

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

**İN VİTRO KÜLTÜR ORTAMINDA KEMİK İLİĞİ NİŞİ
MODELLENMESİNE YÖNELİK ÇALIŞMALAR**

Dr. Ecz. Yağız ANASIZ

**Kök Hücre Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2018**

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

**İN VİTRO KÜLTÜR ORTAMINDA KEMİK İLİĞİ NİŞİ
MODELLENMESİNE YÖNELİK ÇALIŞMALAR**

Dr. Ecz. Yağız ANASIZ

**Kök Hücre Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL**

ANKARA

2018

**İN VİTRO KÜLTÜR ORTAMINDA KEMİK İLİĞİ NİŞİ MODELLENMESİNE
YÖNELİK ÇALIŞMALAR**
Yağız ANASIZ

Bu çalışma 21 Şubat 2018 tarihinde, jürimiz tarafından "Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalında Doktora Programı"nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Fahriye Duygu UÇKAN-ÇETİNKAYA*
(HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ)

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Rıza Köksal ÖZGÜL*
(HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ)

Üye: *Doç. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN*
(TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ)

Üye: *Prof. Dr. Ayşe Filiz ÖNER*
(HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ)

Üye: *Yrd. Doç. Dr. Parisa SHARAFİ*
(TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ)

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

5 Mart 2018

Diclehan
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Diclehan ORHAN

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

- **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

- ✓ **Tezimin/Raporumun 21/02/2021 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

- **Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

21/02/2018

Yağız ANASIZ



ETİK BEYAN

Bu çalışma bünyesindeki tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun biçimde atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanım Prof. Dr. R. Köksal Özgül danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Yağız ANASIZ

TEŞEKKÜR

Laboratuvarında çalışmaktan ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum, desteğini benden asla esirgemeyen, ne kadar çalışsam da emeğini ödeyemeyeceğim danışman hocam sayın Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL'e; akademinin gerçek anlamını öğreten, ufku genişleten, kök hücre ve rejeneratif tıp alanında yetişmiş olmamın yegane mimarı değerli hocam Prof. Dr. Duygu UÇKAN-ÇETİNKAYA'ya; çalışmalarımın elde ettiğim verileri yorumlanmasında ve yayına çevrilmesinde yardımcı olan ve önemli katkılar sağlayan sayın hocam Doç. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN'e; filtre ve torba sistemlerinin temininde önemli destek sağlayan sayın hocalarım Doç. Dr. Barış KUŞKONMAZ ve Doç. Dr. Fatma Visal OKUR'a; akım sitometri çalışmalarında yardımcı olan sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Fatima AERTS-KAYA'ya; kondrojenik farklılaşma çalışmalarında yardımcı olan sayın Yrd. Doç. Dr. Özay Gököz ve Uzm. Dr. Ayşegül Mendi'ye; fikir alışverişi yapmaktan zevk aldığım, çalışmalarımın bana destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Ali Dursun ve Doç. Dr. Basri GÜLBAKAN'a; PEDİSTEM ailesini oluşturan sayın hocalarım ve arkadaşlarıma; bu çalışmanın yapılmasında benden çok emeği olan aileme ve sevgili eşime her zaman yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na, Yurtiçi Doktora Burs Programı (TÜBİTAK BİDEB, 2211-A) kapsamında beni destekledikleri için teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (HÜBAP) tarafından THD-12181 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

Anasız, Y. İn Vitro Kültür Ortamında Kemik İliği Nişi Modellenmesine Yönelik Çalışmalar. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Programı Doktora Tezi, Ankara, 2018. Mezenkimal kök hücreler (MKH), prelinik araştırmalar, klinik çalışmalar ve yeni araştırma ilacı başvurularında en yaygın kullanılan kök hücre tipidir. İnsanlarda MKH izolasyonu başlıca kemik iliği ve adipoz dokudan yapılmakta olup, izole edilebilir MKH miktarı tüm çekirdekli hücrelerin yalnızca %0,001-3'lük kısmını oluşturmaktadır. Bu nedenle yeni izolasyon yöntemleri ve kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez kapsamında ilk bölümde, kemik iliği nakli sırasında kullanılan ve sonrasında tıbbi atık olarak uzaklaştırılan filtre ve torba sistemlerinin MKH kaynağı olarak uygunluğu araştırılmıştır. Kök hücre uygulamalarında güncel yaklaşım, sistemik ve/veya bölgesel olarak doğrudan MKH uygulanması yerine “*cell-free therapy*” olarak adlandırılan MKH kaynaklı biyoaktif bileşenlerin kullanılmasıdır. Çalışmamızın ikinci aşamasında, kök hücre nişinin temelini oluşturan, MKH kaynaklı biyoaktif bileşenlerden olan ekstraselüler matriks yapısının üretimi ve güncel doku mühendisliği uygulaması olan çeşitli deselülerizasyon yöntemleri ile izolasyonu, mikroskopik inceleme çalışmaları, kalıntı DNA miktarı ve glikozaminoglikan içeriği açısından değerlendirilmiş ve proteomik tekniklerle yapısı aydınlatılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, “kullanılmış” filtre ve torba sistemleri, özgül antijen ifadesine sahip, adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyeli bulunan MKH izolasyonu için önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Osteojenik farklılaşma besiyeri ile EM üretimi sonrasında Triton X-100, NH₄OH içeren çözelti ile deselülerizasyon yöntemi ile insan trabeküler kemik morfolojisi benzeri MKH-dEM izole edilmiş ve nLC-MS/MS yöntemi ile MKH-dEM kompozisyonunda yer alan 2005 farklı protein tanımlanmıştır. EM yapısını oluşturan, bağlantılı olan ve düzenlenmesinde rol alan önemli proteinler insan matrisom veritabanı ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Rejeneratif tıp, kemik iliği nişi, mezenkimal kök hücre, ekstraselüler matriks, deselülerizasyon, doku mühendisliği

(*) Bu çalışma THD-12181 numaralı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi projesi tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Anasız, Y. Studies on Modeling of Bone Marrow Niche Under In Vitro Conditions. Hacettepe University, Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Stem Cell, Ankara, 2018. Mesenchymal stem cells (MSC) are the widely used stem cell type in preclinical research, clinical studies and investigational new drug applications. Isolation of MSC can be provided from bone marrow and adipose tissue, and the total isolated amount of MSC consists of 0.001-3% of nucleated cells. Thus, novel isolation techniques and resources are still needed. In the first section of this thesis, the suitability of the filter and bag systems, which are used during bone marrow transfer, were investigated. Those systems are removed as a medical waste, after the transfer, in routine. The current approach in stem cell-based therapy is using bioactive compounds named as “*cell-free therapy*” resourced from MSC, instead of applying MSC as systemically or locally. In the second stage of this study, the production of extracellular matrix (ECM) structure, which is constructed as bioactive compounds resourced from MSC, providing the basis of stem cell niche was carried out. The isolation of this structure was performed by using various decellularization techniques, as a current tissue engineering application was evaluated with microscopic studies, residual DNA and glycosaminoglycan content. Afterward, the structure was enlightened by using proteomics techniques. The results demonstrated the used filter and bags systems are an important source for isolation of MSC, which has a specific antigen expression and representing adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation potential. Besides, after producing EM with osteogenic differentiation medium, human trabecular bone morphology-like MSC-dECM was isolated by using solution containing Triton X-100, NH₄OH. Then, 2005 different protein structures were demonstrated by using nLC-MS/MS technique. The important proteins, which consist, associate and regulate EM structure, were detected by using Human Matrisome Database.

Key Words: Regenerative medicine, bone marrow niche, mesenchymal stem cell, extracellular matrix, decellularization, tissue engineering

(*) This work was supported by Scientific Research Coordination Unit of Hacettepe University (Project Number: THD-12181).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kök Hücre Tipleri ve Mezenkimal Kök Hücreler	3
2.2. MKH Tabanlı Tedavi ve Ekstraselüler Matrikse Bakış	7
2.3. MKH-dEM İzolasyonu: Deselülerizasyon Yöntemi	10
2.4. MKH-dEM Tabanlı Çalışmalar	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1. Kemik İliği Nakli Sırasında Kullanılan Filtre ve Torba Sistemlerine Takılmış Olan Hücrelerin İzolasyonu	19
3.2. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	20
3.3. Mikoplazma Kontaminasyon Kontrolü	21
3.4. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyon Çalışmaları	22
3.4.1. Akım Sitometri Cihazı ile Yüzey Ekspresyonlarının Saptanması	22
3.4.2. Adipojenik, Osteojenik ve Kondrojenik Farklılaşma Çalışmaları	23
3.5. İn Vitro Koşullarda MKH Kaynaklı EM Üretim Çalışmaları	25
3.6. İn Vitro Koşullarda MKH Kaynaklı EM Eldesi İçin Deselülerizasyon Çalışmaları	25
3.6.1. %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH ₄ OH içeren PBS ile Deselülerizasyon	25
3.6.2. 20 mM NH ₄ OH İçeren Distile Su İle Deselülerizasyon	26

3.6.3. Tekrarlı Dondurma-Çözme Yöntemi ile Deselülerizasyon	26
3.6.4. 1 mM EDTA İçeren PBS ile Deselülerizasyon	26
3.7. Deselülerizasyon İşleminin Değerlendirilmesi	26
3.7.1. Kalıntı DNA Miktarının Araştırılması	27
3.7.2. İmmünfloresan Mikroskobu ile EM Yapısının İncelenmesi	27
3.7.3. Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu ile EM Yapısının İncelenmesi	28
3.7.4. Total Glukozaminoglikan (GAG) Miktarının Saptanması	28
3.8. Total Protein İzolasyonu ve Protein Kompozisyonunun Araştırılması	28
3.9. İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR	30
4.1. Kemik İliği Nakli Sırasında Kullanılan Filtre ve Torba Sistemlerine Takılmış Olan Hücrelerin İzole Edilmesi	30
4.2. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	31
4.3. Mikoplazma Kontaminasyon Kontrolü	33
4.4. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyon Çalışmaları	33
4.4.1. Akım Sitometri Cihazı ile Yüzey Ekspresyonlarının Saptanması	33
4.4.2. Adipojenik, Osteojenik ve Kondrojenik Farklılaşma Çalışmaları	34
4.5. İn Vitro Koşullarda MKH Kaynaklı EM Üretim Çalışmaları	36
4.6. İn Vitro Koşullarda MKH Kaynaklı EM Eldesi İçin Deselülerizasyon Çalışmaları	39
4.7. Deselülerizasyon İşleminin Değerlendirilmesi	42
4.7.1. Kalıntı DNA Miktarının Araştırılması	42
4.7.2. İmmünfloresan Mikroskobu ile İnceleme Yapılması	43
4.7.3. Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu ile İnceleme Yapılması	44
4.7.4. Total Glukozaminoglikan (GAG) Miktarının Saptanması	46
4.8. Total Protein İzolasyonu ve Protein Kompozisyonunun Araştırılması	48
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ	60
7. KAYNAKLAR	61
8. EKLER	
EK.1. EM ve İlişkili Protein Grupları ile Eşleşen Protein Listesi	

EK.2. Etik Kurul İzni

EK.3. Tez Çalışması İle İlgili Yayınlar ve Bildiriler

9. ÖZGEÇMİŞ



SİMGELER VE KISALTMALAR

AD	Adipoz doku
AMEM	<i>Alpha Modification of Eagle's Medium</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CFU-Fs	<i>Colony-forming-unit fibroblasts</i>
COMP	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
ddH₂O	Bidistile su
dEM	Deselülerize ekstraselüler matriks
DMEM-HG	<i>Dulbecco's modified eagle medium-high glucose</i>
DMEM-LG	<i>Dulbecco's modified eagle medium-low glucose</i>
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNase	Deoksiribonükleaz
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EKH	Embriyonik kök hücre
EM	Ekstraselüler matriks
ETKH	Erişkin tip kök hücre
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA	<i>The Food and Drug Administration</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
GAG	Glikozaminoglikan
gDNA	Genomik deoksiribonükleik asit
HKH	Hematopoetik kök hücre
IBMX	3-izobütil-1-metilksantin
IND	<i>Investigational new drug</i>
İPKH	İndüklenmiş pluripotent kök hücre
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
ITS	İnsülin-Transferrin-Selenyum
KHCO₃	Potasyum bikarbonat
KHK	Kanser kök hücresi

Kİ	Kemik iliği
miRNA	Mikro RNA
MKH	Mezenkimal kök hücre
MKH-dEM	Mezenkimal kök hücre kaynaklı deselülerize edilmiş ekstraselüler matriks
MKH-EM	Mezenkimal kök hücre kaynaklı ekstraselüler matriks
MKH+ MHH-dEM	Mezenkimal kök hücre kaynaklı deselülerize edilmiş ekstraselüler matriks üzerine tekrar mezenkimal kök hücre ekilerek oluşturulan yapı
MMP	Matriks metalloproteinaz
Na₂HPO₄	Sodyum hidrojenfosfat
NaH₂PO₄	Sodyum dihidrojenfosfat
NH₄Cl	Amonyum klorür
nLC-MS/MS	<i>Nano liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
NOTCH-1	<i>Neurogenic locus notch homolog-1</i>
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PMSF	Fenilmetan-sülfonil florür
RNA	Ribonükleik asit
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNase	Ribonükleaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBP	Tribütil fosfat
TCPS	<i>Tissue culture grade polystyrene</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor-beta</i>

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1 Niş yapısının ana bileşenlerinin şematik gösterimi	5
2.2. Kök hücre tiplerinin “kök hücre” ve “uygulanabilirlik” özellikleri açısından kıyaslanmasının şematik gösterimi	5
2.3. MKH kaynaklı terapötik etkinin şematik gösterimi	7
2.4. In vitro koşullarda EM üretimi ve deselülerizasyon işleminin şematik olarak gösterilmesi	14
2.5. MKH-dEM kullanımına bağlı olarak gözlenen etkilerin şematik gösterim	18
3.1. Kemik iliği nakli sonrasında hücre kültür laboratuvarına getirilen, izolasyon amacıyla kullanılan torba ve filtre sistemi fotoğrafı	20
4.1. Filtre ve torba sisteminde takılan hücrelerin izole edilerek Falcon tüplere aktarılma aşamalarına ait fotoğraflar	31
4.2. Tüp içerisinde lizis aşaması ve hücre pelletinin eldesine ilişkin fotoğraflar	32
4.3. Filtre ve torba sistemlerinden izole edilen hücre sayıları	32
4.4. Kültür işlemi sırasında ters faz ışıık mikroskobu kullanılarak ilk bir haftalık sürede elde edilen görüntüler.	33
4.5. Pasaj 1 ve Pasaj 2’de hücrelerin ters faz ışıık mikroskobu kullanılarak çekilen görüntüleri	33
4.6. Elektroforez işlemi sonrasında agaroz jelin görüntüsü	34
4.7. Akım sitometri analiz sonuçları	35
4.8. Adipojenik farklılaşma deneyine ilişkin mikroskop görüntüleri	36
4.9. Osteojenik farklılaşma deneyine ilişkin mikroskop görüntüleri	36
4.10. Kondrojenik farklılaşma deneylerine ilişkin görüntüler	37
4.11. DMEM-LG ve %10 FBS kullanılarak EM üretim aşamasının değerlendirilmesine ilişkin fotoğraflar	38

4.12.	Kültür ortamında askorbik asit kullanımının etkisi	38
4.13.	Askorbik asit ilaveli DMEM-LG ile EM üretim sürecinin fotoğrafları	39
4.14.	AMEM kullanılarak EM üretim süreci fotoğrafları	39
4.15.	Osteojenik kültür ortamı kullanılarak EM üretim işleminin fotoğrafları	39
4.16.	+4°C'de 1mM EDTA-PBS ile yapılan deselülerizasyon işlemine ait görüntüler	40
4.17.	Tekrarlı dondurma çözme yöntemi ile yapılan deselülerizasyon işlemine ait görüntüler	41
4.18.	Pipetleme ve çalkalayıcı üzerinde düşük hızda inkübasyon uygulanarak yapılan deselülerizasyon işlemi sonrasında EM görüntüleri	41
4.19.	Triton X-100 ve NH ₄ OH içeren PBS ve NH ₄ OH içeren distile su ile deselülerizasyon işlemine ait görüntüler	43
4.20.	Total genomik DNA miktar tayini sonuçları	44
4.21.	Deselülerizasyon öncesi ve sonrası DAPI boyamaları ile immünfloresan mikroskop görüntüleri	44
4.22.	İmmünfloresan çalışma sonuçlarının görüntüleri	45
4.23.	Çevresel taramalı elektron mikroskobu görüntüleri-I	46
4.24.	Çevresel taramalı elektron mikroskobu görüntüleri-II	47
4.25.	Kalibrasyon eğrisi	48
4.26.	Total GAG miktarı grafiği	48
4.27.	Saptanan proteinlerin örneklerle göre dağılımının gösterimi	48
4.28.	Saptanan 790 MKH-dEM proteinin insan matrizom veri seti ile kıyaslanmasının venn şeması ile gösterimi ve eşleşen proteinlerin listesi	49
4.29.	İnsan matrizom verisi ile eşleşen proteinlerin EM ve ilişkili protein gruplarına göre dağılım grafiği	49
4.30	3 örnek bünyesinde toplamda tayin edilen 2005 proteinden EM ve ilişkili protein gruplarına giren proteinlerin dağılım grafiği	50

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
2.1	Deselülerizasyon yöntemleri, kullanılan ajanlar, etki mekanizmaları ve EM üzerine olası etkileri	10
3.1.	Sistem bünyesine takılan hücrelerin izole edilmesi ve eritrosit yükünün azaltılması için kullanılan yıkama çözeltisi kompozisyonu	20
3.2.	PCR reaksiyonu için hazırlanan negatif kontrol, pozitif kontrol ve örnek formülasyonu	22
3.3.	PCR reaksiyonu için uygulanan sıcaklık değerleri ve süreleri	22
3.4.	Akım sitometri çalışmasında kullanılan antikorlara ilişkin bilgiler	23
4.1.	Uygulanan deselülerizasyon yöntemlerine ait sonuçlar ve önemli aşamalar	41

1. GİRİŞ

Kök hücre çalışmaları çok sayıda yeni makalenin yayınlandığı son derece güncel bir araştırma alanıdır. Kök hücre konusundaki araştırmalar yeni ilaç hedeflerinin ve moleküllerinin keşfi (1), öngörülse toksikoloji çalışmaları (2), fizyolojik ve fizyopatolojik olayların aydınlatılması (3, 4) ve rejeneratif tıp uygulamaları (5) başta olmak üzere oldukça geniş bir yelpazede multidisipliner seviyede sürdürölmektedir. Tanımlanmış pek çok kök hücre tipi bulunmasına rağmen mezenkimal kök hücreler (MKH) prelinik araştırmalar, klinik çalışmalar ve yeni araştırma ilaçları başvurularında en yaygın kullanılan kök hücre tipi olarak öne çıkmaktadır (6, 7) ve mevcut immünolojik özellikleri, etik konular açısından görece sorunsuz olması ve uygulamaya bağılı olarak tümör oluşturma riski taşıması nedeniyle insanlarda kullanıma en uygun kök hücre tipi olarak nitelendirilmektedir (8, 9). Kemik iliğı ve adipoz doku, insanlarda majör MKH kaynağı olarak kabul edilmesine rağmen bu dokular içerisindeki miktarları tüm çekirdekli hücrelerin yalnızca %0,001-3'lük kısmını oluşturmaktadır (10-12). Optimum terapötik etki için ise milyonlarca MKH gerektiğinden, araştırmacılar olası yeni MKH kaynaklarını saptamaya çalışmaktadır. Bu doktora tezinin ilk aşamasında, kemik iliğı naklinde kullanılan ve sonrasında tıbbi atık olarak uzaklaştırılan filtre ve torba sistemlerinin MKH kaynağı olarak uygunluğu araştırılmıştır.

