemli rol oynarlar (77).

Fibroblastlar dokularda çok fazla bulunan hücreler olmakla birlikte, birçok hücre tiplerine farklılaşma gösterdiğinden fibroblast olarak bulunduğu kaynak azdır. Genellikle kaynak olarak deri dokusundan izole edilen fibroblastlar, kültür ortamına alındıktan sonra MKH' lar gibi plastik yüzeye yapışma özelliği gösterirler. Bu özelliklerinden dolayı fibroblast hücrelerde de yaygın olarak hücre kültür çalışmalarında kullanılırlar (77).

2.4. Kùltür Ortamları

Kùltüre alınan tüm hücreler kùltür ortamlarının bileşimlerinden etkilenirler. Bu nedenle, hücre tipinin ve çalışmanın farklılığına göre kullanılması gereken farklı kùltür ortamları vardır (21).

MKH' lerin çoğalma ve farklılaşması için genellikle kullanılan hücre kùltürler; Minimum Essential Medium (MEM), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Isntitute (RPMI)- 1640, Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) gibi kùltürlerdir. Bunların yanı sıra hücrelerin kùltür kabına yapışma ve çoğalmasına etki eden fetal sığır serumu (FBS) da kullanılır. FBS' nin başlıca proteini albümindir (BSA)' dir. FBS' nin kullanılmadığı durumlarda insan serumu (AB serum), plazması, platelet lizatı veya büyüme faktörleri (bFGF, VEGF, IGF-I, ve TGF- β gibi) kullanılır (21).

Hücre kùltür ortamlarında kullanılan serum; hücrenin büyümesinde, proliferasyonunda ve farklılaşmasında önemli rol oynar. En yaygın kullanılan serum tipi FBS' dir (78). Hücre kùltür ortamlarında serum kullanmak şart değildir. Son yıllarda animal-free, protein-free ve serum-free gibi kùltürlerin de kullanımı yaygınlaşmıştır (79, 80).

Serum-free kùltürler hayvan serumu kullanılmadan hazırlanır (79). Bunun yanı sıra içeriğinde inorganik tuzlar, aminoasitler, vitaminler, hormonlar, yağ asitleri, büyüme faktörleri (FGF, PDGF vb.), proteinler gibi hücrelerin büyüme ve gelişmesini destekleyecek bileşenler eklenebilir (80). Animal-free ve serum-free kùltürleri benzerdir, ancak animal-free kùltürlerde hayvan kaynaklı hiçbir serum bileşeni bulunmaz (21). Çünkü animal-free kùltürler hayvan serumu kullanılmadan hazırlanır. Protein-free kùltürler ise proteinden yoksun olarak tanımlanmasına rağmen çok düşük miktarda da olsa protein bulunabilir (79).

Son zamanlarda hücre kùltürlerinde serum-free kùltürleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Serum-free kùltürler diğer kùltür tiplerine göre bileşimlerinin daha

iyi olması, kontaminasyon düzeyinin düşük olması, potansiyel enfeksiyon ajanların daha az olması ve düşük maliyetli olması nedeniyle tercih edilmektedir (79).

Bu bilgiler doğrultusunda kök hücre çalışmalarında serum-free kültürlerin kullanılması sonucu dışardan herhangi bir faktör veya destekleyici kültür eklenmedikçe, kültür ortamında ölçülen yeni analitlerin hücrenin kendisinden salındığını düşünülmektedir. Yapılan bu çalışmada serum-free kültürleri kullanarak kültüre alınan MKH ve FH' lardan kültür ortamına salınan IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-4 ve PAPP-A düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Doku Örneklerin Toplanması

Bu çalışma Acıbadem Labcell ve Acıbadem Labmed Klinik Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışmada toplam 20 hastadan alınan numuneler kullanıldı. Örneklerin çalışmada kullanılabilmesi için Acıbadem Üniversitesi Atadek Kurul'undan etik onam alınmıştır (etik onam karar no: 2015-7/8).

Hastaların farklı doku örneklerinden izole edilen insan MKH ve FH' lar serum-free içerikli kültürlerde çoğaltıldı. Çalışmada kullandığımız MKH ve FH' ların elde edildiği kaynaklar ve kültür içerikleri Tablo-1' de verilmiştir.

MKH ve FH Kaynakları ve Kültür içeriği			
	Doku tipi	Kültür Çeşidi	Kültür Sayısı
MKH ve FH Kaynakları	Yağ doku	MKH	10
	Kemik iliği	MKH	3
	Sinovial	MKH	1
	Deri	FH	6
Kültür Tipi	Serum-free Kültür (Bazal+Destekleyici Kültür Ortamı)		

Tablo 1. MKH ve FH kaynakları ve kültür içeriği

3.2. Gereçler

3.2.1. Kimyasallar

Çalışmada; kollogenaz tip II (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), fosfat tamponu (PBS, Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, İsrail), serum-free kültür (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, İsrail), tripsin-EDTA (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, İsrail), ultrasensitive PAPP-A ELISA kiti

(AnshLabs, Webster, Texas, USA), IGF-I, IGFBP-3 ve IGFBP-4 ELISA kitleri (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) ve IMMULITE 2000 IGFBP-3 kiti (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA) kullanıldı.

3.2.2. Cihazlar

Çalışmada; etüv (Thermo Nüve EV 018, Canada, USA), santrifüj (Thermo NF1200R, Canada, USA), mikroskop (Olimpus, Woerd Avenue Waltham, MA, USA), 175 cm² lik flask (Techno Plastic Products, Trasadingen, İsviçre), yıkayıcı (Biotek 233128, Highland Park, Winooski, USA), karıştırıcı (Biosan, Riga, Letonya), vorteks (Biosan, 580901028, Riga, Letonya), Otoanalizör (IMMULITE 2000 XPi Immunoassay System N5316, Siemens Healthcare Diagnostics Products, Berlin, Almanya) mikropipetler (Axygen, 358152146, Central Avenue Union City, CA. OMKA tarafından Ekim 2014' den Nisan 2015' e kadar kalibrasyonu yapılmıştır) ve spektrofotometre (Biotek 208957, Highland Park, Winooski, USA) cihazları kullanıldı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Dokulardan Kök Hücrelerin Elde Edilmesi

Çalışmamızda MKH ve FH kültürleri kullanıldı. MKH için yağ doku, kemik iliği ve sinovial doku kaynak olarak kullanıldı. Kemik iliğinden MKH elde edilmesi sırasında uygulanan prosedür yağ doku ve sinovial dokuya uygulanan prosedürden farklı olduğundan aşağıda ayrıca belirtildi. FH kültürü için ise deri kaynak olarak kullanıldı.

3.3.2. Adipoz ve Sinovial Dokudan Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi

1. Dokulardan alınan örnekler kollajenaz tip II enzimi ile 37°C' de 1 saat inkübe edildi ve hücre izolasyonu yapıldı.

2. İzole edilen hücreler, ortamdan kollejenazı uzaklaştırmak için 400g' de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı.
3. Tüp dibinde kalan pellet kısmı fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) ile yıkanarak 400g' de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Bu işlem toplamda 2 kez yapıldı.
4. Böylece tüpün alt kısmında ihtiyacımız olan mezenkimal kök hücrelerin (stromal vasküler fraksiyon, SVF) bulunduğu pellet kısmı elde edilerek, kültüre alınmaya hazır hale getirildi.
5. Mezenkimal kök hücrelerin bulunduğu pellet T-175cm²' lik flaska konup, üzerine 40 ml. serum-free kültür ortamı eklenerek inkübe edildi (primer kültür).
6. Primer kültürün 1. gününde bir defaya mahsus olmak kaydıyla serum-free kültür içeriğinin (40mL) %2' si kadar (2mL) insan serumu (AB) kullanıldı. Serum-free kültür, bazal (500mL) ve destekleyici kültürleri (3mL) karıştırılarak hazırlanan stok çözeltiden kondu.
7. İnkübasyon için etüv 37°C ve %5' lik CO₂' e ayarlandı.
8. İnkübasyon süresi boyunca (24 saat) MKH' lar plastik kültür kabının tabanına adezyon (yapışma) gösterdi.
9. Hematopoetik kök hücreler gibi adezyon özellik göstermeyen hücreler 24 saat sonra PBS ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı.
10. Düzenli olarak her 3 günde bir flastaki besiyeri değiştirildi.
11. 10.günde ışık mikroskobu altında hücre kontrolü yapıldı.
12. 15.günde tekrar hücre kontrolü yapılarak, %70' lik hücre yoğunluğuna ulaşan kültürler ilk pasajlama işlemi yapılmak üzere hazır hale getirildi.

Kemik iliğinden MKH elde edilmesinde, diğer dokulardan farklı olarak uygulanan aşamalar olup, aşağıda ayrıca belirtildi.