Günümüzde hücrelerin doğrudan kullanımı/uygulanması yerine, hücreler tarafından üretilen, ortama salgılanan biyoaktif yapıların uygulanması, hücre içermeyen tedavi (*cell-free therapy*) olarak adlandırılmakta ve MKH tabanlı araştırmalarda yenilikçi ve daha güvenli bir yaklaşımı oluşturmaktadır (13-15). Bu kavram içerisinde ortaya çıkmış, *in vitro* hücre kültürü çalışmaları sırasında MKH tarafından üretilen ekstraselüler matriks (EM) yapıları deselülerizasyon adı verilen güncel doku mühendisliğı teknikleri ile izole edilebilmekte, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda etkileri incelenmektedir. MKH kaynaklı deselülerize edilmiş EM (MKH-dEM) kültür yüzeyi olarak kullanıldığında niş yapısına benzer bir ortam oluşturarak, üzerine ekilen hücrelerin neredeyse tüm hücresel olaylarında (hücre adhezyonu, büyümesi, çoğalması, farklılaşması, fenotipik özelliklerinin değişimi ve ölümü) aktif görev almakta ve olumlu yönde desteklemektedir (16-18). EM üretimi

ve deselülerizasyon işlemi için literatürde farklı yöntemler kullanılmakta ancak izolasyon etkinliği açısından yeterli değerlendirme çalışması bulunmamaktadır (19-24). Ayrıca MKH-dEM protein içeriğini sorgulayan çalışmalar sınırlı olduğundan, *in vitro* ve *in vivo* seviyedeki çalışmalardan elde edilen sonuçların hangi proteinlerden kaynaklandığı henüz tam olarak bilinmemektedir (25). Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasının ikinci aşamasında EM üretimi ve deselülerizasyonu için uygun yöntemler araştırılmış ve proteomik teknikler kullanılarak MKH-dEM protein kompozisyonu aydınlatılmıştır.



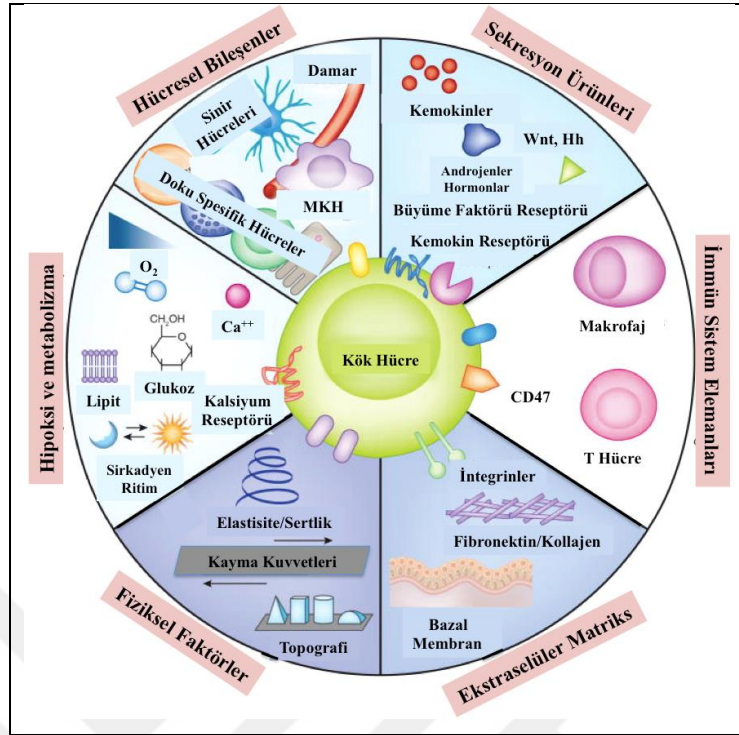
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kök Hücre Tipleri ve Mezenkimal Kök Hücreler

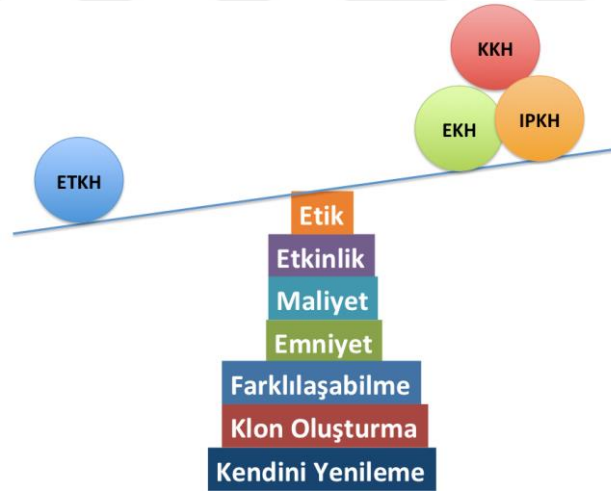
Kök hücre için doğrudan tek bir tanım yapılmamakla birlikte “bir grup spesifik özelliklere sahip hücreler” olarak açıklanmaktadırlar. Bu “spesifik özellikler” literatürdeki bilgiler doğrultusunda, kendini yenileme, klon oluşturarak çoğalma ve başka bir hücre tipine farklılaşma kapasitesine sahip olmaktır (26, 27). Kök hücreler genel olarak dört sınıfa ayrılmaktadır: 1- Embriyonik kök hücreler (EKH), 2- İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (İPKH), 3- Kanser kök hücreleri (KKH) ve 4- Erişkin tip kök hücreleri’dir (ETKH) (28). Rejeneratif tıp açısından değerlendirildiğinde, her kök hücre tipinin birbirine göre avantajlı ve dezavantajlı olduğu noktalar bulunmaktadır. Örneğin, EKH tüm somatik hücrelere farklılaşabilme özelliği nedeniyle yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli bir yere sahiptir (29) ancak etik düzenlemeler, ve belki de en önemli problem olan uygulamaya bağlı olarak teratom gelişimi nedeniyle insan EKH hatlarının oluşturulması ve kullanımı konusunda önemli tartışmalar ve sınırlamalar mevcuttur (30). Bu problemleri çözmek adına “*geliştirilen*” İPKH ise somatik hücrelerin DNA, RNA ve protein tabanlı yöntemlerle kök hücre özelliği kazandırılması ile oluşturulmuştur (31, 32). Ancak İPKH ve EKH hücresel özellikler açısından özdeş olmayıp, sadece benzer özelliklere sahiptir (33). Ayrıca İPKH teknolojisi yaklaşık 10 yılı tamamlamış olmasına rağmen hala oldukça pahalıdır (34, 35) ve klinik amaçla kullanımı yüksek kalite standartları gerektirdiğinden uygulamaları oldukça sınırlıdır (36, 37). İPKH tedavi amaçlı olarak günümüzde sadece tek bir hastalık için (*yaşa bağlı makula dejenerasyonu*) tek bir hastada denenmiştir (38) ancak gelecekte kişiselleştirilmiş tedavi (*personalized/precision medicine*) konseptinde anahtar oyuncu olma olasılığı oldukça yüksektir (39). KKH ise tümör başlatma ve idame özelliği bulunduğu düşünülen patolojik hücrelerdir (40). *In vivo* ve *in vitro* çalışmalardan elde edilen bilgiler, KKH’in tümör hiyerarşisinde en üst noktada bulunduğunu göstermektedir (41). Bu sonuçtan yola çıkarak, kanser mekanizmasının aydınlatılması ve olası yeni terapötik hedeflerin saptanması amacıyla yürütülen araştırmalarda KKH kullanılmaktadır (42, 43).

ETKH ise postnatal dönem (doğum sonrası) boyunca doku homeostaz görevinden sorumlu, doku bünyesinde üç boyutlu dinamik ve spesifik mikroalanlarda (niş) bulunan hücrelerdir (44). Niş yapısı genel hatları ile dokular arasında benzer özelliklere sahiptir ve bünyesinde sessiz veya aktif durumda olan ETKH alt populasyonları mevcuttur. Niş içerisindeki hücre-hücre etkileşimleri, membrana bağlı ve ortama salınan biyoaktif faktörler, kemokinler, immün sistem elemanları, ekstraselüler matriks (EM) proteinleri, spesifik fizikokimyasal özellikler (örneğin biçim, sertlik, kan akış hızı, pH, pO₂) doğrultusunda ETKH, dormant (sessiz evre, G₀) ve/veya mitotik olarak aktif (G_M) evreye geçerek asimetrik ve simetrik bölünmeler ile kök hücre havuzunu idame ettirmekte ya da dokunun ihtiyacı olan hücre tipini oluşturmaktadır (45-49) (Şekil 2.1). Hücrenin köklülük ve farklılaşma eksenindeki fizyolojik davranışları yanında, patolojik eksenindeki davranışlarının da niş elemanları ile kontrol edildiğini gösteren önemli çalışmalar mevcuttur (45, 50, 51). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, kanser ve yaşlanmanın temel nedeninin, niş yapısında meydana gelen değişiklikler ve/veya bozukluklar olduğu savını güçlendirmektedir. Kanser ve yaşlanma, günümüz bilim insanlarının cevap aradığı, ilaç araştırma-geliştirme çalışmalarında en fazla bütçenin ayrıldığı konular olma özelliğini sürdürmektedir (44, 52-54). Niş yapısı tam anlamıyla anlaşıldığı zaman, henüz yanıtlanamamış fizyolojik ve patolojik mekanizmalar ile ilgili soruların ve kök hücre davranışlarının cevaplanacağı düşünülmektedir. Bu nedenlerden dolayı niş yapısının *in vitro* kültür ortamında modelinin oluşturulması ve kompozisyonunun aydınlatılması oldukça önemlidir.

ETKH'in kendini yenileme kapasitesi (düşük telomeraz aktivitesi) ve farklılaşma özellikleri (multipotent, bipotent veya unipotent) EKH ve İPKH'ye kıyasla sınırlı olmasına rağmen, izolasyon ve kullanımına ilişkin etik problemlerin, uygulamaya bağlı immünolojik sorunların ve teratom oluşturma riskinin çok daha az olmasından dolayı klinikte kullanıma en uygun kök hücre tipidir (55, 56) (Şekil 2.2). Beyin, meme bezi, iskelet kası, kalp, kemik iliği, diş, cilt dokusu, ince bağırsak, karaciğer, mide yapısında farklı ETKH tipleri tanımlanmış olmakla birlikte bağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (MKH) *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda en çok kullanılan kök hücrelerdir (57-59).



Şekil 2.1. Niş yapısının ana bileşenlerinin şematik gösterimi (60).



Şekil 2.2. Kök hücre tiplerinin “kök hücre” ve “uygulanabilirlik” özellikleri açısından kıyaslanmasının şematik gösterimi.

MKH ilk kez 1970’li yıllarda hematopoetik sistem merkezi olarak kabul edilen kemik iliğinden (Kİ) izole edilmiş ve hematopoetik kökenden olmayan, işi biçimli ve kültür kabında fibroblastoid koloni oluşturabilen hücreler olarak tanımlanmıştır (61). Bu özelliklerden dolayı Friedenstein ve ark. (62) bu hücreleri *colony forming unit-fibroblasts* (CFU-Fs) olarak adlandırmıştır. CFU-Fs hakkında ilk çalışmalarda heterotropik nakiller ile osteojenik farklılaşma özelliği, takip eden

çalışmalarda ise adipojenik ve kondrojenik farklılaşma özelliği de gösterilmiştir (63). Caplan (64) elde edilen sonuçlara göre hücrelerin farklılaşma potansiyellerini temel almış ve MKH olarak adlandırılmasını önermiştir. Caplan yayınında MKH'in tanımını, "kemik ve kıkırdak dokusunun oluşumundan ve postnatal yaşam boyunca idamesinden sorumlu (tamir ve yeniden yapımı), pek çok iç ve dış faktör uyaran ile mezodermal kökenden olan hücelere (osteoblast, kondroblast, fibroblast, myoblast ve adiposit) farklılaşabilen hücelere" olarak açıklamıştır (64).

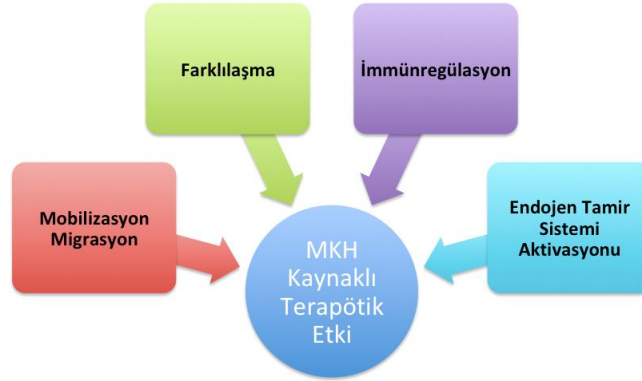
MKH, Kİ ve adipoz doku (AD) başta olmak üzere dermis, dış dokuları, periferik kan, sinoviyal dokular, fetal dokular, amniyon sıvısı, plasenta ve göbek kordonu ve kordon kanından izole edilebilmektedir (10, 65-73). Tanımlanmış pek çok doku kaynağı olmasına rağmen AD popülasyonu dışında diğer dokularda oldukça düşük miktarda bulunmaktadır (10, 74). Ayrıca MKH popülasyonu doku tipi, yaş, cinsiyet, sağlık durumu ve izolasyon işlemine göre farklılık göstermektedir (75-80).

MKH ilk keşfedildiği tarihten itibaren otuz yıl boyunca pek çok araştırmaya konu olmuş olsa da, karakterizasyonuna ilişkin evrensel kriterlerin tanımlanması yakın zaman içinde gerçekleşmiştir (81). 2006 yılında, Uluslararası Hücresel Tedavi Derneęi (*The International Society for Cellular Therapy, ISCT*) bu duruma açıklık getirmek üzere yayınladığı bildiride; izolasyon yöntemi ve izole edildiği dokudan bağımsız olarak minimum MKH özelliklerini 1- *Plastiğe yapışarak çoğalmak*, 2- *Özgöl stromal antijenlerine sahip olmak* (CD105, CD73 ve CD90 için pozitif; CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA-DR için negatif) ve 3- *İn vitro kùltür koşullarında osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmak* olarak tanımlamıştır (82). Bu özelliklere ek olarak MKH'nin daha farklı antijenlere (örneğin Stro-I, CD146, CD271) (83-85) ve daha geniş farklılaşma potansiyeline (örneğin nörojenik, epiteliojenik, hepatojenik, retinojenik, kardiyojenik ve endotelyal) sahip olduğuna ilişkin çalışmalar mevcuttur (86-92). Sadece 2012 yılında 20.000'den fazla yayında MKH kullanılmış, klinik çalışmalar kapsamında ise 2016 yılı itibarı ile yaklaşık 500 klinik çalışmada, 2000'den fazla hastaya MKH uygulanmıştır (93, 94). MKH rejeneratif tıp amacıyla en yaygın kullanılan ETKH'dir.

In vitro ve *in vivo* çalışmalarda bu kadar sık kullanılmalarının asıl nedeni fizyolojik ve fizyopatolojik olaylarda orkestra şefi gibi görev almaları ve süreci yönetmeleridir. Caplan ve Correa (95), MKH'nin, adeta bir eczane gibi davranarak mevcut sinyal tipine göre aktive olduğunu ve bulunduğu nişten çıkarak biyoaktif ve terapötik faktörleri salgılayarak immünregülasyon ve rejenerasyon sürecini başlattığını ve module ettiğini bildirmiştir.

2.2. MKH Tabanlı Tedavi ve Ekstraselüler Matrikse Bakış

MKH uygulamaları geniş yelpazede farklı hastalık modellerini (kemik, kırık, otoimmün, nörolojik, kardiyovasküler, genetik hastalıklar ve kanser) kapsamaktadır (94, 96-100) ve prelinik ve klinik seviyede uygulamaları mevcuttur (94, 101, 102). Elde edilen terapötik sonuçlara göre MKH; 1- *Mobilize olma ve migrasyon özellikleri ile hasar bölgesine erişerek* (103), 2- *Hasar bölgesinde hasarlı hücre tipine farklılaşarak* (104-106), 3- *İmmünolojik reaksiyonları modüle ederek* (107-109) ve 4- *Endojen tamir sistemini de aktive edebilen hücre salgıları ile tedavi sürecini hızlandırarak* (110-113) etki etmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. MKH kaynaklı terapötik etkinin şematik gösterimi.

Ancak elde edilen olumlu sonuçlara karşın henüz tam olarak cevaplanmayan bazı sorular bulunmaktadır. 1) *Gerekli olan MKH dozu ne olmalıdır?* Kemik iliği bünyesindeki çekirdekli hücrelerin %0,01 – 0,001 kadarı MKH iken bu değer adipoz doku için yalnızca %3'e kadar çıkabilmektedir (10-12). Ancak istenilen terapötik etki için milyonlarca hücre gereklidir (114-116). Bu durum da *ex vivo* hücre kültürü gereksinimini doğurmaktadır. Hücre kültürü sürecinde (i) kültür yöntemi (*örneğin*

statik veya dinamik), (ii) kültür ortamı içeriği (örneğin *xeno-free* veya *serum-free*) ve (iii) kültür koşulları terapötik etkiyi etkileyebileceğinden dikkatlice optimize edilmesi gerekmektedir (117-125). 2) MKH uygulaması ne zaman (örneğin hasar anında, derhal veya ileri dönemde)? Nasıl (örneğin sistemik veya lokal)? ve Ne sıklıkla (örneğin tek veya tekrarlayan doz şeklinde) yapılmalıdır? Bu sorulara cevap vermek mevcut bilgilerle mümkün değildir. Hem zamandan bağımsız, hem de hasar tipine göre farklı zamanlarda yapılan uygulamalarda gözlenen terapötik etkiye ilişkin olumlu sonuçlar literatürde bulunmaktadır (126-131). Uygulama yöntemine bağlı olarak sistemik uygulamada hedef dışı organlarda hücre tutunumu, embolizasyon ve tıkanma; lokal uygulamalarda ise kanama, doku hasarı gerçekleşebilmektedir (132, 133). Bu aşamada yukarıda özetlenen unsurların terapötik sonuçlar için optimize edilmesi oldukça zorlayıcıdır.

Bu durum araştırmacıları, hasar alanına lokal ve/veya sistemik dolaşım yoluyla MKH uygulamak yerine, MKH tarafından salgılanan ürünleri ve parakrin faktörleri uygulamaya yöneltmiştir (134, 135). Bu yeni yaklaşım hücre içermeyen tedavi olarak adlandırılmaktadır ve daha güvenli, daha kolay uygulanabilir ve daha az sorunlu olduğu belirtilmektedir (136, 137). Hatta farklı araştırma grupları tarafından elde edilen olumlu sonuçlar yayınlanmaya başlamıştır (138-143). MKH tarafından ortama salınan biyoaktif ürünler, MKH sekretomu, EM ve hücre adezyon proteinlerini, enzimleri, enzim aktivatör/inhibitörleri, büyüme faktörleri, büyüme faktörü bağlayıcı proteinleri ve miRNA gibi genetik materyalleri içeren oldukça büyük bir havuzdur (144). Kalinina ve ark. (145) tarafından yapılan çalışmaya göre, EM proteinleri MKH sekretomunun en büyük grubunu oluşturmaktadır. Günümüzde MKH kaynaklı sekretomun bütüncül kimliklendirilmesi ve karakterizasyonu henüz tamamlanmamıştır. Olası terapötik etkiden sorumlu faktör veya faktörlerin saptanarak klinik uygulamalardaki başarının artırılması önemli araştırma hedeflerindendir (146). Böylece hasar anında ortama karışık bir kompozisyonu uygulamak ve hedef dışı (*off-target*) etkileri elimine etmeye çalışmak yerine daha etkin ve emniyetli tedavi protokolleri geliştirilebilecektir.

MKH sekretomu genellikle hücre kültürü işlemleri sırasında kültür ortamından elde edilmektedir. Hücre kültürü sırasında MKH ilk önce kültür yüzeyi ile temasa geçip tutunur, sonrasında çoğalmaya ve eş zamanlı olarak biyoaktif faktörleri sentezlemeye başlar (147, 148). MKH'nin kültür yüzeyi ile temasa geçmesi başlıca kollajen, elastin, proteoglikan, hyaluronan ve diğer kollajen dışı matriks glikoproteinlerinden oluşan EM ve adezyon proteinlerinin üretilmesini tetikler (149, 150). Böylece hücrenin idamesi ve çoğalabilmesi için fizyolojik ve biyolojik olarak daha uygun bir ortam yaratılmış olur (151). Hatta bu fonksiyonel proteinler, hücrelerin etrafını adeta bir tabaka gibi sararak, *in vivo* şartlarda izole edildikleri niş yapılarının *in vitro* koşullarda benzerini oluşturmaktadır. Örneğin kemik iliği stromasında bulunan ve nişi oluşturan kollajen I, III, IV, V ve VI, fibronektin, laminin, sindekan, perlekan, biglikan, dekorin ve hyaluronan, kemik iliğinden izole edilmiş MKH tarafından *in vitro* hücre kültürü sürecinde üretilmektedir (19). MKH stroma kökenli hücre olduğundan hem stromayı oluşturan EM proteinlerini üretme, hem de düzenleme özelliğine sahiptir. Bu nedenle MKH, mezenkimal stromal hücre veya stromal kök hücre olarak da adlandırılmaktadır (152). Amable ve ark. (149) kemik iliği, adipoz doku ve göbek kordonu kaynaklı MKH tarafından üretilen EM proteinlerini kıyasladığında derişim, içerik ve matriks metalloproteinaz (MMP) tipleri açısından farklılık olduğunu açıklamıştır. MKH kaynaklı EM (MKH-EM) bileşenleri dinamik özellikte olup, kültür ortamı bileşeni ve şartlarında yapılan değişiklikler ile düzenlenebilmektedir (153). Aslında bu durum hücre içermeyen tedavi konseptinde çok daha yeni bir çalışma hedefini oluşturmakla birlikte MKH kültürü sırasında “hedefli şartlandırma” ile aranan özellikte özel üretim (*tailor-made*) EM profilinin elde edilmesinin önünü açmaktadır (154). Örneğin Mehlhorn ve ark. (155) MKH, TGFB-1 içeren besiyeri varlığında aljinat içerisine enkapsüle ettiklerinde kıkırdak özgül proteinlerden agrekan ve kıkırdak oligomerik matriks protein (COMP), kollajen II ve X ekspresyonlarının arttığını bildirmiştir. Harvey ve ark. (156) ise Notch-I intraselüler domain ile MKH transfekte ettiklerinde EM kompozisyonunda 11 farklı proteinde değişiklik olduğunu göstermiştir. Kim ve Ma (157) ise iki farklı oksijen konsantrasyonunda (hipoksi %2 pO₂ ve normoksi %20 pO₂) MKH kültürü yaptıklarında fibronektin, kollajen I ve IV, vitronektin ve laminin miktarının değiştiğini açıklamıştır. Xu ve ark. (158) ise MKH ile üç boyutlu sferoid

kültür yöntemini kullandıklarında kollajen I, fibronektin ve laminin dahil olmak üzere daha fazla EM proteinin sentezlendiğinin altını çizmiştir. Elde edilen bu sonuçlar araştırmacıları, hayati ve işlevsel proteinleri içeren MKH-EM yapısının üç boyutlu yapıda elde edilmesi ve *in vitro-in vivo* koşullarda etkilerinin araştırılmasına yönlendirmiştir (21, 159).

2.3. MKH-EM İzolasyonu: Deselülerizasyon Yöntemi

Deselülerizasyon, doku ve organ nakli çalışmalarında önemli bir sorun olarak ortaya çıkan, donör sayısındaki yetersizliğe cevap olarak “geliştirilen”, mühendislik ve biyolojik bilimlerin kombinasyonu olan “*doku ve/veya organ benzeri yapıların/kompozisyonların yaratılması, kaybolan fonksiyonların düzeltilmesi ve hasta yaşam kalitesinin artırılması*”na ilişkin yaklaşımları barındıran doku mühendisliği kavramının güncel uygulamasıdır (160, 161). Deselülerizasyon, doku veya organ bünyesindeki hücrelerin uzaklaştırılmasını (aselüler hale getirme), böylece nakil sonrası gelişebilecek immün yanıtı en aza indirmeyi ve üç boyutlu mimariye sahip “doğal” doku iskelelerinin elde edilmesini amaçlamaktadır. Bu özelliklere ilave olarak deselülerize edilmiş yapının fizikokimyasal uygulamalar ile belirli şekillere sokulabilir olması klinikte kullanımının önünü açmaktadır (162, 163). Deselülerizasyon işlemi sonrasında doku iskelesine, alıcıya ait hedef hücre veya hücreler ekilerek, fonksiyonel yapıların oluşturulması sağlanmaktadır. Bu işlem ise reselülerizasyon olarak adlandırılmaktadır (164). Kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, pankreas gibi tüm organ ve adipoz doku, kemik, kıkırdak, aort, küçük ince bağırsak alt mukozası, tendon gibi dokular için etkin deselülerizasyon protokolleri geliştirilmiştir (165-175). Deselülerizasyon yöntemleri genellikle fiziksel, kimyasal ve enzimatik uygulamalardan oluşmaktadır (176, 177).

Tablo 2.1. Deselülerizasyon yöntemleri, kullanılan ajanlar, etki mekanizmaları ve EM üzerine olası etkileri (177).

Yöntem / Kullanılan Ajan	Etki Mekanizması	EM Üzerine Etki
Kimyasal Ajanlar		
Asit ve Bazlar	Sitoplazmik içeriği çözünür hale getirir, nükleik asitleri bozarak proteinleri denatüre eder.	Kollajen, GAG ve büyüme faktörlerine zarar verebilir.
Hipotonik ve	Ozmotik şok ile hücre lizis olur, DNA-	Hücre lizisi efektif

Hipertonik Çözeltiler	protein etkileşimini bozar.	ancak hücre kalıntıları etkin olarak uzaklaşmaz.
Noniyonik Deterjanlar (<i>Triton X-100</i>)	DNA-protein, yağ-yağ ve yağ-protein etkileşimleri bozar ve protein-protein etkileşimlerini daha az etkiler.	Doku tipine bağlı olarak etkinliği değişken, ince dokulardan hücrelerin uzaklaştırılmasında daha etkin, mikomimari bozulabilir, SDS'den daha az efektif.
İyonik Deterjanlar (<i>SDS, Sodyum deoksikolat, Triton X-200</i>)	Hücre ve çekirdek membranlarını çözünür hale getirip, proteinleri denature eder.	Yoğun dokulardan çekirdek bileşenlerini ve sitoplazmik proteinleri efektif olarak uzaklaştırır, mikromimariyi bozar.
Zwitteriyon Deterjanlar (<i>CHAPS, SB-10, SB-16</i>)	Non iyonik ve iyonik deterjanlar ile benzer etkileri gösterir.	İnce dokulardan hücrelerin uzaklaştırılması sırasında yapılara orta derecede zarar verir.
Çözücüler (<i>Alkoller, Aseton, TBP</i>)	Dehidrasyon, solubilizasyon ile hücreleri lizis eder, lipitleri uzaklaştırır, TBP metal kompleksleri oluşturur, protein-protein etkileşimini bozar.	Yoğun dokulardan hücreleri efektif uzaklaştırır, çapraz bağ oluşturup kollajen dahil proteinleri çöktürür.
Biyolojik Ajanlar		
Enzimler (<i>Nükleazlar, Tripsin, Dispaz</i>)	Ribonükleotid ve deoksiribonükleotid zincirini hidroliz eder (nükleazlar). Arg ve Lys'nin C ucundan peptid bağlarını koparır (Tripsin). Fibronektin ve kollajen IV başta olmak üzere spesifik peptitleri parçalar (Dispaz).	Dokudan uzaklaştırılması zor, immün sistemi tetikleyebilir. Uzun süreli inkübasyon ile EM bileşenlerini parçalar.
Şelatlar (<i>EDTA, EGTA</i>)	Metalik iyonlara bağlanarak hücrelerin EM'ye tutunmasını bozar.	Enzimatik yöntemlerle birlikte kullanılır, tek başına kullanımları efektif değildir.
Fiziksel Etkiler ve Diğer Ajanlar		
Sıcaklık Uygulama (Dondurma ve Çözme)	Intraselüler buz kristalleri oluşturarak hücre membranını bozar.	Buz kristalleri EM yapısına zarar verebilir.
Doğrudan kuvvet Uygulama	Dokuda kalan hücreleri patlatarak uzaklaştırır.	EM yapısına zarar verebilir.

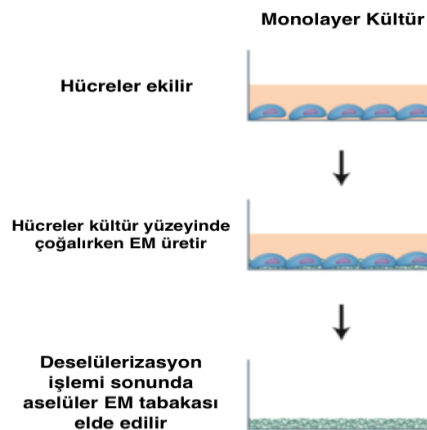
Basınç	Hücrelerin patlatılmasını ve hücresel bileşenlerin uzaklaştırılmasına yardımcı olur.	EM yapısını bozabilir.
Elektroporasyon	Hücre membranını bozar.	EM yapısını bozabilir.
Ajanların Uygulanma Teknikleri		
Perfüzyon	Kimyasal ajan ile dokunun etkileşimini ve hücresel bileşenlerin uzaklaştırılmasını kolaylaştırır.	Perfüzyon kaynaklı basınç EM yapısını bozabilir.
Doku boyunca gradient şeklinde basınç uygulanması	Kimyasal ajan ile dokunun etkileşimini ve hücresel bileşenlerin uzaklaştırılmasını kolaylaştırır.	EM yapısını bozabilir.
Süperkritik Sıvı	Basınç hücreleri patlatır, kimyasal ajan ile dokunun etkileşimini ve hücresel bileşenlerin uzaklaştırılmasını kolaylaştırır.	Süperkritik sıvı kaynaklı basınç EM yapısını bozabilir.
Ajitasyon	Hücreleri lizis edebilir ancak daha yaygın olarak kimyasal ajan ile dokunun etkileşimini ve hücresel bileşenlerin uzaklaştırılmasını kolaylaştırır.	Aşırı ajitasyon veya sonikasyon EM yapısını bozabilir.

In vitro kültür ortamında MKH kaynaklı EM, deselülerizasyon yöntemleri kullanılarak üç boyutlu yapıda elde edilebilmektedir. Bu süreç üç farklı aşamadan oluşmaktadır:

Birinci aşama EM üretimidir. MKH genellikle standart kültür ortamları (DMEM ve FBS) içerisine askorbik asit (c vitamini) eklenerek kollajen ve diğer EM bileşenlerinin üretimi arttırılmaktadır (178-181). Alternatif olarak inert ve polidisperse makromoleküllerin (örneğin *carrageenan*, dekstran sülfat, Ficoll PM 70 ve PM 400) kullanımına ilişkin yeni yayınlar literatüre girmiştir (181-183). Dokuya özgü (örneğin kemik, kıkırdak, adipoz doku gibi) EM üretimi için farklı kültür bileşenlerinin kullanımına ilişkin çalışmalar da mevcuttur (23, 155, 184, 185). Standart hücre kültürü yüzeyleri (*Tissue culture polystyrene* - TCPS) EM üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır ancak çeşitli proteinler ile kültür yüzeylerinde kaplama yapılarak hücrelerin yapışmasını ve çoğalmasını hızlandırma, üretilen EM'nin yüzeyden kopmasını önlemeye yönelik yöntemler vardır. Ancak kültür yüzeyinde yapılan değişiklik ve kaplamaların MKH özellikleri başta olmak üzere ve MKH-EM kompozisyonunu etkilediğinin altı çizilmektedir (186, 187).

İkinci aşama deselülerizasyon aşamasıdır. Doku ve organ deselülerizasyon protokollerine kıyasla *in vitro* ortamdan MKH-dEM eldesi için daha kısa süreli ve hassas yöntemler uygulanmaktadır. En yaygın kullanılan yöntemler NH_4OH ve Triton X-100 içeren çözeltilerinin kullanılmasıdır (19, 20, 22). NH_4OH ve Triton X-100 üç boyutlu yapı tabakasını bozmadan hücre membranını çözülmesini sağlamaktadır (156). Sitoplazmik içeriğin, enzimlerin ve çözelti kalıntılarının uzaklaştırılması için RNase ve DNase içeren/içermeyen PBS ile yıkama işlemleri yapılmaktadır (19, 188-193). Farklı yöntemlerin ve çözeltilerin kullanımına ilişkin (örneğin farklı deterjanların (deoxycholate, SDS) kullanımı, tekrarlı dondurma çözme yöntemi, soğuk-EDTA uygulaması ve distile su ile yıkama) yayınlar da mevcuttur (21, 23, 24, 189, 194). Seçilen yöntemin süre, sıcaklık ve konsantrasyon açısından optimize edilmesi gerekmektedir (189, 195, 196).

Üçüncü aşama ise elde edilen EM yapısının kalite kontrolünün yapılmasıdır. Tercih edilen deselülerizasyon yöntemi hücreleri ortamdan uzaklaştıracak kadar etkili, ancak EM tabakasını, yapısını ve kompozisyonunu bozmayacak ve mümkün olduğunca korunmasını sağlayacak özellikte olmalıdır. Nicel ve nitel yöntemlerle protein içeriğinin gösterilmesi, kalıntı DNA içeriğinin araştırılması ve yapının mikroskopi çalışmaları (ters faz ışık, floresans, atomik veya taramalı elektron) ile değerlendirilmesi bu aşamada *sine qua non* özelliktedir (19-21, 181, 197).



Şekil 2.4. *In vitro* koşullarda EM üretimi ve deselülerizasyon işleminin şematik olarak gösterilmesi (177).

2.4. MKH-dEM Tabanlı Çalışmalar

In vitro koşullarda MKH kaynaklı deselülerize edilmiş EM (MKH-dEM), bünyesinde fonksiyonel proteinlerin olduğu ve yapılarının korunduğunun gösterilmesiyle birlikte hücrelerin MKH-dEM üzerinde ne yapacağını merak eden araştırmacılar, çalışmalarını bu yöne doğru kaydırmıştır. Bilindiği üzere niş bünyesinde MKH, diğer hücreler ve çözünür faktörler varlığında EM proteinleri ile üç boyutlu mimaride etkileşim içinde bulunmakta ve bu hücre-matriks etkileşimi hücre büyümesi, adezyonu, farklılaşması, ölümü başta olmak üzere pek çok olayı ve hücrenin fenotipik özelliklerini etkilemektedir (16-18). Bu soruya cevap vermek amacıyla, MKH-dEM kültür yüzeyi olarak kullanılıp ve üzerine MKH ekilerek kök hücre özelliklerinin nasıl değiştiği farklı araştırma grupları tarafından incelenmiştir.