3.3.3. Kemik İliğinden Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi

1. Kemik dokusundan 20 mL kemik iliği alınarak, 10 mL fikol için kondu.
2. 800g ve 21°C' de 25 dakika santrifüj edildi.

3. Santrifüj işleminden sonra süspansiyon, gözle görünecek şekilde 4 tabaka halinde ayrıldı.
4. Plazmanın olduğu en üst tabaka atılarak, altında kalan mezenkimal kök hücrelerin bulunduğu mononükleer hücre (MNH) tabakası alındı.
5. Ortamdan ficolü uzaklaştırmak için alınan MNH tabakası 2 kez PBS ile yıkandı.
6. Yıkama işlemleri için 5mL MNH, 20mL PBS içinde 400g' de 10 dakika 2 kez santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı.
7. Santrifüj işleminden sonra MNH tabakasında bulunan MKH' ların çoğalması için kültüre alınmaya hazır hale getirildi.
8. MKH' ların bulunduğu pellet flaska konup, üzerine 40mL serum-free kültür ortamı eklenerek inkübe edildi (primer kültür).
9. Primer kültürün 1. gününde bir defaya mahsus olmak kaydıyla serum-free kültür içeriğinin (40mL) %2' si kadar (2mL) insan serumu (AB) kullanıldı. Serum-free kültürü, bazal (500mL) ve destekleyici kültürler (3mL) karıştırılarak hazırlanan stok çözeltiden kondu.
10. İnkübasyon için etüv 37°C ve %5' lik CO₂' e ayarlandı.
11. İnkübasyon süresi boyunca (24 saat) MKH' lar plastik kültür kabının tabanına adezyon (yapışma) gösterdi.
12. Hematopoetik kök hücreler gibi adezyon özellik göstermeyen hücreler 24 saat sonra PBS ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı.
13. Düzenli olarak her 3 günde bir flastaki besiyeri değiştirildi.
14. 10. günde ışık mikroskobu altında hücre kontrolü yapıldı.
15. 15. günde tekrar hücre kontrolü yapılarak, %70' lik hücre yoğunluğuna ulaşan kültürler ilk pasajlama işlemi yapılmak üzere hazır hale getirildi.

3.3.4. Deriden Fibroblast Hücrelerin Elde Edilmesi

1. Dokulardan alınan örnekler kollajenaz tip II enzimi ile 37°C' de, 1 saat inkübe edildi ve hücre izolasyonu yapıldı.
2. İzole edilen hücreler, ortamdan kollejenazı uzaklaştırmak için 400g' de, 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı.

3. Tüpün dibinde kalan pellet kısmı ise PBS ile yıkanarak 400g' de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Bu işlem toplamda 2 kez yapıldı.
4. Böylece tüpün alt kısmında ihtiyacımız olan FH' ların bulunduğu pellet kısmı elde edildi ve kültüre alınmaya hazır hale getirildi.
5. Elde edilen pellet T-175 cm²' lik flaska konup, üzerine 40mL serum-free kültür ortamı eklenerek inkübe edildi (primer kültür).
6. Primer kültürün 1. gününde bir defaya mahsus olmak kaydıyla serum-free kültür içeriğinin (40mL) %2' si kadar (2mL) insan serumu (AB) kullanıldı. Serum-free kültürü, bazal (500mL) ve destekleyici kültürler (3mL) karıştırılarak hazırlanan stok çözeltiden kondu. Destekleyici kültür içeriği aşağıdaki Tablo-2' de gösterildiği gibidir.
7. Inkübasyon için etüv 37°C ve %5' lik CO₂' e ayarlandı.
8. Düzenli olarak her 3 günde bir flastaki besiyeri değiştirildi.
9. 10. günde ışık mikroskobu altında hücre kontrolü yapıldı.
10. 15. günde tekrar hücre kontrolü yapılarak, %70' lik hücre yoğunluğuna ulaşan kültürler ilk pasajlama işlemi yapılmak üzere hazır hale getirildi.

Destekleyici Kültür İçeriği	
Kültür Bileşenleri	Konsantrasyonlar (mg/lt)
İnorganik tuzlar	8246.78
Aminoasitler	1776
Vitaminler	35.64
Hormonlar	10.11
Yağ asitleri	72
İz elementler	184.03
Büyüme faktörleri (FGF, PDGF)	0.013
Proteinler	1020
Diğerleri (şeker, lipitler vb.)	11900

Tablo-2. Serum-free kültür ortamı için kullanılan destekleyici kültür içeriği. Çalışmada destekleyici kültür ortamı için kullanılan bileşenlerin içeriği üretici firma (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, İsrail) tarafından gizli tutulduğundan içerik hakkında daha fazla bilgi verilememektedir.

3.3.5 Kök Hücrelerin Pasajlanmaları

Bu aşama, elde edilen tüm hücreler için ortak olup aşağıdaki gibidir:

1. Primer kültür yapıldıktan 15 gün sonra hücreler (MKH ve FH) %0,25' lik tripsin-EDTA ile kaldırılarak yeni flasklara alındı (1. pasaj).
2. Ortamdaki tripsini uzaklaştırmak için hücreler tüp içerisinde 400g' de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı.
3. Pellet kısmı, PBS ile yıkanarak 400g' de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Bu işlem 2 kez yapıldı.
4. Tüpün dibinde kalan pellet kısmı T-175 cm²' lik flasklara ekildi (1 cm²' ye 3 bin ile 6 bin arası hücre ekildi).
5. Her 3 günde bir flastaki besiyeri değiştirildi.
6. 6. günden sonra flastaki hücreler mikroskop ortamında incelendi ve %70 yoğunluğa ulaştıklarında, yapışkan hücreler %0,25' lik tripsin-EDTA ile kaldırılarak 2. pasaja alındı (2. pasaj).
7. Bundan sonraki her pasajda aynı işlemler tekrarlanarak istenilen pasaj sayısı kadar işlemler devam ettirildi.

3.3.6.Pasajlardan Örneklerin Alınması

Çalışmamızda MKH ve FH kültürleri art arda 3 kez pasajlandı. Her pasajın sonunda, MKH ve FH kültür ortamlarından 4 mL örnek alındı ve 4 porsiyona ayrıldı. Alınan örnekler çalışmanın yapılacağı güne kadar -80°C' de saklandı.

3.4.Örneklerin Analiz Edilmesi

Her pasaj sonrası kültür ortamından alınan örneklerde PAPP-A, IGF-I, IGFBP-3 ve IGFBP-4 düzeylerindeki değişikliklerin analizi için Sandwich tipi Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi kullanıldı. Bunlara ek olarak; IGFBP-3 düzeylerinin analizi için kemilüminesan yöntemi de kullanıldı.

ELISA protein, peptit, hormon gibi birçok analitlerin tayininde kullanılan, duyarlı bir yöntemdir (81). ELISA temel olarak antijen- antikor bağlanması üzerine çalışılan bir yöntem olup, ortama kolorimetrik substratlar eklenip oluşan renk değişikliğinin spektrometrede okunarak, analitin konsantrasyonunun hesaplanması esasına dayanır. ELISA Plate (96' lık plate)' indeki her bir kuyucuğa çalışmak istenilen antijenin antikoru sıkı bir şekilde gömülüdür. Numuneler bu kuyucuklara konulduğunda ilgili antijen antikoruna bağlanır. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar yıkanarak artı kalan kısım uzaklaştırılır. Her bir kuyucuğa antijene bağlanması için antikor-enzim konjugatı konur. Belli bir inkübasyon işleminden sonra kuyucuklar tekrar yıkanır. Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa enzimle reaksiyona girebilecek TMB kromojen substratı konularak mavi renk oluşumu gözlenir. Mavi renk oluşumu reaksiyonun gerçekleştiği anlamına gelir. Kısa bir inkübasyon sonrası stop solüsyonu konularak sarı renk oluşumu gözlenir ve spektrofotometrede belirlenen dalga boylarında oluşan rengin yoğunluğuna bağlı olarak konsantrasyon tayini yapılır (81).

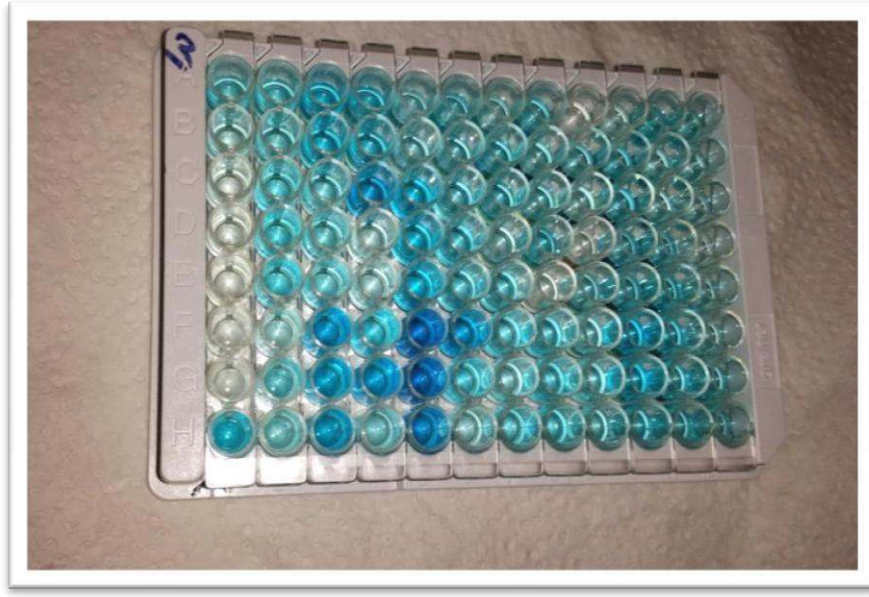
Kemilümünasan yöntemi ise temel olarak bir kimyasal reaksiyon sonucunda ortaya çıkan ışın miktarını ölçmeye dayanır. Ölçülen ışın miktarına göre maddenin konsantrasyonu belirlenir (82).