Yapılan ilk yayınlardan olan Chen ve ark. tarafından yapılan çalışmada, fare kemik iliğinden izole edilen MKH kaynaklı EM, askorbik asit (50 μ M) varlığında üretilmiş, Triton X-100 ve NH_4OH ile deselülerize edilmiştir. Elde edilen MKH-dECM yapısının KI'ne benzer biçimde ve fibriller özellikte (25-50 nm) olduğu gözlenmiştir. Üzerine MKH ekildiğinde ise TCPS, fibronektin ve kollajen I kaplı kültür yüzeylerine kıyasla hücre çoğalması, koloni oluşumu, osteojenik ve adipojenik farklılaşmanın arttığı; MKH-dEM ile *in vitro* koşullarda kök hücre özelliklerinin idame ettirildiği bildirilmiştir (19). Hoch ve ark. ise MKH-dEM üzerine MKH ekilip ortamdan osteojenik kültür ortamının uzaklaştırılmasına rağmen osteojenik farklılaşmanın korunduğunu ve proanjiyojenik faktörlerin arttığını bildirmiştir. Bu çalışmada MKH ile birlikte MKH-dEM yapısı (MKH+MKH-dEM) farelere cilt altına uygulandığında artmış kemik yapısı, damar yoğunluğu ve hücre canlılığı görülmüştür (192). Elde edilen benzer sonuçlarla, MKH-dEM'nin üzerine ekilen MKH davranışını hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda pozitif yönde etkilediği tespit edilmiştir (20).

İlginç bir şekilde, MKH-dEM hücreler üzerinde koruyucu etkiye de sahiptir. Liu ve ark. (193) göbek kordonu kaynaklı MKH-dEM izole edip, üzerine tekrar MKH ektiklerinde hücrelerarası reaktif oksijen türlerinin azaldığı, antioksidan enzimlerin arttığı ve oksidatif hasara karşı direncin arttığı tespit etmiştir. Rakien ve

ark. (180) ise MKH-dEM ile CELLstart™ ve TCPS yüzeyleri kıyaslamış, serum içermeyen kültür ortamında bile MKH-dEM varlığında MKH kalitesinin korunmasının sağlandığını açıklamıştır. Benzer şekilde Kim ve Ma (157), MKH-dEM'in stres altında hücreleri ölümden koruyabileceğini bildirmiştir. MKH-dEM niş benzeri ortamı oluşturma yanında çözünür faktörlerin bağlandığı ve tutunduğu bir rezervuar gibi de görev almaktadır. Hu ve ark. (198) MKH-dEM'in adsorpsiyon kapasiteleri hakkında çalışmış ve melatonin ile inkübe ettiklerinde MKH-dEM tarafından tutulabildiğini, böylece üzerine MKH ekildiğinde daha fazla hücre çoğalması ve kalsiyum depozisyonunun sağlandığını, buna karşılık MMP ekspresyonlarının azaldığını gözlemiştir. Bu sonuçlarla MKH-dEM'in MKH tabanlı rejeneratif tedavi için tamamen yeni bir kapı açmış olduğu söylenebilmektedir.

Literatürdeki MKH-dEM ve MKH araştırmalarının çoğunluğu osteojenik farklılaşma ile ilgilidir. Hoshiba ve ark. (199) (i) osteojenik farklılaşma öncesi, (ii) erken farklılaşma dönemi ve (iii) geç dönem kültürlerinden MKH-dEM izole edip karşılaştırdıklarında hem protein içerikleri, hem de adezyon, proliferasyon ve farklılaşma üzerine farklı etkileri olduğunu bildirmiştir. Zeitouni ve ark. (185) ise osteoindüktif özellikte selektif PPAR-gamma antagonisti kullanarak elde ettikleri MKH-dEM üzerine tekrar MKH ekerek oluşturdukları yapıyı kemik hasarlarında incelediklerinde hızlanmış kemik iyileşmesi saptamıştır. Deutsch ve Guldborg (21) ise amniyon sıvısı ve Kİ kaynaklı MKH'lerden osteojenik farklılaşma sonrası MKH-dEM izole edildiğinde, kalsiyum üretiminin Kİ kaynaklı MKH-dEM üzerinde daha fazla olduğunu saptamıştır. *In vivo* kemik hasarı geliştirildiğinde ise en hızlı iyileşme amniyon sıvısı kaynaklı MKH-dEM ile gözlenmiştir. Pattabhi ve ark. (23) ise farklılaşmamış ve osteojenik farklılaştırılmış MKH ile iki düz kas hücre hattından elde edilen dEM etkilerini kıyasladığında, farklılaşmamış MKH-dEM'in köklülük özelliklerinin korunması, hücre motilitesinin ve çoğalmasının artmasında, osteojenik farklılaştırılmış MKH-dEM'in ise osteojenik farklılaşma ve biyomineralizasyonda daha etkili olduğunu vurgulamıştır. Düz kas hücreleri kaynaklı dEM'lerin ise kas farklılaşmasını indükleyici özelliği gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, MKH-dEM'in osteojenik farklılaşma ortamı kullanılarak *in vitro* ve *in vivo* şartlarda *osteogenesis* amacıyla kullanılabileceği savını desteklemektedir. Ancak hangi doku

kaynağının MKH-dEM üretimi ve hedefli özgül terapötik etki için en iyi olduğunun araştırılması gerekmektedir.

EM kompozisyonu ve yapısının yaş ile değiştiği bilinmektedir (200). Bu bilgiden yola çıkarak MKH-dEM kaynaklı terapötik etkinin de yaş ile değişip değişmediğini sorgulayan Sun ve ark. (22) yaşlı ve genç fare kaynaklı MKH-dEM yapılarını *in vitro* ve *in vivo* şartlarda kıyasladıklarında hücre çoğalması ve osteojenik farklılaşmanın genç fare kaynaklı MKH-dEM ile daha iyi olduğunu bildirmiştir. Bu sonuç hem MKH-dEM eldesi için kullanılan hücre kalitesinin önemini hem de yaşlanmanın etkisini göstermektedir.

MKH-dEM'in kültür yüzeyi olarak kullanıldığı çalışmalardan farklı olarak değişik polimerik materyallerle kompozit halinde kullanıma ilişkin çalışmalar da mevcuttur. Örneğin Harvestine ve ark. (201) biyoaktif cam ve poli(laktat-ko-glikolat) kullanarak geliştirdikleri kompozit doku iskelesi yüzeyini MKH-dEM ile kaplamıştır. Böylece geliştirilen yapı ile birlikte hücre ölümünün azaldığı, metabolik aktivitenin arttığı, osteogenesis ve doku büyümesinin ilerlediği tespit edilmiştir. Thibault ve ark. (202) ise poli(e-kaprolakton) fiber ağ şeklindeki iskelelerini MKH-dEM ile kaplandığında hücre çoğalmasının arttığını, osteojenik farklılaşmayı indükleyen kimyasallar olmaksızın osteojenik farklılaşmanın olduğunu gözlemiştir.

Fizyolojik olaylardan farklı olarak patolojik olaylarda da (tümör progresyonu ve metastaz gibi) MKH-dEM'in önemli etkisinin olabileceğine ilişkin güncel çalışmalar literatürde yer almaya başlamıştır. Uzun yıllardır kanser ile EM ve MKH arasındaki ilişki tartışılmakta, farklı ekipler tarafından değişik hipotezler ortaya atılmaktadır (203-206). Örneğin Burns ve ark. (188) hipoksik koşullarda tümorojenik MKH hatlarından elde edilen EM yapısının daha yoğun ve daha kompleks olduğunu, bileşiminde kollajen I içermediğini ancak anjiyojenik proteinleri barındırdığını, *in vivo* şartlarda ise tümorojenik MKH-dEM yeni damar oluşumunu (*neovascularization*) tetiklediğini bildirmiştir.

Son yıllarda MKH-dEM niş benzeri yapıyı (fiziksel ve biyolojik özellikler) oluşturduğunun gözlenmesi ile birlikte hematopoetik kök hücreler (HKH) ve kemik iliği nişini hedefleyen güncel çalışmalar da yapılmaktadır. *In vivo* şartlarda niş bünyesinde EM proteinleri ve hücrelerin birbirleriyle üç boyutlu mimaride etkileşime girdiği, MKH tarafından hematopoetik nişin regüle edildiği ve hematopoezi desteklediği bilinmektedir (51, 207). Araştırmacılar kemik iliğini mimik etmek ve *in vitro* koşullarda üzerinde çalışılabilir bir sistem oluşturabilmek için çalışmaktadır. Lai ve ark. (189) osteojenik farklılaştırılmış MKH'den dEM izole ederek, üzerine MKH ve HKH ektiklerinde hücrelerin kolokelize olduğu tespit etmiştir. Prewitz ve ark. (181) ise MKH-dEM'in HKH çoğalması, idamesini sağladığı bildirmiştir. Bu çalışmalar, MKH-dEM yapısının hücresel fonksiyonlar üzerindeki etkilerini (Şekil 2.5.) cevaplamaya yönelik gerçekleştirilmiştir. Ancak gözlenen etkilerin hangi protein veya proteinler ile sağlandığı henüz bilinmemektedir. Bu nedenle preklini seviyedeki çalışmalardan elde edilen sonuçların klinikte kullanılabilir hale gelmesi için MKH-dEM kompozisyonundaki protein yapısının aydınlatılması oldukça önemlidir.



Şekil 2.5. MKH-dEM kullanımına bağlı olarak gözlenen etkilerin şematik gösterimi (16).

Elde edilen bilgilerden yola çıkarak bu doktora tezinde *ilk aşamada*, Kİ naklinde kullanılan, donörden izole edilen Kİ aspiratının hastaya uygulanmadan önce içerisinde toplandığı ve filtrelendiği, nakil sonrasında ise tıbbi atık olarak

uzaklaştırılan filtre ve torba sistemleri MKH izolasyonu amacıyla değerlendirilmiştir. ***İkinci aşamada*** ise hem kök hücre nişinin temel bileşeni olan hem de hücresiz tedavi konsepti ile önem kazanan MKH-dEM üretimi ve izole edilmesi için uygun kültür ortamları ve deselülerizasyon yöntemleri araştırılmıştır. ***Üçüncü aşamada*** ise protein bileşimini tespit etmek üzere proteomik tekniklerle MKH-dEM kompozisyonu aydınlatılmış, niş yapısını oluşturan ve hücre davranışlarını regüle eden proteinler tespit edilmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması kapsamında yürütülen çalışmalar, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun izni (Karar No: GO 16/480-53) ile gerçekleştirilmiştir. Hacettepe Üniversitesi, Çocuk Hastanesi Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi'nde gerçekleştirilen nakillerde kullanılmış ve sonrasında tıbbi atık olarak nitelendirilen filtre ve torba sistemleri (n=5) bu çalışma kapsamında hücre izolasyonu amacıyla değerlendirilmiştir. Çalışmalar, Hacettepe Üniversitesi, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi (PEDISTEM), Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı, Metabolizma Araştırma Laboratuvarı ve Bilkent Üniversitesi, Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM) ve Koç Üniversitesi, Hücre Biyolojisi ve Proteomik Laboratuvarı bünyesindeki altyapı ve cihazlar kullanılarak, Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı, Kök Hücre Bilimleri Doktora Programı kapsamında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kemik İliği Nakli Sırasında Kullanılan Filtre ve Torba Sistemlerine Takılmış Olan Hücrelerin İzolasyonu

Hacettepe Üniversitesi, Çocuk Hastanesi, Pediatrik Hematoloji Bölümü ve Kemik İliği Nakil Ünitesi'nde takip edilen hastalara, sağlıklı donörlerden yapılan kemik iliği nakli sırasında kullanılan filtre ve torba sistemleri (n=5) aynı gün içerisinde PEDISTEM hücre kültürü laboratuvarına getirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kemik iliği nakli sonrasında hücre kültür laboratuvarına getirilen, izolasyon amacıyla kullanılan torba ve filtre sisteminin fotoğrafı.

Biyogüvenlik kabini içerisinde 50 mL'lik enjektör yardımı ile hücre izolasyon çözeltisi (Tablo 3.1) sisteme torba ucundan aktarılmış, bastırma ve çalkalama işlemi uygulanarak sistem içerisinde takılmış hücreler 50 mL'lik Falcon (BD Biosciences, ABD) tüplere bölünmüştür. Bu işlem filtre ve torba sisteminde kırmızı renk tamamen açılıncaya dek uygulanmıştır. Karışım içerisindeki eritrosit yükünden kurtulmak için 50 mL'lik Falcon tüpler 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatör (Thermo Electron Corporation, Almanya) içerisine yerleştirilmiş ve 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süreci sonunda tüpler 453 g hızda 10 dakika süreyle oda sıcaklığında frensiz santrifüj edilerek (Eppendorf 5810/Almanya) hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrası tüplerde pellet üzerinde kalan üst sıvı (supernatant) uzaklaştırılmış ve pelletler tek bir tüpte toplanmıştır. Sonrasında PBS (Sigma Aldrich, ABD) içerisinde pipet ile pelletler resüspande edilip karıştırılmış ve 453 g hızda 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. İzole edilen canlı hücre miktarı Turk çözeltisi ve hemositometre kullanılarak ters faz ışık mikroskobu (Olympus/Japonya) kullanılarak saptanmıştır. Canlı hücre miktarı hesaplandıktan sonra hücre kültürü çalışmasına geçilmiştir.

Tablo 3.1. Sistem bünyesine takılan hücrelerin izole edilmesi ve eritrosit yükünün azaltılması için kullanılan yıkama çözeltisi kompozisyonu. Çözelti bünyesindeki kimyasallar tamamen çözündükten sonra 0,22 µm'lik filtre sisteminden (EMD Millipore, ABD) geçirilerek steril hale getirilmiş ve sonrasında hücre izolasyonu için kullanılmıştır.

EDTA	0,037 g
KHCO ₃	1 g
NH ₄ Cl	8,26 g
Distile su	1 L

3.2. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

%10 FBS (Gibco, ABD), %1 Penisilin-Streptomisin (Biowest, Fransa), 2 mM L-Glutamin (Gibco, ABD) ve DMEM-LG (Gibco, ABD) içeren besiyeri hazırlanmış ve 0,22 µm'lik filtreden (EMD Millipore, ABD) süzülerek steril hale getirilmiştir. İzole edilen hücreler TCPS özellikte T-75 kültür kaplarına besiyeri ile pasaj 0 olarak 2x10⁷ aşmayacak konsantrasyonda ekilmiş ve 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır. Ekilmeyen hücreler, DMSO (Santa Cruz, ABD) eklenerek hazırlanan

dondurma çözeltisi (%70 DMEM-LG + %20 FBS + %10 DMSO) ile cryovial (SPL, Kore) içerisine aktarılmıştır. Cryovialler Mr. Frosty (Thermo Fisher Scientific, ABD) içerisinde bir gece -80°C'lik dondurucuda (Sanyo, Japonya) tutulduktan sonra uzun süre saklanmak üzere -196°C'lik sıvı azot tankına yerleştirilmiştir. Hücre morfolojisi ve yüzeye yapışma durumunun tespiti için kültür kapları gün aşırı süreyle ters faz ışık mikroskobu (Olympus, Japonya) kullanılarak takip edilmiştir. Hücre kültürü işlemi başlatıldıktan sonra ilk bir hafta içerisinde MKH ile karakterize olan ve plastiğe yapışan fibroblast görünümlü hücrelerin tespit edilmesi ile üç günde bir defa besiyeri yenilenmiştir. %70-80 yoğunluğa ulaşmalarının ardından %0,25'lik Tripsin-EDTA (Gibco, ABD) kullanılarak hücreler yüzeyden kaldırılmış ve dondurma çözeltisi (%90 besiyeri + %10 DMSO) kullanılarak hücreler dondurulmuştur. Pasajlama işlemi sırasında hücreler 3000-5000 hücre/cm² olacak şekilde yeni kültür kaplarına ekilerek kültür süreci devam ettirilmiştir.

3.3. Mikoplazma Kontaminasyon Kontrolü

Pasaj 0 hücre kültürlerinde kültür kabının yüzeyine yapışan hücrelerin gözlenmesinin ardından, değiştirilmek üzere aspire edilen besiyerinde EZ-PCR™ Mycoplasma Test Kiti (BI, İsrail) kullanılarak mikoplazma kontaminasyon kontrolü yapılmıştır. Deney boyunca buz üzerinde çalışılmıştır. Besiyeri 1,5 mL'lik eppendorf tüplere (Sigma Aldrich, ABD) aktararak 250 g hızda 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Takiben üst sıvı aspire edildikten sonra yeni 1,5 mL'lik eppendorf tüplere aktarılmış ve 16160 g hızda 10 dakika süreyle yeniden santrifüj (Microfuge 16, Beckman Coulter, ABD) edilmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırılmış ve çöken kısım üzerine kit içerisinde bulunan tampon çözeltisinden 25 µl eklenerek pipetleme işlemi yapılmıştır. Bu işlem sonunda içerik 0,2 µl'lik PCR tüpüne aktarılmış ve PCR cihazında (Applied Biosystem-9700, ABD) 95°C'de 3 dakika süreyle inkübasyon yapılmıştır. Tablo 3.2.'de gösterilen karışım, inkübasyon işlemi sonunda örnekler (n=5) ve kontroller (pozitif ve negatif) için 0,2 µl'lik yeni PCR tüplerinde hazırlanmıştır.

Tablo 3.2. PCR reaksiyonu için hazırlanan negatif kontrol, pozitif kontrol ve örnek formülasyonu.

	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	Örnek
ddH ₂ O	20 µl	19 µl	17,5 µl
Kit Karışımı	5 µl	5 µl	5 µl
Test Örneği	-	1 µl	2,5 µl

Karışımların buz üzerinde hazırlanmasının ardından, PCR cihazına yerleştirilerek Tablo 3.3'te belirtilen reaksiyon sıcaklık değerleri ve süreleri uygulanmıştır.

Tablo 3.3. PCR reaksiyonu için uygulanan sıcaklık değerleri ve süreleri

94°C	30 saniye	
94 °C	30 saniye	35 döngü
60 °C	120 saniye	
72 °C	60 saniye	
94 °C	30 saniye	
60 °C	120 saniye	
72 °C	5 dakika	

İnkübasyon süreci sonunda örnekler, 1 µl GelRED™ (Biotium, ABD) eklenerek hazırlanmış %2'lik agaroz jele 10 µl hacimde yüklenmiş ve 120 Volt ve 30 dakika süreyle elektroforez işlemi (MultiSUB Horizontal Gel Systems, Cleaver Scientific, İngiltere) uygulanmıştır. Sonrasında jel görüntüleme sisteminde (FluorChem F3 System, Protein Simple, ABD) jelin fotoğrafı çekilerek değerlendirme yapılmıştır.

3.4. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyon Çalışmaları

Pasaj 3'te hücrelerin MKH karakterizasyonu için temel kriter olan spesifik antijen ifadeleri araştırılmış ve in vitro koşullarda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma deneyleri yapılmıştır.

3.4.1. Akım Sitometri Cihazı ile Yüzey Ekspresyonlarının Saptanması

MKH karakterizasyonu amacıyla pasaj 3 MKH'ler kültür yüzeyinden %0,25'lik Tripsin/EDTA kullanılarak kaldırıldıktan sonra spesifik antijen ifadeleri

BD Accuri™ C6 (ABD) akım sitometri cihazında CD90 FITC, CD34 APC, CD105 PE, CD73 PE, CD45 APC, CD29 APC ve HLA-DR PE antikoru kullanılarak araştırılmıştır (Tablo 3.4). Tüp içerisine 5 µl hacimde pipetlenen antikoru üzerine 100.000 hücre/100 µl'lik süspansiyon eklenerek 5 saniye süreyle vortekslenmiş (MX-S Vortex, Dragon Lab, Çin) ve 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tüpler 290 g hızda 5 dakika süreyle santrifüjlenerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Vorteksleme işlemi tekrarlanıp tüp içerisine 300 µl hacimde Cell Wash (BD Biosciences, ABD) çözeltisi eklenmiştir. Tüpler gece boyu +4°C'de karanlıkta saklanmış ve sonraki gün BD Sampler Analysis (BD Biosciences, ABD) programı kullanılarak antijen ifadeleri araştırılmıştır.

Tablo 3.4. Akım sitometri çalışmasında kullanılan antikora ilişkin bilgiler

Antikor	Fluorokrom Cinsi	Firma	Katalog Numarası
CD90	FITC	Biologend (ABD)	328108
CD34	APC	Biologend (ABD)	343510
CD105	PE	eBioscience (ABD)	12-1057-41
CD73	PE	BD Pharmingen (ABD)	550257
CD45	APC	BD Pharmingen (ABD)	555485
CD29	APC	BD Pharmingen (ABD)	559883
HLA-DR	PE	Biologend (ABD)	307606
Ig G1	APC	Miltenyi Biotec (ABD)	130-092-214
Ig G1	FITC	BD Pharmingen (ABD)	555748
Ig G1	PE	BD Pharmingen (ABD)	550617

3.4.2. Adipojenik, Osteojenik ve Kondrojenik Farklılaşma Deneyleri

Adipojenik ve osteojenik farklılaşma çalışması 6 kuyucuklu kültür kabı içerisinde yapılmıştır. Adipojenik farklılaşma çalışması için pasaj 3 hücreleri 8000 hücre/cm² olacak şekilde normal besiyeri içerisinde ekilmiş ve kültür kabı içerisinde yoğunluk %90-100'e ulaşınca adipojenik farklılaşma besiyerine geçilmiştir. Adipojenik farklılaşma besiyeri için normal besiyeri bileşimine 1 µM deksametazon (Sigma Aldrich, ABD), 500 µM IBMX (Sigma Aldrich, ABD), 60 µM indometazin (Sigma Aldrich, ABD) ve 5 µg/mL insülin (Sigma Aldrich, ABD) eklenmiş ve 0,22 µm'lik filtreden süzölmüştür. Besiyeri, 21 gün boyunca üç günde bir defa değiştirilmiştir. 21 gün sonunda kültür ortamı aspire edilip PBS ile kültür yüzeyi

yıkanmış, sonrasında %10 formalin (Sigma Aldrich, ABD) içeren PBS ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş, ardından Oil Red O boyası (Sigma Aldrich, ABD) ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon işlemi sonunda kültür yüzeyi PBS ile yıkanıp ters faz ışık mikroskobu ile incelenmiştir.

Osteojenik farklılaşma çalışması için pasaj 3 hücreleri 4000 hücre/cm² olacak şekilde normal besiyeri ile ekilmiş ve kültür kabı içerisinde yoğunluk %70-80'e ulaşınca osteojenik farklılaşma besiyerine geçilmiştir. Osteojenik farklılaşma besiyeri için normal besiyeri içerisine 100 nM deksametazon, 0,2 mM askorbik asit (Sigma Aldrich, ABD) ve 10 mM B-gliserolfosfat (Applchem, Almanya) eklenmiş, sonrasında 0,22 µm'lik filtreden süzölmüştür. 21 gün boyunca üç günde bir defa yarım hacimde besiyeri değişimi yapılmıştır. 21 gün sonunda kültür ortamı aspire edilip PBS ile kültür yüzey yıkanmış, sonrasında %10 formalin içeren PBS ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır. Takiben Alizarin Red S (Sigma Aldrich, ABD) boyası ile de 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İşlem sonunda kültür yüzeyi PBS ile yıkanıp ters faz ışık mikroskobu ile inceleme yapılmıştır.

Kondrojenik farklılaşma için %1 penisilin-streptomisin ve 2 mM L-glutamin içeren DMEM-HG (Gibco, ABD) içerisine 10 ng/mL TGFB₃ (Sigma Aldrich, ABD), 100 nM deksametazon, 50 µg/mL askorbik asit, 1mM sodyumpiruvat (Thermo Fischer Scientific, ABD) ve 10 mL/L ITS+ (Corning, ABD) eklenmiş ve 0,22 µm'lik filtreden süzölerek besiyeri hazırlanmıştır. Bu çalışma için pasaj 3 hücreleri kullanılmıştır. 225.000 hücre 0,5 mL hacimde kondrojenik farklılaşma besiyeri içerisinde 450 g hızda 5 dakika süreyle santrifüj edilmiş, hücreler pellet halinde 15 mL'lik falcon tüp içerisinde dik pozisyonda hücre kültürü inkübatörüne aktarılmıştır. Tüplerin ağzı tamamen kapatılmamış, hava geçişi için gevşek bırakılmıştır. Besiyeri 21 gün boyunca üç günde bir defa pellet aspire edilmeden değiştirilmiştir. 21 gün sonunda pellet PBS ile yıkanmış, sonrasında formaldehit (Sigma Aldrich, ABD) ile fikse edilmiştir. Pelletlerin dehidratasyon, şeffaflaştırma ve sertleştirme (parafin içerisine gömme) işlemleri Gazi Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD ve Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi Pediatrik Patoloji

Laboratuvarında Thermo Shandon Pathcentre ve Histocenter (Thermo Scientific, ABD) cihazları kullanılarak yapılmıştır. Takiben Thermo Shandon Finesse Manual Microtome (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak parafin kasetlerden kesit alınmış, lama aktarım işlemi sıcak su banyosu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kondrojenik farklılaşmanın gözlenebilmesi için ise Toluidine Blue (Sigma Aldrich, ABD) kullanılarak kesitler boyanmış ve incelemeler ters faz ışık mikroskobu ile yapılmıştır.

3.5. İn Vitro Koşullarda MKH Kaynaklı EM Üretim Çalışmaları

Pasaj 3 MKH'ler kültür kapları içerisine 3000-5000/cm² olacak şekilde ekilmiş ve büyüme besiyeri kullanılarak hücre kültürü işlemi başlatılmıştır. Hücreler kültür kabı içerisinde %100 yoğunluğa ulaştıktan sonra EM üretimini tetiklemek amacıyla 4 farklı besiyeri 1- Normal büyüme besiyeri, 2- 50 mg/L askorbik asit içeren büyüme besiyeri, 3- AMEM (Gibco, ABD) tabanlı besiyeri, ve 4- Osteojenik farklılaşma besiyeri içerisinde 15 gün süreyle kültür işlemine devam edilmiş ve ters faz ışık mikroskobu kullanılarak kültür yüzeyleri incelenmiştir.

3.6. İn Vitro Koşullarda MKH Kaynaklı EM Eldesi İçin Deselülerizasyon Çalışmaları

15 günlük EM üretim işleminin ardından gözle ve ters faz ışık mikroskobu ile tespit edilebilir seviyeye ulaşan kültür kaplarından besiyerleri aspire edilmiş, sonrasında PBS ile yıkama yapılmıştır. Takiben literatürde yaygın olarak kullanılan 4 farklı protokolün deselülerizasyon etkinliği araştırılmıştır.

3.6.1. %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH₄OH İçeren PBS ile Deselülerizasyon

Biyogüvenlik kabini içerisinde 100 mm'lik petri kaplarına kültür yüzeyini kaplayacak seviyede 5 mL hacimde %0,5 'lik Triton X-100 (Biorad, ABD) ve 20 mM NH₄OH içeren PBS ilave edilmiştir. Bu aşamada 1- pipetleme yöntemi, 2- 37°C'de inkübatör içerisinde ve 3- orbital çalkalayıcı üzerinde (GFL 3005, Almanya) düşük hızda ve oda sıcaklığında inkübasyon işlemleri denenmiştir. Takiben çözelti kültür yüzeyinden aspire edilmiş, sonrasında Ca⁺²/Mg⁺² içeren ve içermeyen PBS (BI, İsrail – Sigma Aldrich, ABD) ile yıkama işlemi yapılmış ve kültür kapları ters

faz ışık mikroskobu ile incelenerek yöntemin deselülerizasyon etkinliği değerlendirilmiştir.

3.6.2. 20 mM NH₄OH İçeren Distile Su İle Deselülerizasyon

100 mm'lik petri kaplarına biyogüvenlik kabini içerisinde kültür yüzeyini kaplayacak seviyede 5 mL hacimde 20 mM NH₄OH (Sigma Aldrich, ABD) içeren distile su ilave edilmiştir. Bu aşamada 1- pipetleme yöntemi, 2- 37°C'de inkübatör içerisinde, 3- orbital çalkalayıcı üzerinde düşük hızda oda sıcaklığında inkübasyon işlemleri denenmiş, takiben çözelti kültür ortamından aspire edilmiş ve Ca⁺²/Mg⁺² içeren ve içermeyen PBS çözeltileri ile yıkama işlemi yapılarak kültür kapları ters faz ışık mikroskobu kullanılarak yöntemin deselülerizasyon etkinliği incelenmiştir.

3.6.3. Tekrarlı Dondurma-Çözme Yöntemi ile Deselülerizasyon

100 mm'lik petri kapları 30 dakika süreyle -80°C'lik dolapta bekletilip sonrasında 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İşlem sonunda Ca⁺²/Mg⁺² içeren ve içermeyen PBS ile yıkama yapılan kültür kapları ters faz ışık mikroskobu ile incelenerek yöntemin deselülerizasyon etkinliği değerlendirilmiştir.

3.6.4. 1 mM EDTA İçeren PBS ile Deselülerizasyon

Biyogüvenlik kabini içerisinde petri kaplarına kültür yüzeyini kaplayacak seviyede 5 mL hacimde 1 mM EDTA (Gibco, ABD) içeren PBS ilave edilmiş ve +4°C'de 12-24 saat süreyle inkübasyon yapılmıştır. Sonrasında Ca⁺²/Mg⁺² içeren ve içermeyen PBS çözeltileri ile yıkama işleminin ardından kültür kapları ters faz ışık mikroskobu kullanılarak incelenmiş ve yöntem deselülerizasyon etkinliği açısından değerlendirilmiştir.

3.7. Deselülerizasyon İşleminin Değerlendirilmesi

Bu aşamada başarılı olduğu saptanan yöntemler kullanılarak deselülerize edilmiş ekstraselüler matriks yapıları kalıntı DNA içeriği, yapı bütünlüğü, mimarisi ve GAG miktarı açısından incelenmiştir.

3.7.1. Kalıntı DNA Miktarının Araştırılması

EM üretim işlemi tamamlandıktan sonra besiyeri ortamdan aspire edilmiştir. Kültür yüzeyleri PBS ile yıkanmış, deselülerizasyon işlemi uygulanmayacak kaplarda %0,25'lik Tripsin/EDTA kullanılarak hücreler kaldırılmış, eppendorf tüpler içerisinde 453 g hızda 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Diğer kültür kaplarında ise deselülerizasyon işlemleri uygulandıktan sonra hücre kazıyıcı (Corning, ABD) yardımı ile MKH-dEM kazınarak eppendorf tüplere aktarılmıştır. Tüplerden alınan 100 µl hacimdeki örnekler iPrepTM PureLinkTM gDNA Blood Kiti ve iPrepTM Purification Device (Thermo Fisher, ABD) kullanılarak üretici firmanın DNA izolasyon prosedürü takip edilmiştir. İzolasyon işlemi sonrasında Nanodrop 1000 (Thermo Fisher, ABD) kullanılarak spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. DNA ölçüm işlemine paralel olarak immünfloresan inceleme işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla kültür kaplarından besiyeri aspire edilip, PBS ile yıkandıktan sonra deselülerizasyon işlemi uygulanan ve uygulanmayan yüzeylerde soğuk etanol (Merck-Millipore, ABD) ile fiksasyon yapılmış, üzerine DAPI (Abcam, İngiltere) damlatılmış ve lamel ile kapatılmıştır. Leica DMI 6000B Microsystems immünfloresan mikroskobu ve Leica Application Suite (Almanya) programı kullanılarak yüzeyler incelenmiştir.

3.7.2. İmmünfloresan Mikroskobu ile EM Yapısının İncelenmesi

Elde edilen MKH-dEM yapılarının immünfloresan tekniği ile incelenmesi amacıyla fikse edilen kültür yüzeyleri önce %5 BSA (Sigma Aldrich, ABD) içeren PBS ile yıkanmıştır. Takiben fibronektin antikoru (1/100 dilüsyon, Santa Cruz, SC-6952, ABD) ile nemli ortamda +4°C'de gece boyunca inkübe edildikten sonra FITC işaretli ikinci antikor (1/100 dilüsyon, Santa Cruz, SC-2024, ABD) 37° C'de nemli ortamda inkübe edilmiştir. Sonrasında DAPI ile boyama yapılmış ve lamel ile kapatılan yüzeyler Leica DMI 6000B Microsystems Fluoresan mikroskobu ve Leica Application Suite kullanılarak incelenmiştir. Mavi ve yeşil kanallarda elde edilen görüntüler Image J (NIH, ABD) programı ile birleştirilmiştir.

3.7.3. Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu İle İnceleme Yapılması

Üretilen MKH-dEM yapılarının aydınlatılması amacıyla Bilkent Üniversitesi, Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM)'den elektron mikroskobu çalışmaları için hizmet alımı yapılmıştır. Bu amaçla 6 kuyucuklu kültür kabı içerisine yerleştirilen lamel (*coverslip*) üzerinde üretilen EM yapıları deselülerizasyon işlemi öncesinde ve sonrasında incelenmek amacıyla soğuk metanol kullanılarak fikse edilmiştir. Sonrasında yüzeyler üzerinde altın-paladyum kaplama yapılmış ve çevresel taramalı elektron mikroskobu (*Environmental scanning electron microscope - ESEM*) FEI Quanta 200 FEG (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile incelenmiştir.

3.7.4. Total Glukozaminoglikan (GAG) Miktarının Saptanması

MKH-dEM bileşimindeki total glukozaminoglikan miktarını saptamak üzere spektrofotometrik analiz için Blyscan Glycosaminoglycan Assay Kit (Biocolor, İngiltere) kullanılmıştır. 6 kuyucuklu kültür kabı içerisinde üretilen EM yapıları, 1 mg/10 mL konsantrasyonda papain (Sigma Aldrich, ABD) içeren 0.2 M'lık sodyum fosfat tamponu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 6.4) (Sigma Aldrich, ABD) ile 3 saat süreyle 60 °C'de su banyosunda (Thermolab 1086, GFL, Almanya) inkübe edilmiştir. Böylece yapı bünyesindeki GAG yapıları serbestleştirilmiş ve üretici protokolü takip edilerek renkli bileşen oluşturması amacıyla kit içeriğindeki boyar bileşenle karıştırılmıştır. Örnekler 96 kuyucuklu kültür kabı içerisinde referans standart ile birlikte Tecan Sunrise (Avustralya) mikropate okuyucu kullanılarak 625 nm'de okutularak ölçüm yapılmıştır, absorpsiyon değerleri üzerinden kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve elde edilen denklem kullanılarak miktar tayini yapılmıştır.