3.4.1. IGF-I, IGFBP-3 ve IGFBP-4 Düzeylerinin ELISA Yöntemi ile Ölçümü

IGF-I, IGFBP-3 ve IGFBP-4'nın ölçülmesinde ELISA kitleri kullanıldı. Çalışma sırasında kullanılacak materyaller (karıştırıcı, yıkayıcı, vorteks, spektrofotometre vb.) kullanıma hazır hale getirildi. Çalışma sırasında kullanılan IGF-I, IGFBP-3 ve IGFBP-4 reaktifleri protokollerinde belirtildiği oranlarda hazırlanarak, uygulanan prosedürlerin ortak yönleri aşağıdaki gibidir:

1. Tüm reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına (21°C) getirildi.

2. Kısa bir vorteksleme işleminden sonra standartlar (IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-4' ün protokollerinde istenilen oranlarda hazırlanan standartlar) ve örnekler platedeki kuyucuklara pipetlendi (100µL).
3. Oda sıcaklığında, 150 rpm' lik karıştırıcıda, 2,5 saat inkübe edildi.
4. Kuyucuklar otomatik mikropate yıkayıcıda, yıkama solüsyonu (IGF-I, IGFBP-3 ve IGFBP-4 protokollerinde belirtildiği gibi hazırlanan yıkama solüsyonları) ile 4 kez yıkandı.
5. Her bir kuyucuğa biotinle işaretlenmiş antikor pipetlendi (100µL).
6. Oda sıcaklığında, 150 rpm' lik karıştırıcıda, 1 saat inkübe edildi.
7. Kuyucuklar otomatik mikropate yıkayıcıda, yıkama solüsyonu (IGF-I, IGFBP-3 ve IGFBP-4 protokollerinde belirtildiği gibi hazırlanan yıkama solüsyonları) ile 4 kez yıkandı.
8. Her bir kuyucuğa streptavidin-HRP (Horseradish Peroksidaz) konjugatı pipetlendi (100µL).
9. Oda sıcaklığında, 150 rpm' lik karıştırıcıda, 1 saat inkübe edildi.
10. Kuyucuklar otomatik mikropate yıkayıcıda, yıkama solüsyonu (IGF-I, IGFBP-3 ve IGFBP-4 protokollerinde belirtildiği gibi hazırlanan yıkama solüsyonları) ile 4 kez yıkandı.
11. Her bir kuyucuğa TMB (Tetrametilbenzidin) kromojen solüsyonu pipetlenerek, mavi renk oluşumu gözlemlendi (100µL).
12. Oda sıcaklığında, 150 rpm' lik karıştırıcıda, 30 dakika inkübe edildi.
13. Son olarak her bir kuyucuğa stop solüsyonu (Sülfürik asit) pipetlenerek sarı renk oluşumu gözlemlendi ve 20 dakika içerisinde spektrofotometrede 450 nm ve 630 nm' de okundu.



Resim-1. TMB solüsyonu konulduktan sonraki renk oluşumu. Resimde IGFBP-3 düzeylerinin ELISA yöntemiyle ölçülmesi sırasında TMB solüsyonu konulduktan sonraki oluşan renk (mavi) gözlenmektedir. ELISA Plate' inde A1 ve F6 arasındaki kuyucuklara (yukarıdan aşağıya ilk 6 kuyucuk) ELISA Kitinde bulunan standartlar pipetlendi. B2 ve H12 arasına ise kültür örnekleri pipetlendi. Resimde görüldüğü gibi kültür örneklerinin olduğu kuyucuklar standartların olduğu kuyucuklara göre daha koyu renktedir. Sonuç olarak, kültür ortamlarındaki IGFBP-3 düzeylerinin bu çalışmada ölçümü yapılamayacak yoğunlukta olduğu gözlemlendi.



Resim-2. ELISA yönteminde stop solüsyonu konulduktan sonraki renk oluşumu (IGFBP-3 düzeylerinin ölçümü sırasında)



Resim-3. ELISA yönteminde stop solüsyonu konulduktan sonraki sarı renk oluşumu (IGFBP-4 düzeylerinin ölçümü sırasında)

3.4.2. PAPP-A Düzeylerinin ELISA Yöntemi ile Ölçümü

PAPP-A'nın ölçülmesinde ultrasensitive PAPP-A ELISA kiti kullanıldı. Çalışma sırasında kullanılacak materyaller (karıştırıcı, yıkayıcı, vorteks, spektrometre vb.) kullanıma hazır hale getirildi. Tüm reaktifler protokolda belirtildiği gibi hazırlandı. Uygulanan çalışma prosedürü ise aşağıdaki gibidir:

1. Tüm reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına (21°C) getirildi.
2. Kısa bir vorteksleme işleminden sonra kalibratörler (PAPP-A Cal-1, 2, 3, 4, 5, 6), kontroller (PAPP-A CTRL-1, 2) ve örnekler sırası ile platedeki kuyucuklara pipetlendi (50µL).
3. Her bir kuyucuğa PAPP-A assay buffer pipetlendi (50µL).
4. Oda sıcaklığında, 600 rpm' lik karıştırıcıda, 2 saat inkübe edildi.
5. Kuyucuklar otomatik mikropate yıkayıcıda, PAPP-A yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
6. Her bir kuyucuğa antikor-HRP (Horseradish Peroksidaz) konjugatı pipetlendi (100µL).

7. Oda sıcaklığında, 600 rpm' lik karıştırıcıda, 1 saat inkübe edildi.
8. Kuyucuklar otomatik mikropate yıkayıcıda, PAPP-A yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
9. Her bir kuyucuğa TMB (Tetrametil benzidin) kromojen solüsyonu pipetlenerek, mavi renk oluşumu gözledi (100µL).
10. Oda sıcaklığında 600 rpm' lik karıştırıcıda, 10 dakika, karanlıkta inkübe edildi.
11. Son olarak her bir kuyucuğa stop solüsyonu (Sülfürik asit) pipetlenerek (100µL) sarı renk oluşumu gözlemlendi ve 20 dakika içerisinde spektrofotometrede 450nm ve 630nm dalga boylarında okundu.

3.4.3. IGFBP-3 Düzeylerinin Kemilüminesan Yöntemi ile Ölçümü

1. Çalışma otoanalizör cihazında, IMMULITE 2000 IGFBP-3 kiti kullanıldı.
2. Tüm reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına getirildi (21°C).
3. Numuneler için kullanılacak tüplere uygun şekilde barkodlar yapıştırılarak numuneler konuldu (300 µL).
4. Tüpler uygun sporlara konarak cihaza verildi.
5. Okunan IGFBP-3 düzeyleri bilgisayar ekranında görüntülendi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Veriler analiz edilirken ilgili yöntemin ölçüm sınırları dışında kalan veriler çalışmadan çıkarıldı. Kalan veriler içinde uç değerlerin varlığını araştırmak için Grubb Testi yapıldı. Çalışmadaki tüm veriler için tanımlayıcı istatistik çalışması yapıldı. Verilerin normal dağılıma uyup uymadığı Shapiro Wilk Testi ve varyansların homojenliği ise Levene Testi ile analiz edildi. Normal dağılıma uymayan veriler ortanca (minimum, maksimum) olarak gösterildi. Her bir pasajda ölçülen analit sayısı ikiden fazla olduğu için gruplar arasındaki farkın analizi için Friedman Testi ve farklı çıkan grubun belirlenmesi için de Dunn' s testi yapıldı. Gruplar arasındaki

ilişkinin belirlenmesi için Spearman Korelasyon analizi yapıldı. Tüm analizlerde anlamlılık düzeyi için $p<0.05$ olarak alındı. Verilerin grafikte gösterilmesinde Kutu-Çizgi ve sütun grafikleri kullanıldı.

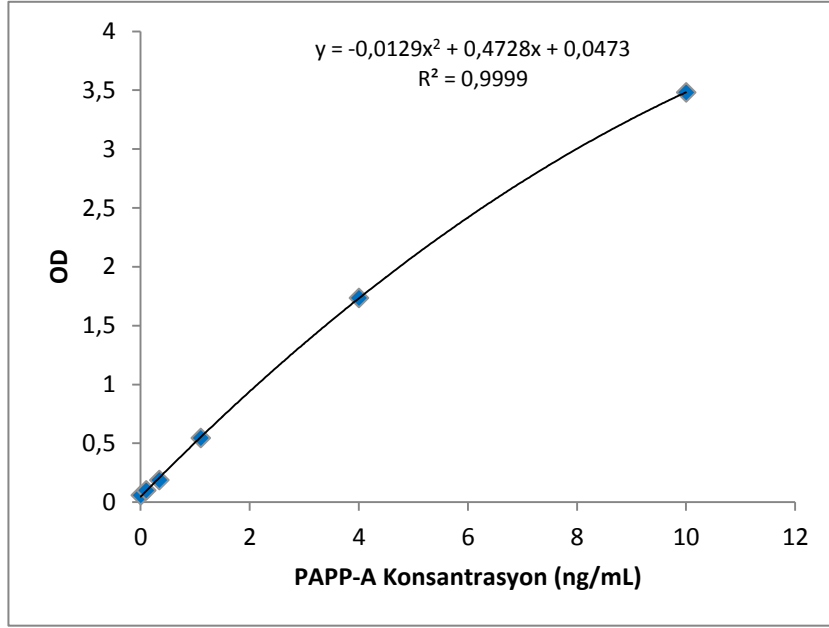
4. BULGULAR

Mezenkimal kök hücre ve fibroblast hücre kültürlerin farklı pasajlardaki PAPP-A, IGF-I ve IGFBP-4 düzeylerinin genel tanımlayıcı bilgileri olarak; ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerleri aşağıdaki Tablo-3' te verildiği gibidir. Veriler normal dağılıma uymadığı için istatistiksel değerlendirmede ortanca (min, mak) değerleri esas alınmıştır.

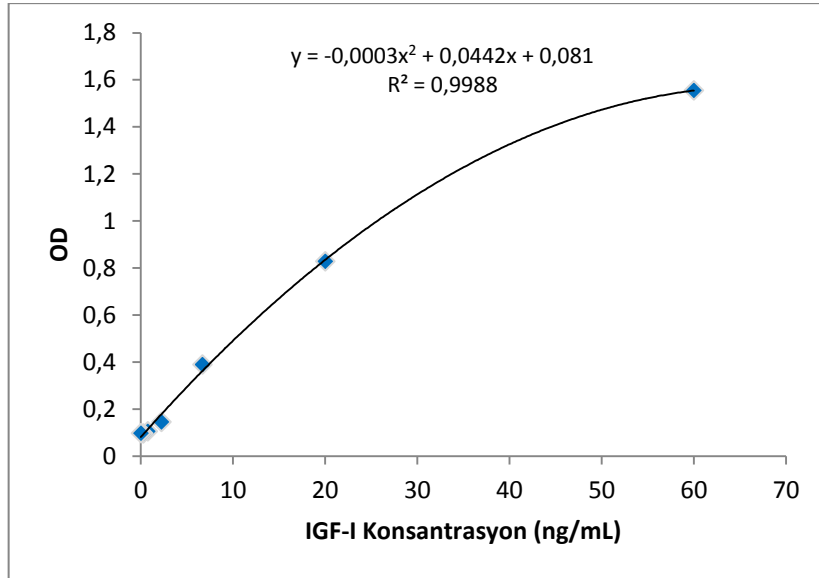
Analitler	Pasajlar	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	Maksimum	Minimum
PAPP-A ng/mL	1.pasaj	1,36	1,42	0,79	5,17	0,10
	2.pasaj	2,92	3,08	1,26	10,00	0,15
	3.pasaj	3,18	3,33	1,58	10,00	0,20
IGF-I ng/mL	1.pasaj	0,86	1,15	0,49	3,69	0,27
	2.pasaj	0,61	0,38	0,43	1,28	0,27
	3.pasaj	0,43	0,03	0,43	0,47	0,40
IGFBP-4 ng/mL	1.pasaj	4,85	5,18	2,57	18,22	0,41
	2.pasaj	7,35	7,23	5,00	31,70	0,90
	3.pasaj	7,99	6,32	6,10	24,51	2,13

Tablo 3. PAPP-A, IGF-I ve IGFBP-4 düzeylerinin pasajlara göre genel tanımlayıcı bilgileri. Pasajlara göre verilen PAPP-A, IGF-I ve IGFBP-4 düzeylerinin maksimum ve minimum değerleri, çalışmada kullanılan hücrelerin elde edildiği doku tiplerinden bağımsızdır.

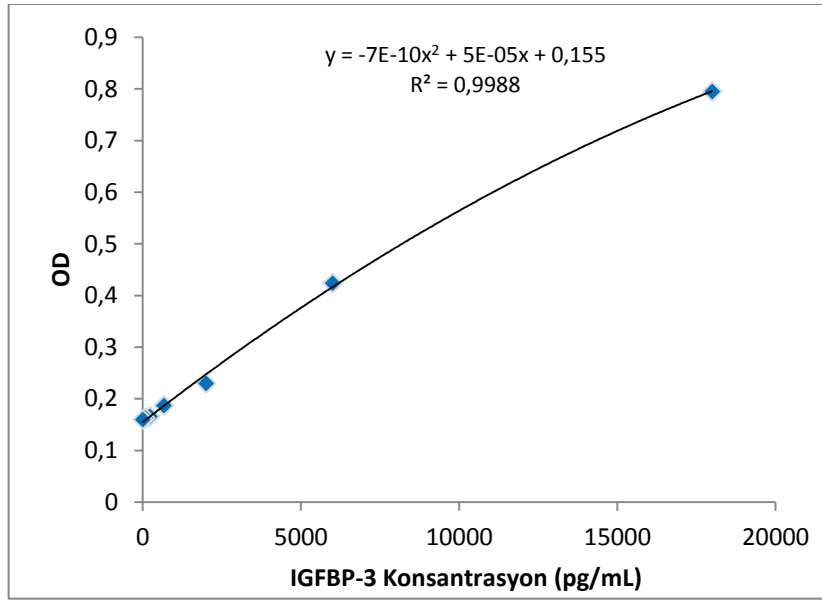
Kültür ortamlarındaki IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-4 ve PAPP-A düzeyleri ölçülürken kullanılan ELISA yöntemlerinin kalibrasyon eğrileri aşağıdaki grafiklerde gösterildiği gibidir.



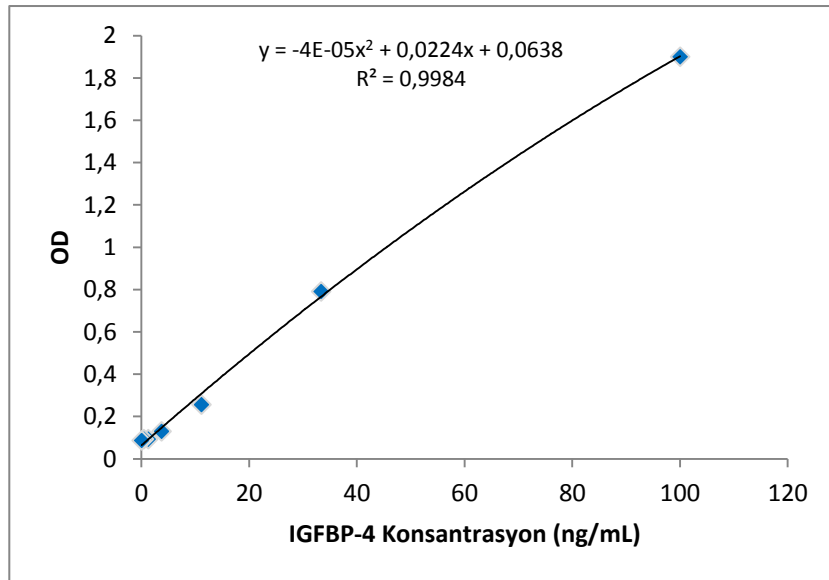
Grafik-1. PAPP-A yöntemi için kalibrasyon eğrisi



Grafik-2. IGF-I yöntemi için kalibrasyon eğrisi



Grafik-3. IGFBP-3 yöntemi için kalibrasyon eğrisi



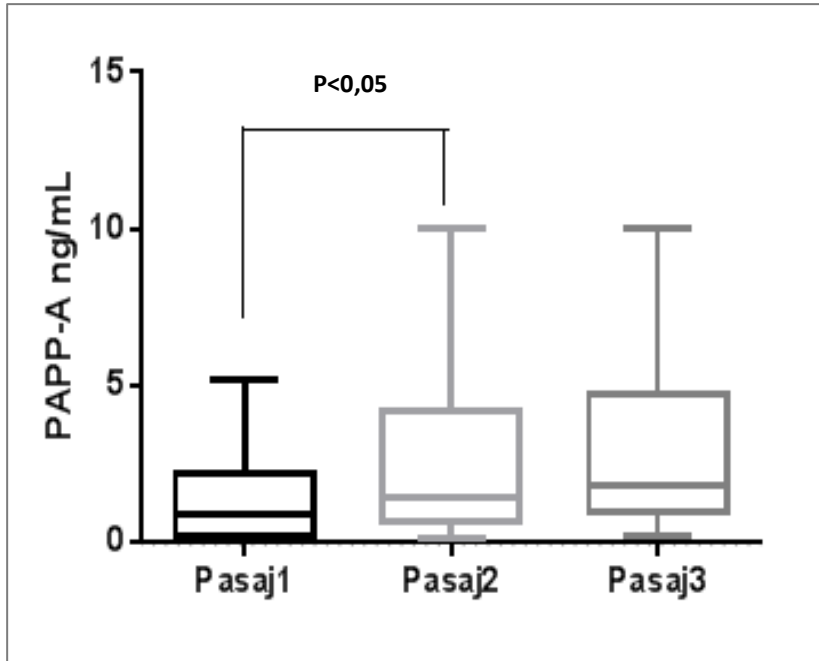
Grafik-4. IGFBP-4 yöntemi için kalibrasyon eğrisi

IGFBP-3 düzeyleri hem ELISA hem de kemilümünesan yöntemleri kullanılarak ölçülmeyi çalışıldı. Ancak IGFBP-3 düzeyleri her 2 yöntemde de okuma aralığı dışında kaldığı için ölçülemedi. IGFBP-3 ELISA kitinin okuma aralığı 0,74-18 ng/mL olup, kültür ortamındaki IGFBP-3 düzeyleri bu okuma aralığının üstünde kalmıştır. Kemilemünesan yönteminde çalışılan IMMULITE 2000 IGFBP-3 kitin okuma aralığı ise 100-16000 ng/mL olup, IGFBP-3 düzeyleri bu okuma aralığının

altında kaldı. Çalışmamızda kültür ortamındaki IGFBP-3 düzeyleri 18-100 ng/mL arasında olduğundan ölçülemedi.