3.8. Total Protein İzolasyonu ve Protein Kompozisyonunun Araştırılması

MKH-dEM yapısındaki protein kompozisyonunu aydınlatmak üzere Koç Üniversitesi, Proteomik Araştırma Merkezi'nden hizmet alımı yapılmıştır. Osteojenik farklılaşma besiyeri ile üretilen MKH-EM, %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH_4OH içeren PBS kullanılarak Bölüm 3.6.1.'de açıklanan yöntem ile deselülerize edilmiştir. Takiben buz üzerinde çalışılarak MKH-dEM yapısından RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz, ABD) ile total protein izolasyonu

yapılmıştır. Bu işlem için 100 µl PMSF çözeltisi, 100 µl sodyum ortovanadat ve 150 µl proteaz inhibitör kokteyl çözeltisi 10 mL RIPA Lysis Buffer ile karıştırılarak izolasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Kültür kaplarına 1 mL izolasyon çözeltisi eklenmiş ve +4°C’de soğuk oda içerisinde 30 dakika süreyle orbital çalkalayıcı üzerinde düşük hızda inkübasyon yapılmıştır. Sonrasında yüzey kazıyıcı ile MKH-dEM yüzeyden kazınmış ve protein bağlanma kapasitesi düşük olan 1.5 mL’lik eppendorf tüplere (Sigma Aldrich, ABD) aktarılmıştır. %50 pulse ile sonikasyon cihazında (ProbeTec™ ET, BD, ABD) inkübe edilen tüpler +4°C’de 14.000 g hızda 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Üst sıvı yeni eppendorf tüplere (n=3) aktarılmış ve kuru buz içerisinde Koç Üniversitesi’ne transfer edilmiştir. Proteomik Araştırma Merkezi’nde çözeltilerden enzimatik kesme (*insolution digest*) yöntemi sonrasında nano Liquid Chromatography, UltiMate 3000 NCS-3500RS (Thermo Scientific, ABD) ve Thermo Scientific Q Exactive Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry (Thermo Scientific, ABD) cihazında 300 nL/dakika akış hızında 100 dakika süreyle analiz yapılmıştır. Thermo Proteome Discoverer 1.4, Mascot (Matrix Science, ABD) ve Sequest programları ve Uniprot (208) veritabanı kullanılarak protein tayini gerçekleştirilmiştir. Tanımlanan proteinlerin sınıflandırılması için Venny 2.1 (BioinfoGP, ABD) programı ve Human Matrisome Data Seti (MIT, The Hynes Lab, ABD) (209) kullanılmıştır.

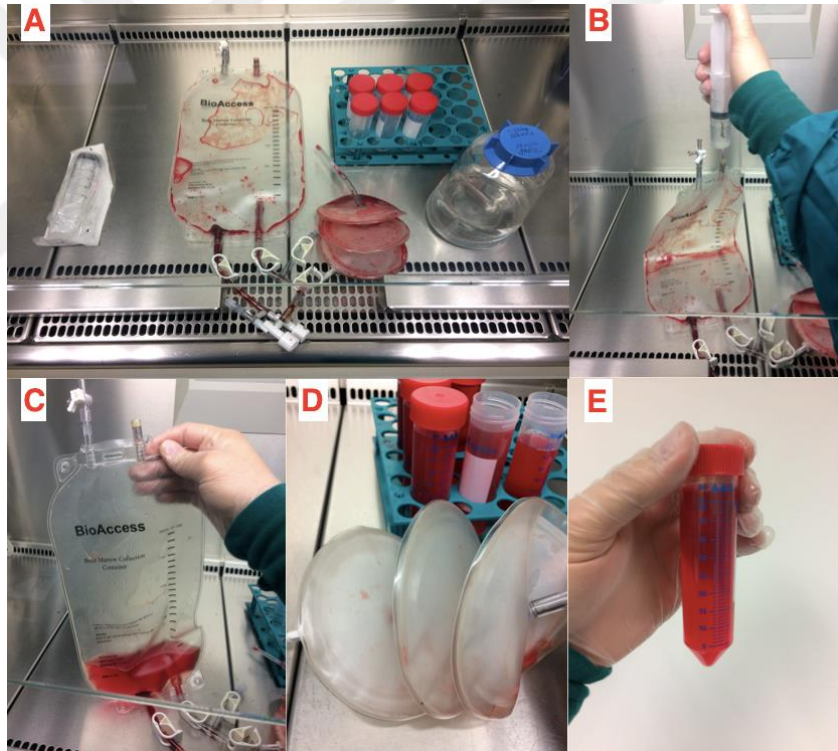
3.9. İstatistiksel Analiz

İş paketleri kapsamında en az üç tekrarlı şekilde yapılan çalışmalardan elde edilen nitel ve/veya nicel veriler düzenlendikten sonra uygun istatistiksel yöntemler/testler seçilerek istatistiksel değerlendirme yapılmıştır (210). Hesaplama aşamasında istatistiksel analiz programı (SPSS) ve grafiklerin çizilmesi aşamasında ise GraphPad Prism (ABD) programı kullanılmıştır.

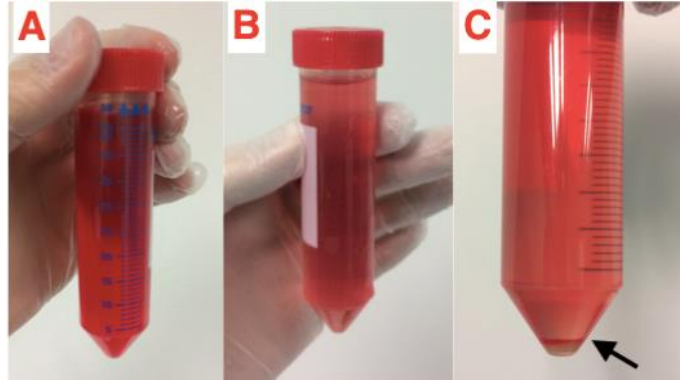
4. BULGULAR

4.1. Kemik İliği Nakli Sırasında Kullanılan Filtre ve Torba Sistemlerine Takılmış Olan Hücrelerin İzole Edilmesi

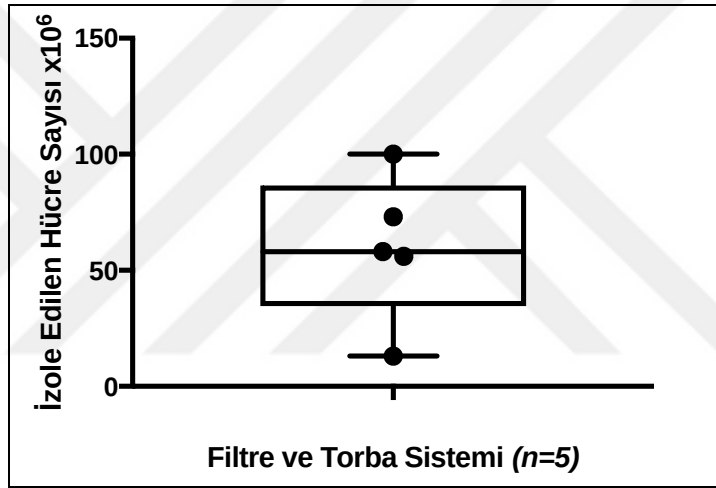
Nakiller sırasında kullanılan filtre ve torba sisteminin, izolasyon çözeltisi ile temizlendiği ve sistemde takılan hücrelerin izole edildiği gözlenmiştir. İnkübatör içerisindeki inkübasyon süresi sonrasında eritrosit yükünün azaldığı ve çözelti renginin açıldığı tespit edilmiştir. Santrifüj işlemi ile hücreler pellet şeklinde çöktürülmüş ve sayım işlemi sonrasında %95 üzerinde canlılık ile hücrelerin izole edilebildiği ve hücre sayısının geniş bir dağılıma sahip olduğu saptanmıştır. İşlem basamakları Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Filtre ve torba sisteminde takılan hücrelerin izole edilerek Falcon tüplere aktarılma aşamalarına ait fotoğraflar. (A) İşlem öncesinde torba ve filtre sistemin fotoğrafı. (B) Sisteme torba tarafından yıkama çözeltisi aktarılmıştır. (C) Yıkama işlemi ile torba temizlenmiştir. (D) Yıkama işlemi ile filtreler de temizlenerek rengi açılmıştır. (E) Sistem içerisine takılan hücreler 50 mL'lik tüplere bölünmüştür.



Şekil 4.2. Tüp içerisinde lizis aşaması ve hücre pelletinin eldesine ilişkin fotoğraflar. (A) Eritrosit lizis işlemi öncesi tüp fotoğrafı. (B) 37 °C’de inkübasyon sonrası kırmızı rengi açılan ve eritrosit lizis gerçekleşen tüp fotoğrafı. (C) Santrifüj işlemi sonrasında tüp tabanında hücreler pellet şeklinde izole edilmiştir.

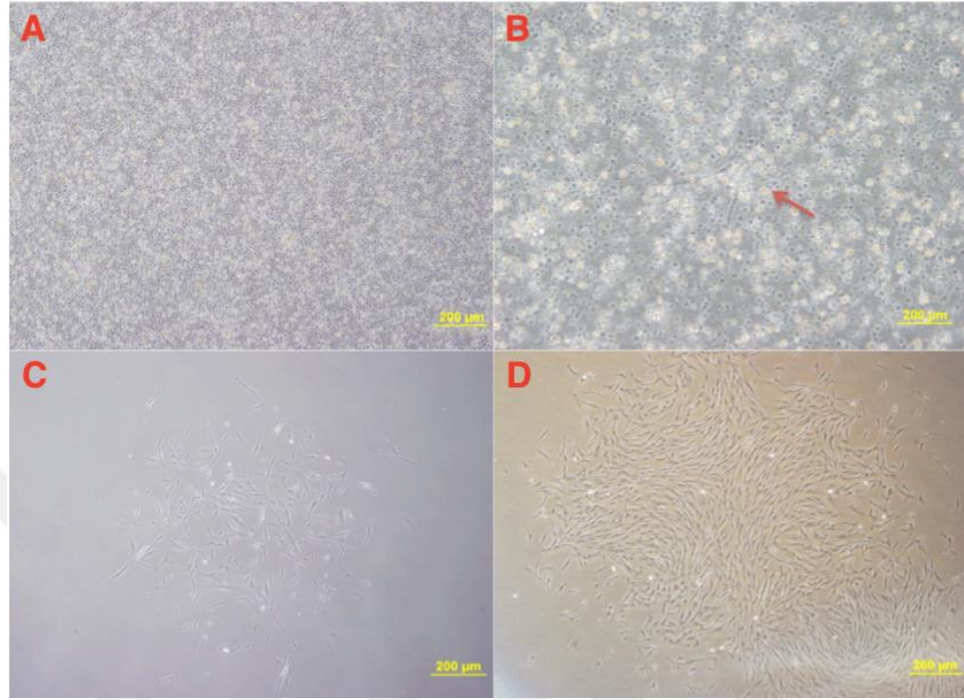


Şekil 4.3. Filtre ve torba sistemlerinden izole edilen hücre sayıları. Değerler geniş dağılıma sahip olduğu için kutu grafiği kullanılmıştır. Hücre sayıları sırasıyla 13×10^6 , 56×10^6 , 58×10^6 , 73×10^6 , 100×10^6 . (Min: 13×10^6 , 25. Yüzdelik: $34,5 \times 10^6$, Ortalama: 60×10^6 , 75. Yüzdelik: $86,5 \times 10^6$, Max: 100×10^6)

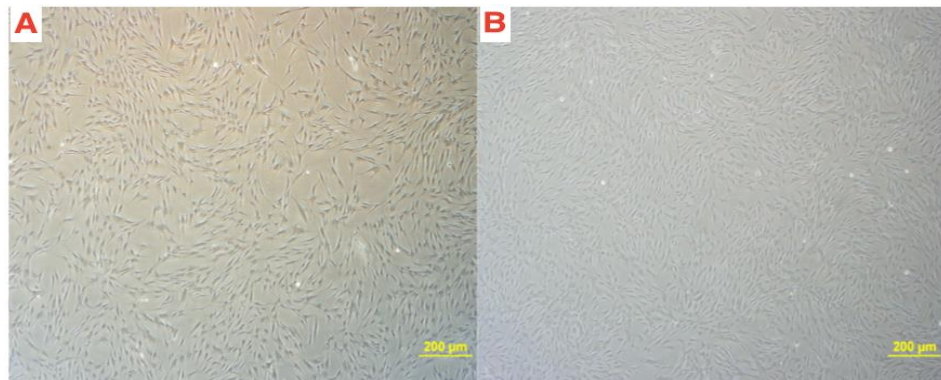
4.2. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

Kültür işlemi başlangıcında heterojen hücre popülasyonunu olduğu ve ters faz ışık mikroskobu ile incelendiğinde hücrelerin küresel görünümlü olduğu tespit edilmiştir. Takip eden 1 hafta içerisinde kültür yüzeyine yapışan, MKH ile karakterize iğsi görünümlü hücrelerin gözlenmesi ile besiyeri yenilenmiştir. 3 günde 1 defa besiyerinin değiştirilmesi ile heterojen hücre popülasyonunun homojen sisteme dönüştüğü gözlenmiştir. Böylece koloni oluşturarak çoğalan MKH kültürüne geçilmiştir. Hücreler pasaj 1, pasaj 2 ve deneylerin yapıldığı pasaj 3 kültürü sırasında

da koloni oluşturarak homojen morfolojide çoğalmıştır. Elde edilen görüntüler Şekil 4.4 ve 4.5'te gösterilmiştir.



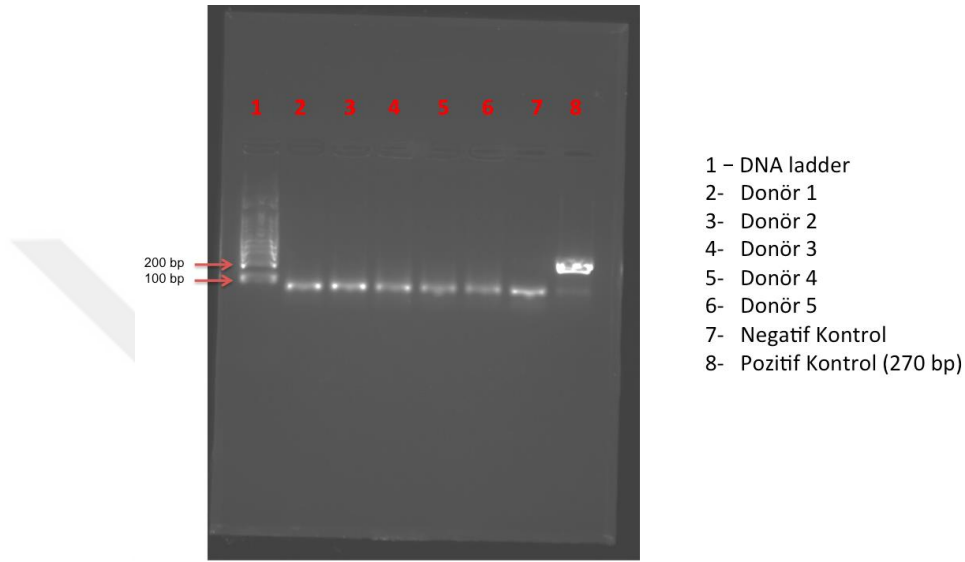
Şekil 4.4. Kültür işlemi sırasında ters faz ışık mikroskobu kullanılarak ilk bir haftalık sürede elde edilen görüntüler. Kültür yüzeyine ekilen hücreler başlangıçta yüzeye yapışmadan küresel biçimde gözlenirken (A), takip eden günlerde (kırmızı okla gösterilen) yüzeye yapışan fibroblast görünümlü hücreler tespit edilmiştir (B). Kültür ortamının yenilenmesi ile bu hücrelerin koloni oluşturduğu (C) ve çoğaldığı (D) saptanmıştır. Fotoğraflar 4x objektif ile çekilmiştir.



Şekil 4.5. Pasaj 1 ve pasaj 2'de hücrelerin ters faz ışık mikroskobu kullanılarak çekilen görüntüleri. DMEM-LG ve %10 FBS kullanılarak devam ettirilen hücre kültürü çalışması sırasında hücrelerin pasaj 1 (A) ve pasaj 2'de (B) spesifik morfolojilerini koruyarak çoğaldığı, spontan farklılaşmaya uğramadığı tespit edilmiştir. Fotoğraflar 4x objektif ile çekilmiştir.

4.3. Mikoplazma Kontaminasyon Kontrolü

Mikoplazma kontaminasyonunun kontrolü için elektroforez işlemine tabi tutulan agaroz jel, görüntüleme sistemi ile incelendiğinde donörlerin mikoplazma kontaminasyonu taşımadığı tespit edilirken pozitif kontrolde ise 270 bp'lık DNA bandı gözlenmiştir (Şekil 4.6).

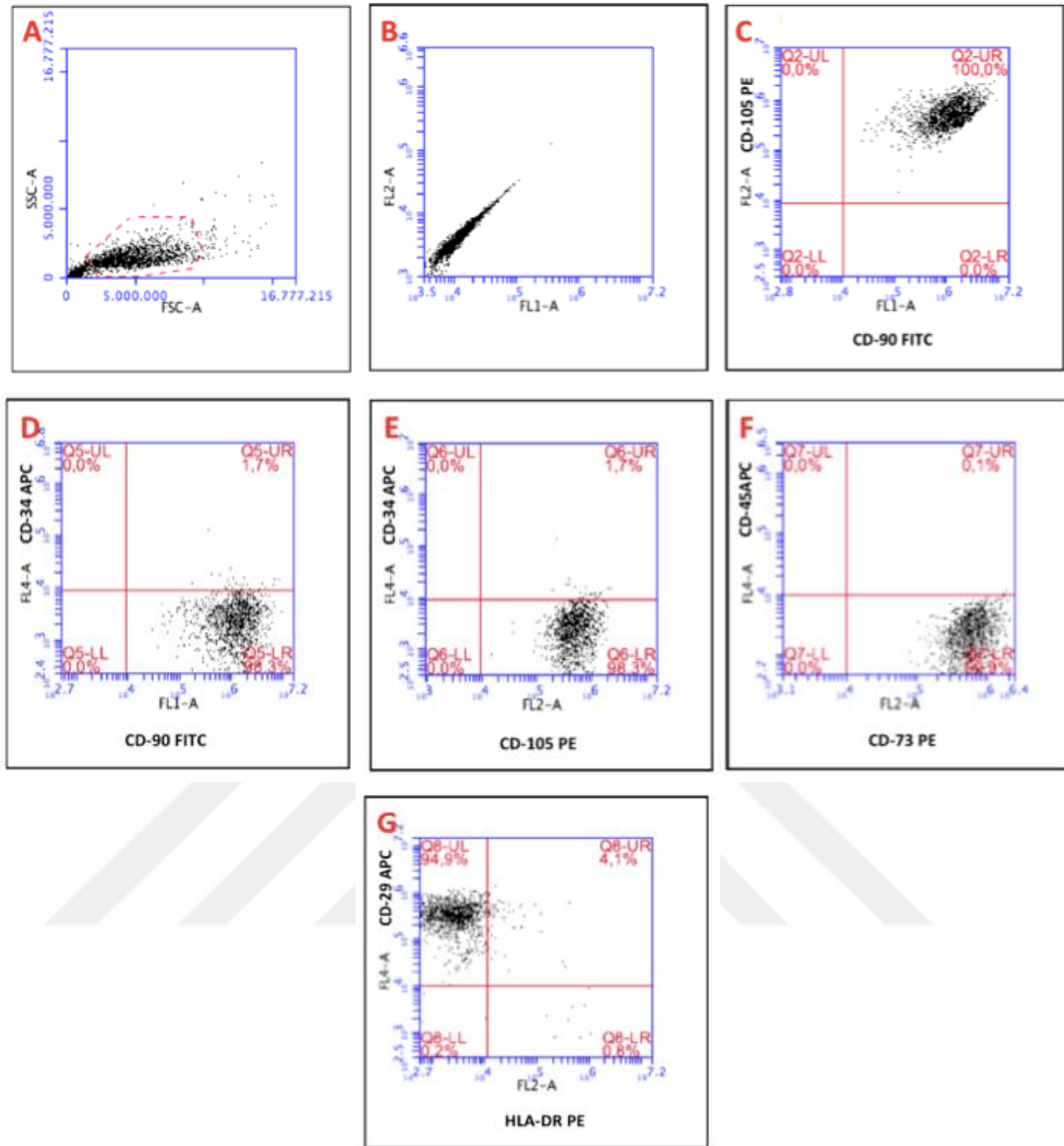


Şekil 4.6. Elektroforez işlemi sonrasında agaroz jelin görüntüsü. Kuyulara sırasıyla DNA ladder, Donör 1, Donör 2, Donör 3, Donör 4, Donör 5, Negatif kontrol ve pozitif kontrol yüklenmiştir. Pozitif kontrol örneğinde 270 bp'de DNA bandı saptanmıştır.