PAPP-A ELISA yöntemi için 9 hastanın numuneleri çift olarak okundu ve elde edilen farklardan yöntemin standart sapması (SD) 0,57 ve varyasyon katsayısı (CV) %13 olarak hesaplandı. IGFBP-4 ELISA yöntemi için 18 hastanın numuneleri çift olarak okundu ve elde edilen farklardan yöntemin SD' sı 0,59 ve CV' si ise % 8 olarak hesaplandı.

Farklı pasajların kültür ortamlarındaki PAPP-A düzeyleri karşılaştırıldığında (Grafik-5), PAPP-A' nın 1. ve 2. pasajları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$). Bu farka göre; 1. pasajdan 2. pasaja geçerken PAPP-A düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlendi.

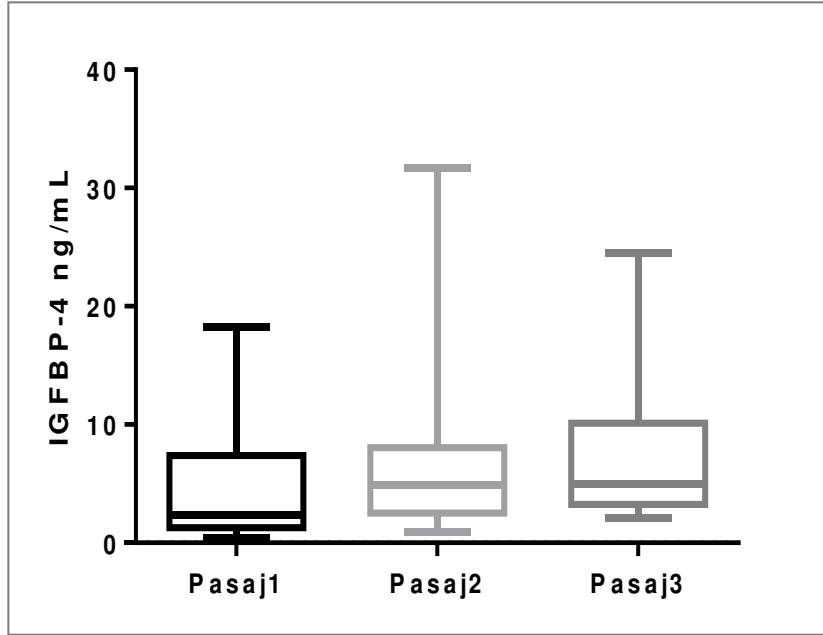


Grafik-5. 1., 2. ve 3. pasajlardaki PAPP-A düzeyleri. Farklı pasajlardan alınan kültür örneklerindeki PAPP-A düzeyleri karşılaştırıldığında sadece 1. ve 2. pasaj arasında anlamlı bir fark bulunmuştur.

Buna karşın 2. ve 3. veya 1. ve 3. pasajlardaki PAPP-A düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Yine 1. ve 3. pasajlardaki

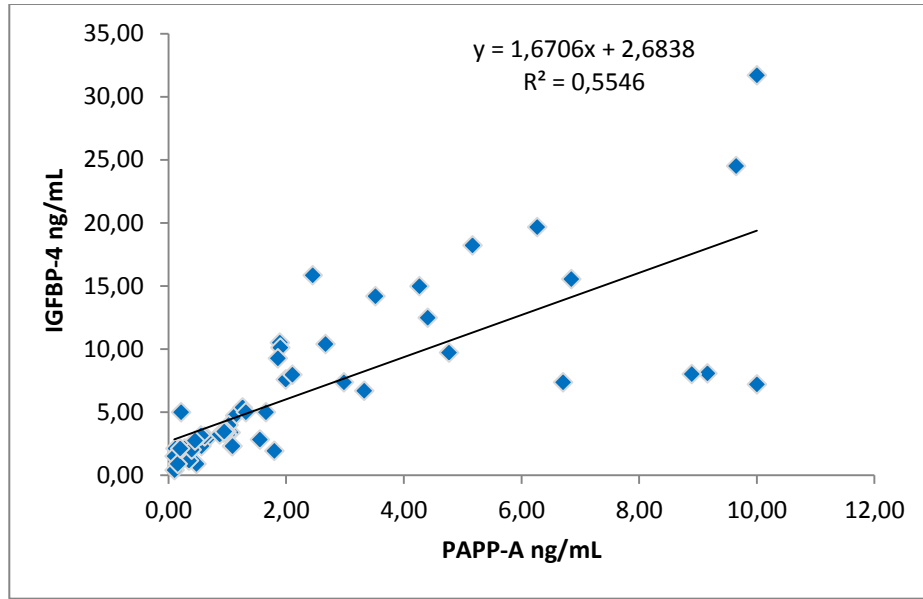
PAPP-A düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$).

Farklı pasajlardaki IGFBP-4 düzeyleri karşılaştırıldığında (Grafik-6), anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$).



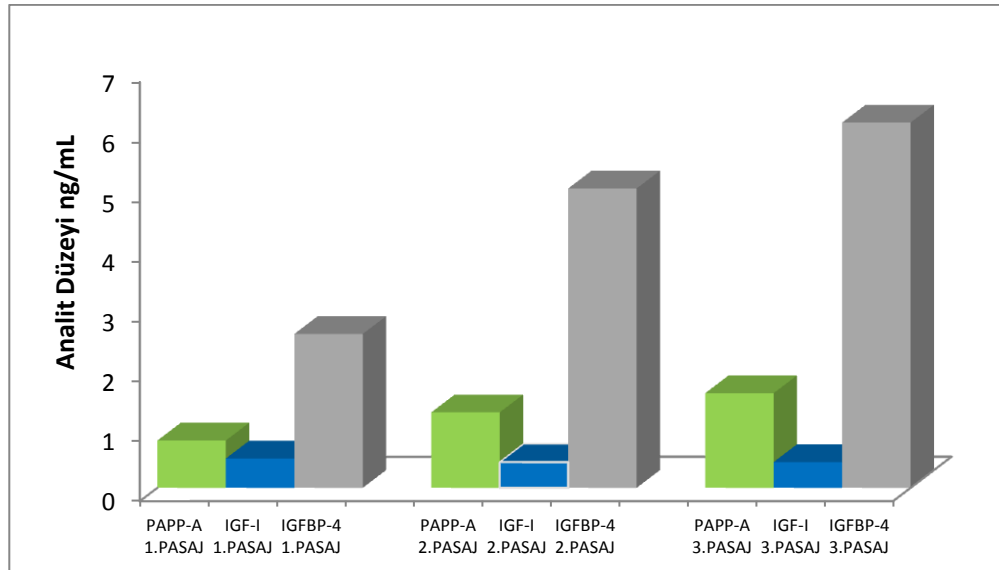
Grafik-6. 1., 2. ve 3. pasajlardaki IGFBP-4 düzeyleri. Farklı pasajlardan alınan kültür örneklerindeki IGFBP-4 düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Pasajlara göre PAPP-A, IGF-I ve IGFBP-4 düzeyleri arasındaki korelasyon incelendiğinde (Grafik-7); PAPP-A' nın 1. pasajı ile IGFBP-4' ün 1. pasajı arasında ($r=0,764$; $p=0,001$), PAPP-A' nın 2. pasajı ile IGFBP-4' ün 2. pasajı arasında ($r=0,94$; $p=0,001$) ve PAPP-A' nın 3. pasajı ile IGFBP-4' ün 3. pasajı arasında ($r=0,821$; $p=0,001$) anlamlı bir korelasyonun olduğu gözlemlendi.



Grafik-7. Farklı pasajlardaki PAPP-A ve IGFBP-4 düzeyleri arasındaki ilişki

Farklı pasajlardaki PAPP-A, IGF-I ve IGFBP-4 düzeylerinin birbirleri arasındaki ilişkiler incelendiğinde; art arda yapılan 3 pasajda PAPP-A düzeyleri artarken, IGF-I düzeylerinin azaldığı (anlamli veri sayısı yeterli olmadığından istatistiksel değerlendirme yapılamadı, görsel değerlendirme yapıldı) ve IGFBP-4 düzeylerinin arttığı gözlemlendi (Grafik-8). Yine aynı pasajlarda IGF-I düzeyleri azalırken, IGFBP-4 düzeylerinin arttığı gözlemlendi.



Grafik-8. Farklı pasajlardaki PAPP-A, IGF-I ve IGFBP-4 düzeyleri. Çalışmada toplam 20 adet kültür örneği (MKH: n=14, FH: n=6) kullanıldı. PAPP-A 1. Pasaj için n=16 (Adipoz

Doku: n=9; Kemik İliği: n=3; Deri: n=4), PAPP-A 2. Pasaj için n=19 (Adipoz Doku: n=9; Sinovial Doku: n= 1; Kemik İliği: n=3; Deri: n=6), PAPP-A 3. Pasaj için n=18 (Adipoz Doku: n=9; Sinovial Doku: n= 1; Kemik İliği: n=2; Deri: n=6), IGF-I 1. Pasaj için n=8 (Adipoz Doku: n=5; Kemik İliği: n=1; Deri: n=2), IGF-I 2. Pasaj için n=8 (Adipoz Doku: n=4; Deri: n=4), IGF-I 3. Pasaj için n=4 (Adipoz Doku: n=1; Kemik İliği: n=1; Deri: n=2), IGFBP-4 1. Pasaj için n=18 (Adipoz Doku: n=9; Sinovial Doku: n= 1; Kemik İliği: n=3; Deri: n=5), IGFBP-4 2. Pasaj için n=19 (Adipoz Doku: n=9; Sinovial Doku: n= 1; Kemik İliği: n=3; Deri: n=6), IGFBP-4 3. Pasaj için n=18 (Adipoz Doku: n=9; Sinovial Doku: n= 1; Kemik İliği: n=2; Deri: n=6).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma, MKH ve FH kültürlerin farklı pasajlarındaki serum-free kültürlerinden alınan örneklerinde PAPP-A, IGF-I, IGFBP-3 ve IGFBP-4 düzeylerinin birbirleri ile olan ilişkilerinin incelenmesi açısından özgündür. Analiz sonuçlarına göre; art arda yapılan 3 pasajlarda PAPP-A ve IGFBP-4 düzeylerinde bir artış olurken, IGF-I düzeylerinde azalma gözlenmiştir.

PAPP-A, IGF-I bağlı IGFBP-4' ü proteolitik olarak parçalayan ve IGF-I' in aktivasyonunu sağlayan bir proteazdır (10). Yani, ortamda PAPP-A düzeyleri artıyorsa IGF-I bağlı IGFBP-4' ün proteolitik parçalanması daha fazla olacağından ters orantılı olarak IGFBP-4' ün azalması beklenirdi. Ancak analiz sonuçlarına göre art arda yapılan pasajlardan alınan kültür örneklerindeki PAPP-A ve IGFBP-4 düzeylerine bakıldığında, IGFBP-4 düzeylerinin PAPP-A düzeylerine oranla çok daha fazla olduğu görüldü. IGFBP-4' ün kültür ortamlarında daha fazla olması ve dolayısıyla ortamdaki IGF-I' leri PAPP-A' nın işlevi aksine daha çok bağlayacağından, IGF-I düzeyinin giderek azalması bu şekilde açıklanabilir. Ayrıca ortamda IGF-I' leri IGFBP-4' den başka kendine bağlayan IGFBP-3 proteinlerinin de bulunması kültür ortamlarında IGF-I düzeylerinin azalmasına da neden olabilir (46).

Çalışmamızda kültür ortamlarındaki IGFBP-3 düzeylerini ölçmeye çalıştık. Ancak ELISA yöntemiyle çalışıldığında IGFBP-3 düzeyleri, okuma aralığının üstünde kaldığı için anlamlı bir sonuç elde edilemedi. Bu nedenle IGFBP-3 düzeylerini kemilüminesan yöntemiyle de ölçmeye çalıştık. Ancak bu analiz sonucunda ise IGFBP-3 düzeyleri kitin okuma aralığının altında kaldığı için yine anlamlı bir sonuç alınamadı. Buna rağmen ELISA yöntemiyle ölçülen IGFBP-3 düzeylerinin kitin okuma aralığının üstünde olması bize ortamda yoğun olarak IGFBP-3' lerin olduğunu göstermektedir. IGFBP-3' ün yanı sıra; PAPP-A, IGF-I ve IGFBP-4' ün analiz sonuçlarına göre kitlerin okuma aralığı altında ve üstünde kalan değerler de gözlemlendi. Okuma aralığının altında kalan değerler çalışmaya dahil

edilmezken, üstünde kalan değerler için (sadece PAPP-A analizinde 2 değer), kitin okuma aralığının en üst değeri baz olarak alındı.

PAPP-A IGF-I bağlı IGFBP-4 için güçlü bir metalloproteaz olup, IGFBP-3' e karşı proteolitik aktivitesi yoktur (12). Yani IGFBP-3' ler PAPP-A tarafından parçalanamazlar. PAPP-A' nın haricinde IGFBP' leri parçalayan başka proteazlar da vardır. Bu proteazlar kathepsinler ve serin proteazlarıdır (11). PAPP-A' nın aksine IGFBP-3' ler bu proteazlar tarafından parçalanabilirler. Ayrıca kathepsin-D proteazın IGF bağlı IGFBP' leri parçalarken, IGF' leri de fragmentlerine ayırdığı belirlenmiştir (11). Çalışmamızda IGFBP proteazlarından sadece PAPP-A düzeylerini ölçtük fakat ortamda bulunabilen diğer IGFBP proteazları tarafından da IGFBP-3 ve 4 hatta IGF-I parçalanabilir (11). Pasajlarla orantılı olarak IGF-I düzeylerinin azalması bu şekilde ilişkilendirilebilir. IGFBP-3 düzeyleri ölçülemediği için pasajlara göre ilişkisini yorumlayamıyoruz. Bu çalışmada art arda yapılan pasajlarla orantılı olarak IGFBP-4 düzeylerinin azalmasını beklenirken, hipotezimize ters olarak artış olduğu tespit edildi. PAPP-A IGFBP-4 proteazı olduğundan PAPP-A düzeylerinin artışı IGFBP-4 düzeylerinin düşmesine neden olabileceği beklenmektedir. Ölçülen artışın nedeni tam olarak açıklanamasa da IGFBP-4, PAPP-A' ya göre çok daha fazla sentezlenmiş olabilir. Ayrıca IGFBP-4, proteazlar tarafından parçalanmasına rağmen IGFBP-4' ün açığa çıkan parçaları test kuyucuğundaki antikora bağlanarak ELISA' da parçalanmamış IGFBP-4 gibi yüksek okuma değerlerinin ortaya çıkmasına neden olmuş olabilir. Bu durum çalışmamızda, IGFBP-4 düzeylerinin PAPP-A düzeylerinden daha yüksek çıkmasını açıklayabilir. IGFBP-4' ün parçalanıp parçalanmadığı protein elektroforezi ve Westernblot yöntemleri ile belirlenebilir.

Mezenkimal kök hücreler kültür ortamlarında osteositler, kondrositler, adipositler, miyositler ve fibroblastlar gibi birçok hücre tiplerine farklılaşabilirler. Bu farklılaşma sırasında MKH' lardan birçok büyüme faktörü ve sitokin salgılanır (19, 21). Bunlar IGF' ler, TGF- β , TNF- α , VEGF, HGF, PGE, IL-10, IL-6 vb. gibi faktörler ve sitokinlerdir. Yoon ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada insan kemik dokusundan izole edilen MKH' lardan IGF-I' in salındığı bildirilmiştir (83). Gehmert ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise yağ dokusundan izole edilen

MKH' lardan IGF-I' in salındığı gözlenmiştir (84). MKH' lardan salınan büyüme faktörleri ve sitokinler başka proteinlerin de bu hücrelerden salınmasını uyabilirler. Fibroblast kültürlerinde yapılan çalışmalarda IGFBP' lerin sentezlenmesinde IGF-I' in önemli rol oynadığı gösterilmiştir (17). Bunun yanı sıra yine fibroblast kültürlerinde yapılan çalışmalarda TNF- α ve IL 1- β gibi sitokinlerde IGFBP' lerin salınımını düzenlediği belirlenmiştir (16). Bu çalışmaya göre TNF- α ve IL 1- β ' nın IGFBP-3 ve IGFBP-4 salınımını azalttığı gözlenmiştir. Kondrosit kültürlerinde yapılan bir çalışmada ise TNF- α ve IL 1- α ' nın IGFBP-3 düzeylerini arttırırken, IGFBP-4 düzeylerini değıştirmedeğı belirtilmiştir (52). Bu nedenle bu sitokinlerin IGFBP-3 ve IGFBP-4' ün sentez ve salınımı üzerine etkisi tam olarak belirlenememiştir. Bir başka çalışmada ise TNF- α ve IL 1- β gibi sitokinlerin adipoz doku kültürlerinde IGF-I' in sentezini inhibe ettiğı gözlenmiştir (18). Ayrıca TGF- β , TNF- α , IL-1 β , IL-4 gibi sitokinler PAPP-A salınımını da uyarmaktadırlar (13, 14). Conover ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptığı bir çalışmada, makrofajlardan salınan TGF- β , TNF- α , IL-1 β , IL-4 gibi proinflatuar sitokinlerin yetişkin insanların osteoblast kültürlerinde PAPP-A regölasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (14). Çalışmamızda MKH ve FH kültürlerinde bu hücrelerden salınan büyüme faktörleri ve sitokinlerin IGF-I, IGFBP-3, IGFBP-4 ve PAPP-A sentez ve salınımı üzerinde etkili olabileceklerini düşünöyoruz. Bu veriler doğrultusunda yukarıda belirtilen sitokinlerin etkisi incelendiğinde MKH ve FH kültür ortamlarında düzeyleri ölçölen analitlerden PAPP-A düzeylerinde artış ve IGF-I düzeylerinde azalış (IGFBP-3 ve IGFBP-4 hakkında net bir çalışma yoktur) olması beklenir. Çalışmamızın sonuçlarına göre; art arda yapılan pasajlarla orantılı olarak PAPP-A ve IGFBP-4 düzeylerinde artma buna karşın IGF-I düzeylerinde azalma gözlenmiştir.