4.4. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyon Çalışmaları

4.4.1. Akım Sitometri Cihazı ile Yüzey Ekspresyonlarının Saptanması

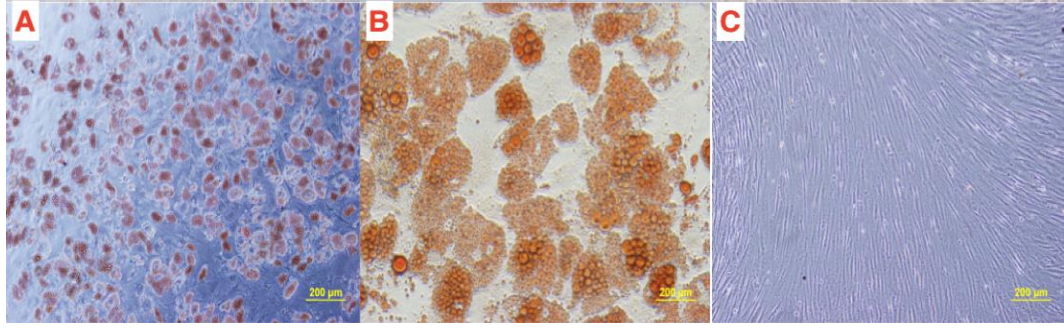
DMEM-LG ve %10 FBS kullanılarak çoğaltılan hücreler yüzey antijenleri açısından değerlendirildiğinde stromal antijenler olan CD105, CD90, CD73, CD29 ekspresyonları açısından pozitif iken hematopoetik antijenler olan CD34, CD45 ve MHC antijeni olan HLA-DR ekspresyonu açısından negatif olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen analiz sonuçları Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Akım sitometri analiz sonuçları. **A.** İleri saçılma (forward scatter) ve yana saçılma (side scatter) **B.** Otofloresans değerleri **C.** CD90 FITC – CD105 PE, **D.** CD90 FITC – CD34 APC **E.** CD105 PE – CD34 APC **F.** CD73 PE – CD45 APC **G.** CD29 APC – HLA-DR PE populasyon dağılımları ve ekspresyon yüzdeleri

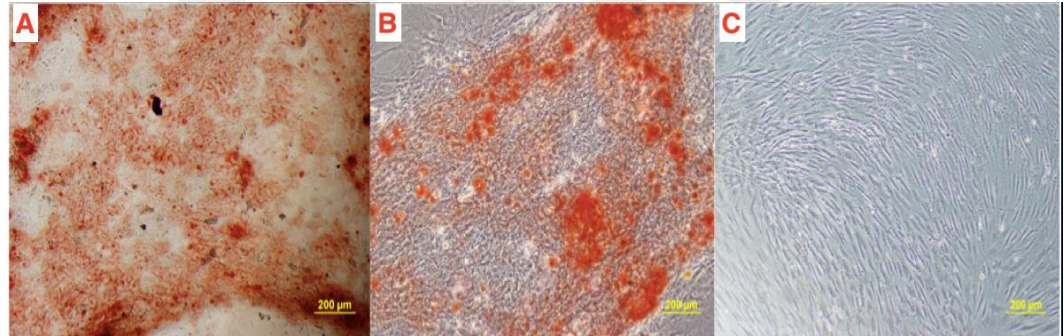
4.4.2. Adipojenik, Osteojenik ve Kondrojenik Farklılaşma Çalışmaları

21 günlük *in vitro* farklılaşma deneyleri sonunda, Şekil 4.8.'de gösterildiği üzere kontrol çalışmalarına kıyasla Oil Red O ile pozitif boyanan MKH'de sitoplazmik yağ vakuollerinin oluştuğu tespit edilmiştir.



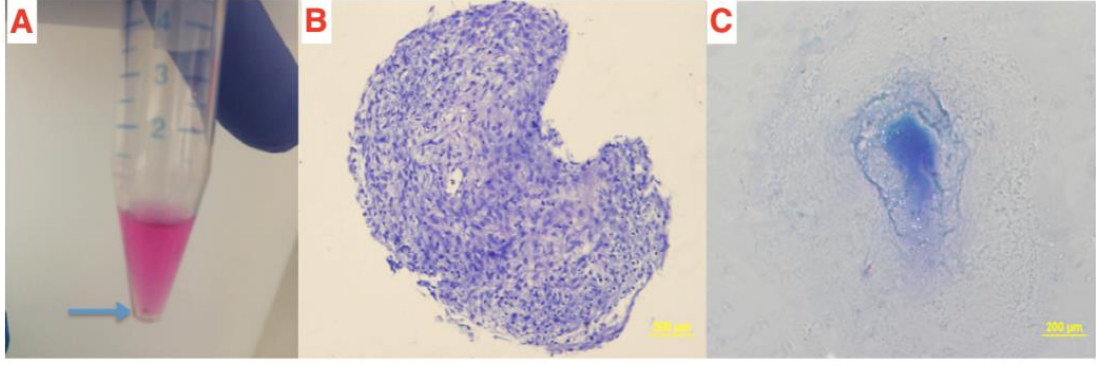
Şekil 4.8. Adipojenik farklılaşma deneyine ilişkin mikroskop görüntüleri. 21 gün sonunda Oil Red O ile sitoplazmik yağ vakuolleri kırmızı renge boyanmış (A ve B) ancak büyüme besiyerinde çoğalan hücrelerde (C) farklılaşma ile karakterize boyanma olmamıştır. Fotoğraflar 4x ve 20x objektifler ile çekilmiştir.

21 günlük *in vitro* koşullarda osteojenik farklılaşma deneyi sonucunda koyu renkte/kahverengi görülen kalsiyum tuzlarının biriktiği gözlenmiş ve Alizarin Red S ile osteojenik farklılaşma tespit edilmiştir. Şekil 4.9.'da görüldüğü üzere kontrol kuyularında ise herhangi bir boyanma olmamıştır.



Şekil 4.9. Osteojenik farklılaşma deneyine ilişkin mikroskop görüntüleri. (A) ve (B) fotoğraflarında osteojenik farklılaşma besiyeri varlığında hücrelerin morfolojik olarak değişikliğe uğradığı ve koyu renkte/kahverengi görülen kalsiyum tuzlarını biriktirdiği gözlenmiştir. Alizarin Red S boyaması ile hücrelerin osteojenik odaklar oluşturarak farklılaştığı tespit edilmiştir. Standart büyüme besiyeri içerisinde çoğalan hücrelerde ise boyama gerçekleşmemiştir (C). Fotoğraflar 4x ve 20x objektifler ile çekilmiştir.

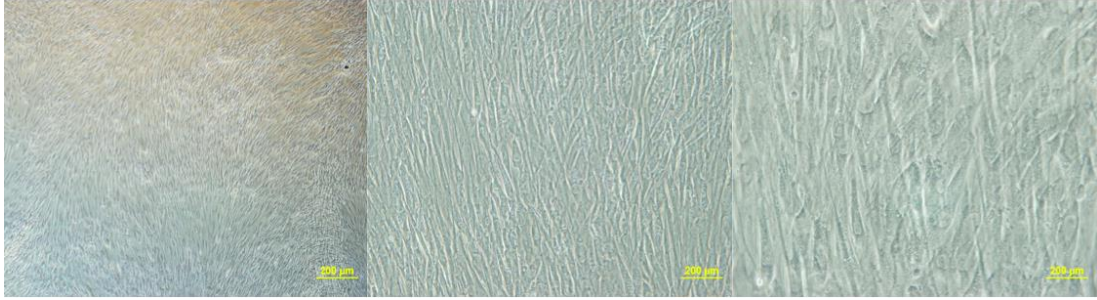
21 günlük kondrojenik farklılaşma deneyi sonucunda oluşan pellet Toluidine Blue ile boyandığında kondrojenik farklılaşma uygulanan tüplerde pellet bünyesinde daha yoğun ve daha yüksek GAG üretimi saptanmıştır. Kontrol pelletinde ise sadece iç kısımda hafif boyanma olduğu ve çeperlere doğru boyanmanın soluklaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Kondrojenik farklılaşma deneylerine ilişkin görüntüler. (A) 15 mL’lik tüp dibinde ok ucunda pellet gösterilmiştir. (B) Kondrojenik farklılaşma besiyeri içerisinde gelişen pelletin kesit alınıp boyanması sonucu mikroskop ile çekilen fotoğraf. (C) Büyüme besiyeri içerisinde geliştirilen pelletin kesit alınıp boyanması sonucu mikroskop ile çekilen fotoğraf. Kontrol pelletinde sadece iç kısımda boyanmanın olduğu ve çeperlere doğru soluklaştığı gözlenmiştir. Fotoğraflar 10x objektif ile çekilmiştir.

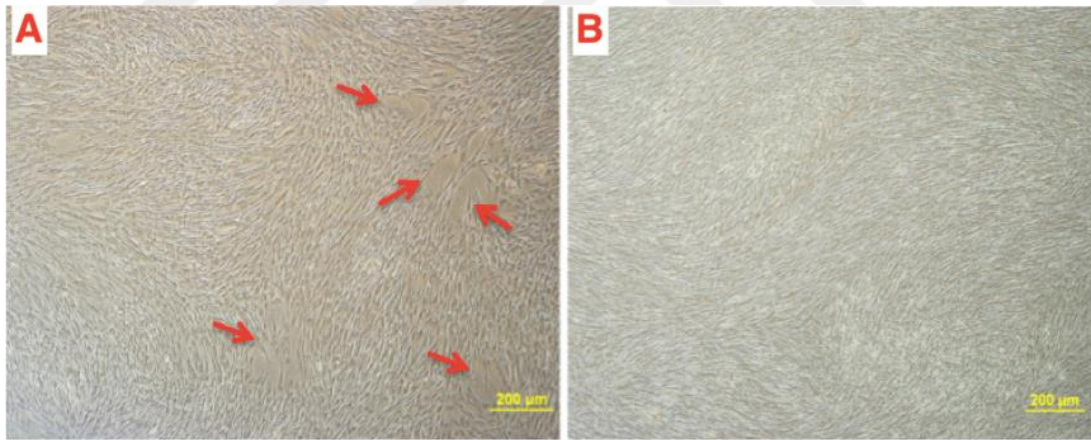
4.5. İn Vitro Koşullarda MKH Kaynaklı EM Üretim Çalışmaları

Yapılan deneylerle %100 yoğunluk sonrası uzamış kültür sürelerine rağmen monolayer yapının bozulmadığı, hücre morfolojisinin değişmediği, hücrelerin spontan farklılaşma göstermediği saptanmıştır. Gözle ve ters faz ışık mikroskopuyla kültür kapları değerlendirildiğinde ortalama 15 günlük üretim aşamasında DMEM-LG tabanlı besiyeri ile kültür kabında monolayer yapının korunduğu ancak EM üretimi için tek başına yetersiz olduğu; 50 mg/L askorbik asit içeren DMEM-LG ve AMEM kullanımı ile EM üretimi yapılabildiği, osteojenik farklılaşma ortamı ile daha fazla EM üretilebildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.11, 4.12, 4.13, 4.14 ve 4.15).



Şekil 4.11. DMEM-LG ve %10 FBS kullanılarak EM üretim aşamasının değerlendirilmesine ilişkin fotoğraflar. Normal besiyeri içerisinde uzayan kültür işlemi sonrasında hücre morfolojisinin değişmediği, yoğun ve sıkı hücre tabakasının sağlanabildiği ve korunduğu tespit edilmiştir. EM üretimi için önemli bir aşama olan hücrelerin yüzeyden kalkmadan monolayer şekilde kalabildiği gözlenmiştir. Fotoğraflar 4x, 10x ve 20x objektifler ile çekilmiştir.

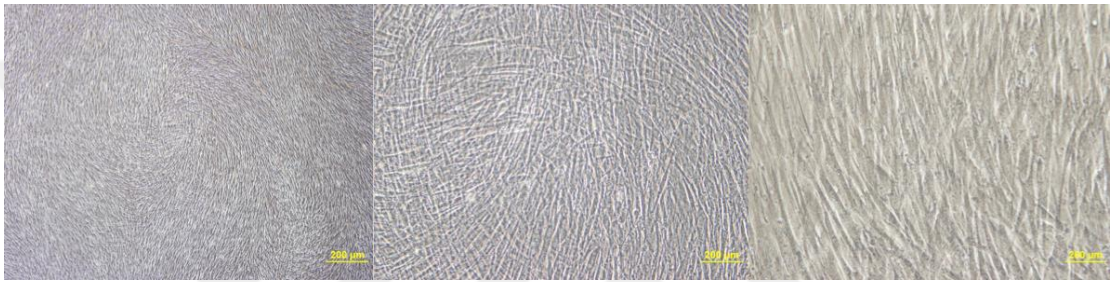
Ancak kültür kabı içerisinde bölgesel olarak bazı noktalarda boşlukların kalabildiği saptanmıştır. EM üretimi için önemli olan bu aşamada besiyeri kompozisyonuna 50 mg/L askorbik asit ilave edilerek 5 günlük kültür işlemi sonrasında boşlukların kapandığı gözlenmiştir (Şekil 4.12).



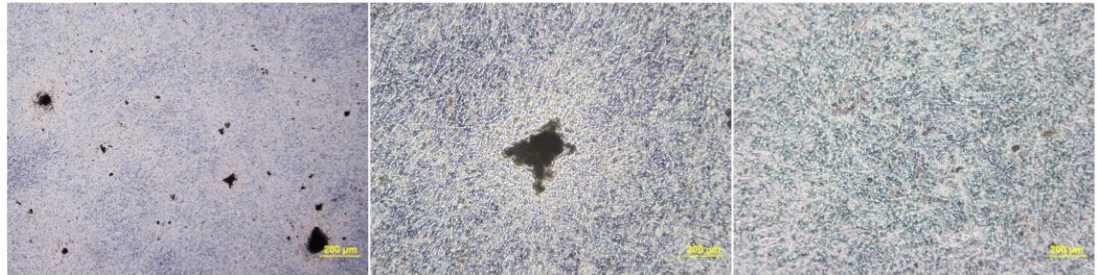
Şekil 4.12. Kültür ortamında askorbik asit kullanımının etkisi. DMEM-LG %10 FBS ile kültür sırasında tespit edilen boşlukların (A) askorbik asit ilavesi ile 5 günlük kültür sonrasında kapandığı saptanmıştır (B). Oklar bölgesel olarak saptanan boş alanları göstermektedir. Fotoğraflar 4x objektif ile çekilmiştir.



Şekil 4.13. Askorbik asit ilaveli DMEM-LG ile EM üretim sürecinin fotoğrafları. %100 yoğunluğa ulaşan hücrelerde DMEM-LG + askorbik asit ilavesi yapıldığında hücrelerin tek başına DMEM-LG içeren ortama kıyasla daha sıkı yapı oluşturmuştur. Fotoğraflar 4x, 10x ve 20x objektifler ile çekilmiştir.



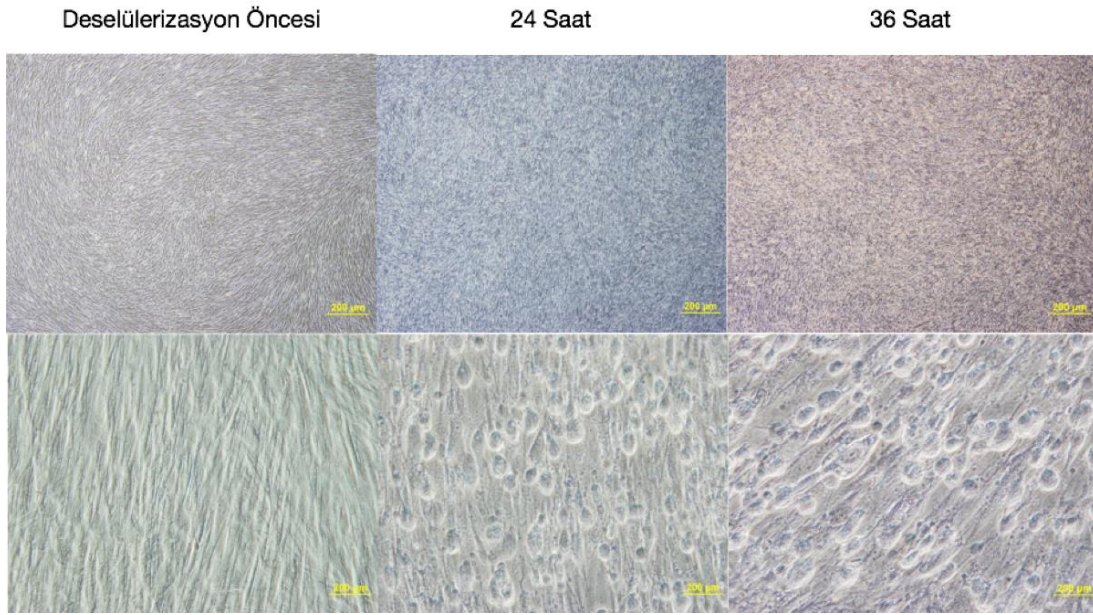
Şekil 4.14. AMEM kullanılarak EM üretim süreci fotoğrafları. %100 yoğunluğa ulaşan hücrelerde AMEM tabanlı kültür ortamı kullanıldığında DMEM-LG + askorbik asit ile sağlanan görünüme benzer morfoloji gözlenmiştir. Fotoğraflar 4x, 10x ve 20x objektifler ile çekilmiştir.