Çalışmamızın hücre kültür aşamalarında kültür tipi olarak, serum-free kültürleri kullandık. Bunun amacı, serum-free kültür içeriğinde hayvan kaynaklı herhangi bir serumun kullanılmamış olmasıdır (21, 79). Serum-free kültürlerine hücrelerin büyümesi ve farklılaşması için gerekli destekleyici kültür olarak bazı bileşenler eklenebilir. Bu bileşenler; inorganik tuzlar, aminoasitler, vitaminler, hormonlar, yağ asitleri, büyüme faktörleri (FGF, PDGF vb.), proteinler gibi faktörler olup çalışmanın şekline göre bu faktörler değışebilir. Çalışmamızda kullanılan serum-free kültürlerin

içeriğinde ölçtüğümüz analitlerin olmamasına dikkat ettik. Bu nedenle ölçülen analitler serum kaynaklı olmayıp, hücrelerden salınan faktörler olduğu söylenebilir.

Kültür çalışmalarında en önemli unsurlardan biri çalışılan pasaj sayısıdır. Çünkü pasaj sayısı arttıkça hücreler daha homojenize olmakla birlikte hücrelerin transformasyon ve infeksiyon riski artmaktadır (85). Ayrıca pasaj sayısındaki artışla birlikte kök hücrelerde telomeraz aktivitesi azalır, buna bağlı olarak telomer kısalması görülür ve hücreler yaşlanarak apoptozise uğrarlar (15). Bu nedenle kültür çalışmalarında pasaj sayısının ideal oranlarda tutulması gerekmektedir. MKH üretiminde yapılan çalışmalar için ideal pasaj sayısının primer pasajdan (F0) sonra en fazla 2 (F2) ya da 3 (F3) kez olması önerilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda MKH ve FH kültürlerinin pasaj sayısını 3 olarak sınırlandırdık (85).

Sonuç olarak bu çalışmada; MKH ve FH' lerin farklı hücre tiplerine farklılaşması sırasında hücre büyümesinde ve farklılaşmasında önemli rolü olan IGF-I düzeyinin artmasıyla ilişkili olarak, PAPP-A düzeylerinde artış ve IGFBP-4 düzeylerinde de azalış olmasını bekledik. Çalışmanın analiz sonuçlarına göre; MKH ve FH kültürlerinde art arda yapılan pasajlarda PAPP-A ve IGFBP-4 düzeyleri artarken, IGF-I düzeylerinde azalma gözlemlendi. IGF-I düzeylerin hipotezimize ters olarak azalma göstermesi ortamdaki IGFBP-4 düzeyinin, PAPP-A düzeyine oranla daha fazla artmasıyla ilişkilendirilebilir. Ayrıca IGFBP-3' ün kitin (ELISA) okuma aralığının üstünde kalmış olması bize ortamda yoğun olarak IGFBP-3' ün de bulunduğunu göstermektedir. Bu nedenle IGF-I' in IGFBP-4' ün yanı sıra IGFBP-3' e bağlanmasıyla da kültür ortamlarında düzeyleri azalmış olabilir. Bu veriler doğrultusunda çalışmamız in-vitro ortamda IGF-I' in ve dolayısıyla PAPP-A, IGFBP-3 ve IGFBP-4 düzeylerinin hücre farklılaşması üzerindeki etkisinin incelenmesi açısından önemlidir. Ayrıca gelecekte kök hücre çalışmalarında daha kısa sürede istenilen hücrelerin elde edilmesine yardımcı olabilir ve hatta yeni kültür tiplerinin üretilmesine katkı sağlayabilir.

6. LİMİTASYONLAR

Yapılan bu çalışmada, MKH ve FH kültürlerinin art arda yapılan pasajlardaki PAPP-A, IGF-I ve IGFBP-4 düzeylerini ELISA yöntemiyle ölçebildik. Ancak, IGFBP-3 düzeyleri hem ELISA hem de kemilümünesan yönteminde okuma aralığının dışında kaldığı için ölçüm yapılamadı. IGFBP-3 düzeyleri ELISA yönteminde okuma aralığının üstünde kaldığından, bu değerlerin belirlenebilmesi için kullanılan örnekler dilüsyon edilerek tekrar ölçülebilir. Ayrıca IGF-I ölçümünde anlamlı veri sayısının az olması nedeniyle gerekli istatistiksel hesaplamalar yapılamadı. Bu çalışma daha büyük hasta gruplarıyla yapıldığı takdirde daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir.

KAYNAKLAR

1. Lin TM, Halbert SP, Spellacy WN. Measurement of pregnancy-associated plasma proteins during human gestation. The Journal of clinical investigation. 1974;54(3):576-82.
2. Wald NJ, Watt HC, Hackshaw AK. Integrated screening for Down's syndrome on the basis of tests performed during the first and second trimesters. The New England journal of medicine. 1999;341(7):461-7.
3. Boldt HB, Conover CA. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): a local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGFBPs. Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society. 2007;17(1):10-8.
4. Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Gleich GJ, Hays LG, et al. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999;96(6):3149-53.
5. Conover CA, Kiefer MC, Zapf J. Posttranslational regulation of insulin-like growth factor binding protein-4 in normal and transformed human fibroblasts. Insulin-like growth factor dependence and biological studies. The Journal of clinical investigation. 1993;91(3):1129-37.
6. Parker A, Gockerman A, Busby WH, Clemmons DR. Properties of an insulin-like growth factor-binding protein-4 protease that is secreted by smooth muscle cells. Endocrinology. 1995;136(6):2470-6.
7. Bulut I, Coskun A, Ciftci A, Cetinkaya E, Altıay G, Caglar T, et al. Relationship between pregnancy-associated plasma protein-A and lung cancer. The American journal of the medical sciences. 2009;337(4):241-4.
8. Schindler AM, Bischof P. Histochemical localization of pregnancy-associated plasma protein A in fetal, infant, and adult organs and comparison between antisera. Gynecologic and obstetric investigation. 1984;18(2):88-94.
9. Overgaard MT, Oxvig C, Christiansen M, Lawrence JB, Conover CA, Gleich GJ, et al. Messenger ribonucleic acid levels of pregnancy-associated plasma

- protein-A and the proform of eosinophil major basic protein: expression in human reproductive and nonreproductive tissues. *Biology of reproduction*. 1999;61(4):1083-9.
10. Conover CA. Key questions and answers about pregnancy-associated plasma protein-A. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2012;23(5):242-9.
 11. Bunn RC, Fowlkes JL. Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2003;14(4):176-81.
 12. Mazerbourg S, Callebaut I, Zapf J, Mohan S, Overgaard M, Monget P. Up date on IGFBP-4: regulation of IGFBP-4 levels and functions, in vitro and in vivo. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. 2004;14(2):71-84.
 13. Ortiz CO, Chen BK, Bale LK, Overgaard MT, Oxvig C, Conover CA. Transforming growth factor-beta regulation of the insulin-like growth factor binding protein-4 protease system in cultured human osteoblasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2003;18(6):1066-72.
 14. Conover CA, Chen BK, Resch ZT. Regulation of pregnancy-associated plasma protein-A expression in cultured human osteoblasts. *Bone*. 2004;34(2):297-302.
 15. Sebastian Sethe b ASa, Alexandra Stolzing a. Aging of mesenchymal stem cells. *Sheffield Institute of Biotechnological Law and Ethics, University of Sheffield, UK*. 2005.
 16. Liu Y, Tsushima T, Miyakawa M, Isozaki O, Yamada H, Xu ZR, et al. Effect of cytokines on production of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) from human fibroblasts in culture. *Endocrine journal*. 1999;46 Suppl:S63-6.
 17. Conover CA. A unique receptor-independent mechanism by which insulinlike growth factor I regulates the availability of insulinlike growth factor binding proteins in normal and transformed human fibroblasts. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88(4):1354-61.

18. Gude MF, Frystyk J, Flyvbjerg A, Bruun JM, Richelsen B, Pedersen SB. The production and regulation of IGF and IGFBPs in human adipose tissue cultures. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. 2012;22(6):200-5.
19. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2010;28(3):585-96.
20. Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury*. 2007;38 Suppl 4:S23-33.
21. Can A. Kök Hücre Biyolojisi ve Tedavide Kullanım Alanları: 2014 Akademisyen Tıp Yayınevi A.Ş.; 2014. 363-426 p.
22. Le Roith D. The insulin-like growth factor system. *Experimental diabetes research*. 2003;4(4):205-12.
23. Kemp SF. The Role of the Pituitary-Growth Hormone-IGF Axis in Glucose Homeostasis. 2011.
24. Bonefeld K, Moller S. Insulin-like growth factor-I and the liver. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2011;31(7):911-9.
25. Perrini S, Laviola L, Carreira MC, Cignarelli A, Natalicchio A, Giorgino F. The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *The Journal of endocrinology*. 2010;205(3):201-10.
26. Ayuk J, Sheppard MC. The role of growth hormone-receptor antagonism in relation to acromegaly. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2004;5(11):2279-85.
27. Roelfsema V, Clark RG. The growth hormone and insulin-like growth factor axis: its manipulation for the benefit of growth disorders in renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2001;12(6):1297-306.

28. Salmon WD, Jr., Daughaday WH. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1957;49(6):825-36.
29. Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD, Jr., van den Brande JL, van Wyk JJ. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature*. 1972;235(5333):107.
30. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *The Journal of biological chemistry*. 1978;253(8):2769-76.
31. Puche JE, Castilla-Cortazar I. Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *Journal of translational medicine*. 2012;10:224.
32. Laron Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone 2001.
33. Lelbach A, Muzes G, Feher J. The insulin-like growth factor system: IGFs, IGF-binding proteins and IGFBP-proteases. *Acta physiologica Hungarica*. 2005;92(2):97-107.
34. Ong K, Kratzsch J, Kiess W, Costello M, Scott C, Dunger D. Size at birth and cord blood levels of insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-1 (IGFBP-1), IGFBP-3, and the soluble IGF-II/mannose-6-phosphate receptor in term human infants. The ALSPAC Study Team. *Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000;85(11):4266-9.
35. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocrine reviews*. 1989;10(1):68-91.
36. Dafgard E, Bajaj M, Honegger AM, Pitts J, Wood S, Blundell T. The conformation of insulin-like growth factors: relationships with insulins. *Journal of cell science Supplement*. 1985;3:53-64.
37. Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The EMBO journal*. 1986;5(10):2503-12.

38. Kasuga M, Fujita-Yamaguchi Y, Blithe DL, White MF, Kahn CR. Characterization of the insulin receptor kinase purified from human placental membranes. *The Journal of biological chemistry*. 1983;258(18):10973-80.
39. Humbel RE. Insulin-like growth factors I and II. 1989.
40. Pavelic K, Bukovic D, Pavelic J. The role of insulin-like growth factor 2 and its receptors in human tumors. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2002;8(12):771-80.
41. Schmid C, Steiner T, Froesch ER. Preferential enhancement of myoblast differentiation by insulin-like growth factors (IGF I and IGF II) in primary cultures of chicken embryonic cells. *FEBS letters*. 1983;161(1):117-21.
42. Maki RG. Small is beautiful: insulin-like growth factors and their role in growth, development, and cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(33):4985-95.
43. Bornfeldt KE, Raines EW, Nakano T, Graves LM, Krebs EG, Ross R. Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. *The Journal of clinical investigation*. 1994;93(3):1266-74.
44. Le Roith D, Parrizas M, Blakesley VA. The insulin-like growth factor-I receptor and apoptosis. Implications for the aging process. *Endocrine*. 1997;7(1):103-5.
45. Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, O'Dwyer ST, Shalet SM, Egger M. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet*. 2004;363(9418):1346-53.
46. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam AW. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *The Lancet Oncology*. 2010;11(6):530-42.
47. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrine reviews*. 1999;20(6):761-87.

48. Siwanowicz I, Popowicz GM, Wisniewska M, Huber R, Kuenkele KP, Lang K, et al. Structural basis for the regulation of insulin-like growth factors by IGF binding proteins. *Structure (London, England : 1993)*. 2005;13(1):155-67.
49. Collett-Solberg PF, Cohen P. The role of the insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 1996;25(3):591-614.
50. Zhang L, Smith DW, Gardiner BS, Grodzinsky AJ. Modeling the Insulin-Like Growth Factor System in Articular Cartilage. *PloS one*. 2013;8(6):e66870.
51. Mucci LA, Stark JR, Pollak MN, Li H, Kurth T, Stampfer MJ, et al. Plasma levels of acid-labile subunit, free insulin-like growth factor-I, and prostate cancer risk: a prospective study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2010;19(2):484-91.
52. Olney RC, Wilson DM, Mohtai M, Fielder PJ, Smith RL. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha increase insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) production and IGFBP-3 protease activity in human articular chondrocytes. *The Journal of endocrinology*. 1995;146(2):279-86.
53. Conover CA, Oxvig C, Overgaard MT, Christiansen M, Giudice LC. Evidence that the insulin-like growth factor binding protein-4 protease in human ovarian follicular fluid is pregnancy associated plasma protein-A. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(12):4742-5.
54. Stocker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Ruth FX, McKay DB, et al. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1995;4(5):823-40.
55. Overgaard MT, Haaning J, Boldt HB, Olsen IM, Laursen LS, Christiansen M, et al. Expression of recombinant human pregnancy-associated plasma protein-A and identification of the proform of eosinophil major basic protein as its physiological inhibitor. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(40):31128-33.

56. Oxvig C, Sand O, Kristensen T, Gleich GJ, Sottrup-Jensen L. Circulating human pregnancy-associated plasma protein-A is disulfide-bridged to the proform of eosinophil major basic protein. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(17):12243-6.
57. Conover CA, Bale LK, Harrington SC, Resch ZT, Overgaard MT, Oxvig C. Cytokine stimulation of pregnancy-associated plasma protein A expression in human coronary artery smooth muscle cells: inhibition by resveratrol. *American journal of physiology Cell physiology*. 2006;290(1):C183-8.
58. Resch ZT, Simari RD, Conover CA. Targeted disruption of the pregnancy-associated plasma protein-A gene is associated with diminished smooth muscle cell response to insulin-like growth factor-I and resistance to neointimal hyperplasia after vascular injury. *Endocrinology*. 2006;147(12):5634-40.
59. Chen BK, Leiferman KM, Pittelkow MR, Overgaard MT, Oxvig C, Conover CA. Localization and regulation of pregnancy-associated plasma protein a expression in healing human skin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(9):4465-71.
60. Mazerbourg S, Overgaard MT, Oxvig C, Christiansen M, Conover CA, Laurendeau I, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine, and equine ovarian follicles: involvement in IGF binding protein-4 proteolytic degradation and mRNA expression during follicular development. *Endocrinology*. 2001;142(12):5243-53.
61. Sangiorgi G, Mauriello A, Bonanno E, Oxvig C, Conover CA, Christiansen M, et al. Pregnancy-associated plasma protein-a is markedly expressed by monocyte-macrophage cells in vulnerable and ruptured carotid atherosclerotic plaques: a link between inflammation and cerebrovascular events. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47(11):2201-11.
62. Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Experimental cell research*. 2008;314(9):1937-44.

63. Aragona M, Maisano R, Panetta S, Giudice A, Morelli M, La Torre I, et al. Telomere length maintenance in aging and carcinogenesis. *International journal of oncology*. 2000;17(5):981-9.
64. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100(1):157-68.
65. Ma Hongbao YY, Margaret Ma. Totipotent of Stem Cell. 2012.
66. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, NY)*. 1998;282(5391):1145-7.
67. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-6.
68. Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *Journal of cell science*. 2000;113 (Pt 1):5-10.
69. Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocrine reviews*. 2006;27(2):208-19.
70. Lakshmipathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood reviews*. 2005;19(1):29-38.
71. Ross J, Li L. Recent advances in understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate. *Current opinion in hematology*. 2006;13(4):237-42.
72. Jadowiec J, Dongell D, Smith J, Conover C, Campbell P. Pregnancy-associated plasma protein-a is involved in matrix mineralization of human adult mesenchymal stem cells and angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *Endocrinology*. 2005;146(9):3765-72.
73. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2004;8(3):301-16.
74. Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, Bouslimi A, Al-Jassir F, Megges M, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem cell reviews*. 2013;9(1):32-43.
75. Conover CA. Role of PAPP-A in aging and age-related disease. *Experimental gerontology*. 2013;48(7):612-3.

76. Rieske P, Krynska B, Azizi SA. Human fibroblast-derived cell lines have characteristics of embryonic stem cells and cells of neuro-ectodermal origin. Differentiation; research in biological diversity. 2005;73(9-10):474-83.
77. Jukkola A, Risteli J, Risteli L. Effect of dextran on synthesis, secretion and deposition of type III procollagen in cultured human fibroblasts. The Biochemical journal. 1991;279 (Pt 1):49-54.
78. Gstraunthaler G. Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Serum-free Cell Culture. 2003.
79. Jr. SEB. The Case for Serum-Free Media. 2003.
80. Pytlík¹ S, Stehlík¹ and Matějková². Production of Clinical Grade Mesenchymal Stromal Cells. 2011.
81. Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. The Journal of investigative dermatology. 2013;133(9):e12.
82. Fan A, Cao Z, Li H, Kai M, Lu J. Chemiluminescence platforms in immunoassay and DNA analyses. Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry. 2009;25(5):587-97.
83. Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. The Journal of clinical investigation. 2005;115(2):326-38.
84. Gehmert S, Wenzel C. Adipose tissue-derived stem cell secreted IGF-1 protects myoblasts from the negative effect of myostatin. 2014;2014:129048.
85. Sensebe L. Clinical grade production of mesenchymal stem cells. Bio-medical materials and engineering. 2008;18(1 Suppl):S3-10.