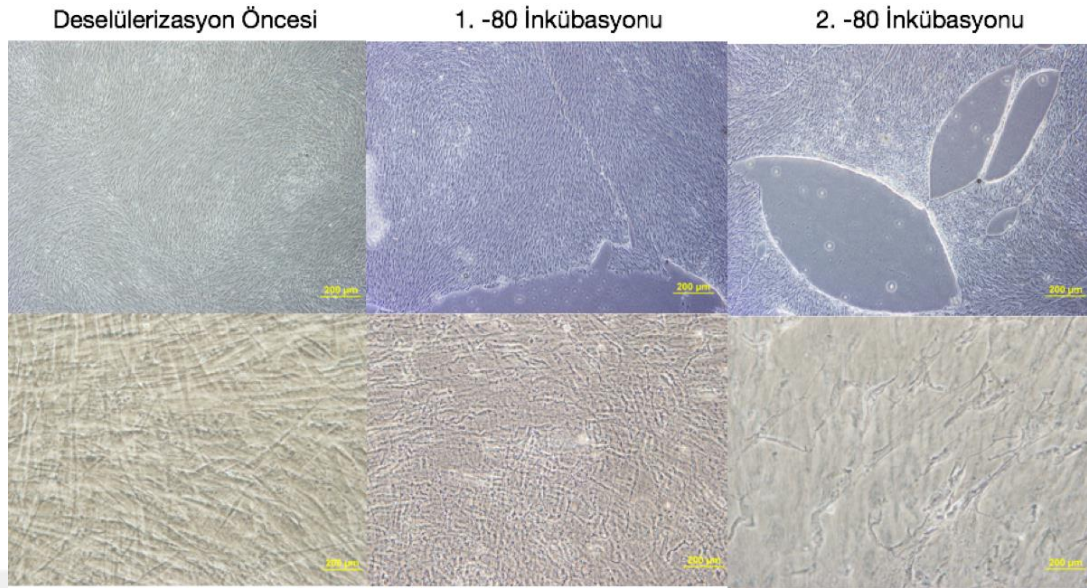
Şekil 4.15. Osteojenik kültür ortamı kullanılarak EM üretim işleminin fotoğrafları. %100 yoğunluğa ulaşan kültürlerde osteojenik farklılaşma ortamı ile kültür işlemi devam ettirildiğinde ise hücrelerin kültür yüzeyinde osteojenik farklılaşma ile karakterize siyah-kahve renkli kalsiyum tuzlarının biriktiği, hücre tabakasının üzerinde daha fazla EM üretiminin yapıldığı, hücre hatlarının görülemediği tespit edilmiştir. Fotoğraflar 4x ve 10x objektifler ile çekilmiştir.

4.6. In Vitro Koşullarda MKH Kaynaklı EM Eldesi İçin Deselülerizasyon Çalışmaları

Standart kültür işleminin ardından, EM üretimin artmasını sağlayacak şekilde DMEM-LG ve askorbik asit kullanılarak 15 günlük ilave kültür süreci sonrası EM yapısı gözle ve mikroskop tespit edilebilir seviyeye ulaşmıştır. Besiyeri aspire edilerek kültür yüzeyi PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra literatürde yaygın olarak kullanılan 4 farklı deselülerizasyon protokolünün (1- %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH₄OH içeren PBS ile inkübasyon, 2- 20 mM NH₄OH içeren distile su ile inkübasyon, 3-Tekrarlı dondurma-çözme yöntemi ve 4- 1 mM EDTA içeren PBS ile deselülerizasyon yöntemi) etkinliği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tekrarlı dondurma çözme yönteminin ve 1 mM EDTA içeren PBS ile inkübasyonun, deselülerizasyon işleminde hücrelerin yüzeyden ayrılması ve EM yapısının korunamaması nedenleriyle başarılı olamadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.16 ve 4.17).

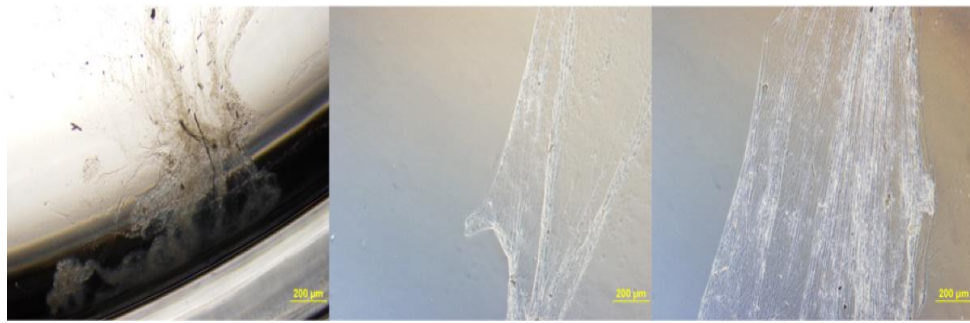


Şekil 4.16. +4°C'de 1mM EDTA-PBS ile yapılan deselülerizasyon işlemine ait görüntüler. 24 saatlik inkübasyon sonucunda hücrelerin yüzeyde tutunmalarının azaldığı ancak yüzeyden kalkmadığı, 36 saatlik ilave inkübasyon sonucunda da deselülerizasyon işleminin verimli olmadığı 4x ve 20x objektif ile çekilen fotoğraflarla tespit edilmiştir.



Şekil 4.17. Tekrarlı dondurma çözme yöntemi ile yapılan deselülerizasyon işlemine ait görüntüler. -80°C’de 30 dakika, 37°C’de 30 dakika şeklinde yapılan 2 tekrarlı inkübasyon işlemi ile hücrelerin yüzeyden kalkabildiği, ancak dondurma-çözme işlemine bağlı olarak monolayer yapının korunamadığı, yüzeyde kırılmalar ve yırtılmalar olduğu 4x ve 20x objektiflerle çekilen fotoğraflarla gözlenmiştir.

%0,5’lik Triton X-100 ve 20 mM NH_4OH içeren PBS ve 20 mM NH_4OH içeren distile su ile yapılan deselülerizasyon işlemleri sırasında pipetleme yapıldığında veya çalkalayıcı üzerinde düşük hızda oda sıcaklığında inkübasyon işlemi uygulandığında ise monolayer yapının korunamadığı, yüzeyden kalktığı tespit edilmiştir (Şekil 4.18).



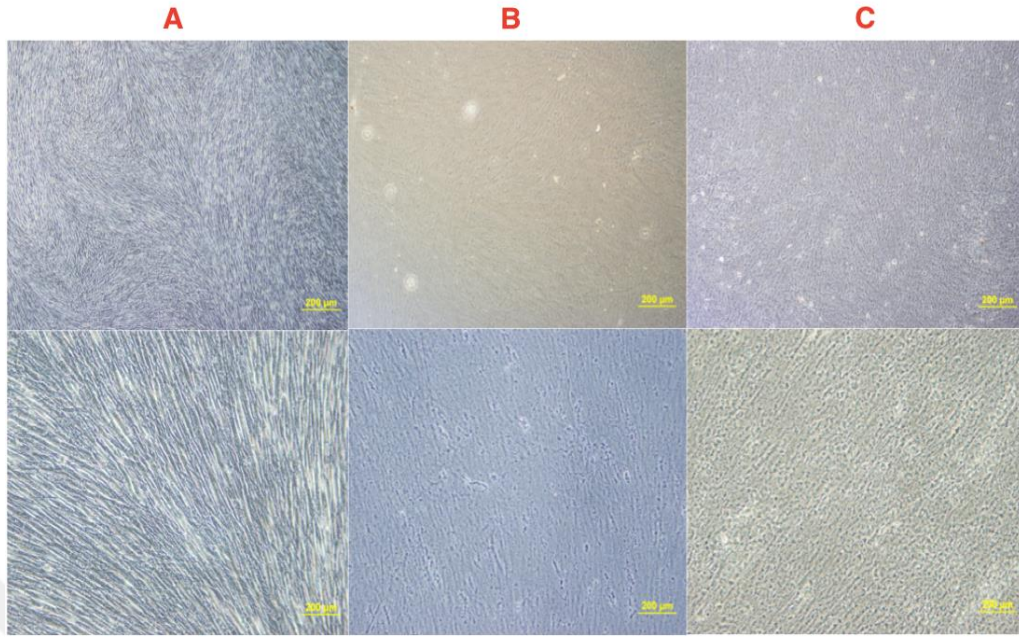
Şekil 4.18. Pipetleme ve çalkalayıcı üzerinde düşük hızda inkübasyon uygulanarak yapılan deselülerizasyon işlemi sonrasında EM görüntüleri. Uygulanan kuvvete bağlı olarak EM kültür kabı içerisinde yüzeyden kısmen veya tamamen kalkmıştır. Fotoğraflar 4x ve 10x objektifler ile çekilmiştir.

Bu aşamada hem hücrelerin EM kompozisyonundan uzaklaşmasını sağlamak, hem de EM yapısının monolayer ve tamamen yüzeye tutunur yapısını korumak üzere kritik işlemin, deselülerizasyonun ilk aşamasında pipetleme ve/veya çalkalayıcı üzerinde inkübasyon yerine Tablo 4.1.'de açıklandığı üzere 37 °C'de sabit bir şekilde inkübasyon ve sonrasında yüzeye tutunmayı arttırmak üzere $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ içeren PBS ile nazik pipetleme olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.1. Uygulanan deselülerizasyon yöntemlerine ait sonuçlar ve önemli aşamalar.

Ajan	Yöntem	Süre	Yapı	Önemli Aşama	Sonuç
%0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH_4OH içeren PBS	37 °C'de inkübasyon	5 dakika	Korunuyor	Ca-Mg içeren PBS/ Nazik pipetaj	Başarılı
20 mM NH_4OH içeren distile su	37 °C'de inkübasyon	5 dakika	Korunuyor	Ca-Mg içeren PBS/ Nazik pipetaj	Başarılı
	Tekrarlı dondurma çözme	30 dakika	Kırılarak kopuyor		Başarısız
1 mM EDTA içeren PBS	+4°C'de inkübasyon	36 saat	Hücreler yüzeyden kalkmıyor		Başarısız

Elde edilen sonuçlara göre %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH_4OH içeren PBS ve 20 mM NH_4OH içeren distile su ile inkübasyon yönteminin devam edecek çalışmalarda uygun olacağı tespit edilmiştir (Şekil 4.19).

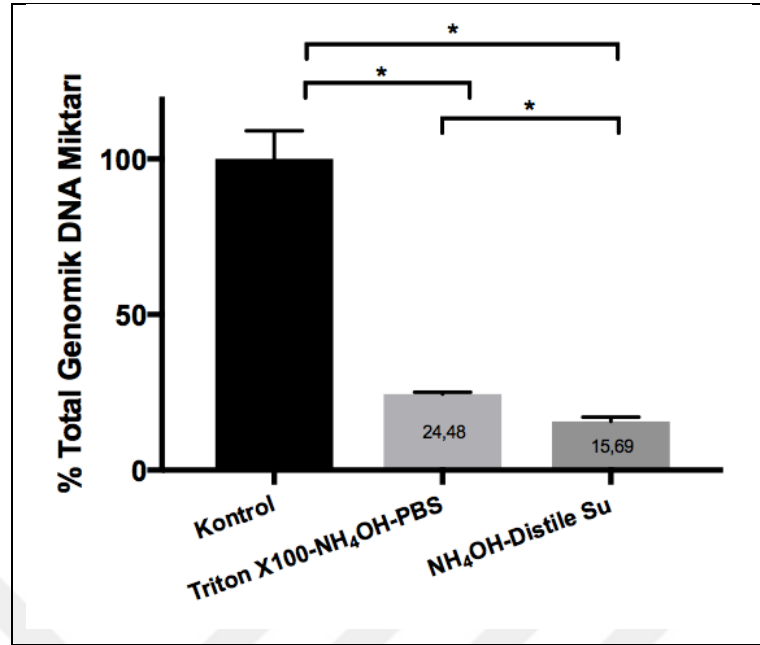


Şekil 4.19. Triton X-100 ve NH_4OH içeren PBS ve NH_4OH içeren distile su ile deselülerizasyon işlemine ait görüntüler. (A) TCPS yüzeyde deselülerizasyon öncesi mikroskop görüntüleri, (B) %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH_4OH içeren PBS ile deselülerizasyon sonrası görüntüler, (C) 20 mM NH_4OH içeren distile su ile deselülerizasyon sonrası mikroskop görüntüleri. İki yöntemle de hücreler yüzeyden uzaklaşmıştır. MKH-dEM'in yüzeyden kopmadan, kırılmadan ve katlanmadan başarıyla izole edildiği 4x ve 20x objektiflerle çekilen fotoğraflarla tespit edilmiştir.

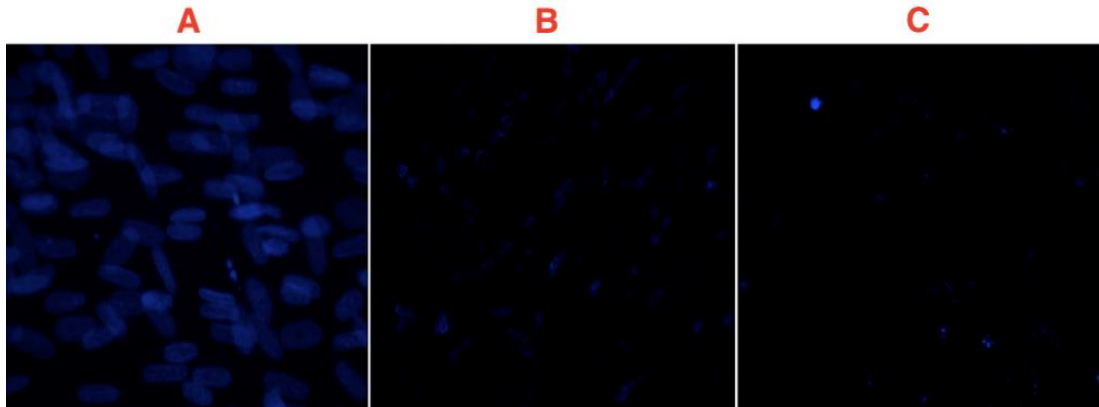
4.7. Deselülerizasyon İşleminin Değerlendirilmesi

4.7.1. Kalıntı DNA Miktarının Araştırılması

DNA miktarlarının deselülerize edilmemiş kontrol kuyularından elde edilen değerlere kıyasla %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH_4OH içeren PBS ile deselülerizasyon sonrası %24,48; 20 mM NH_4OH içeren distile su ile deselülerizasyon aşamasında ise %15,69 seviyesine kadar azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.20). DAPI boyaması ile sitoplazmik içeriğin dışarı çıktığı ve çekirdeğin uzaklaştırıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.20. Total genomik DNA miktar tayini sonuçları. Değerler deselülerize edilmemiş MKH-EM bileşimindeki DNA miktarına göre normalize edilmiştir ($p < 0.05$).

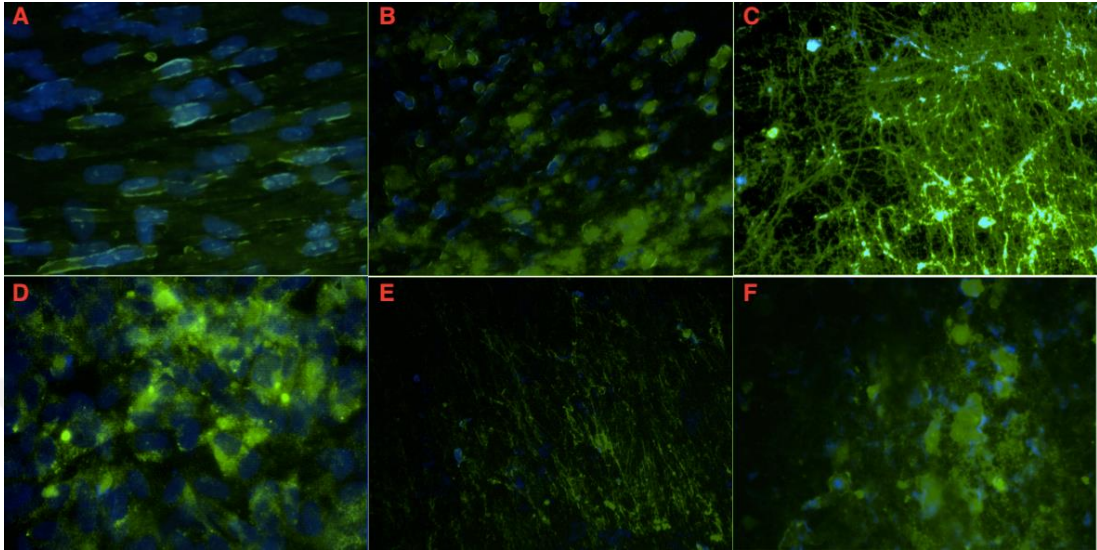


Şekil 4.21. Deselülerizasyon öncesi ve sonrası DAPI boyamaları ile immünfloresan mikroskop görüntüleri. A. TCPS yüzeyde deselülerizasyon öncesi mikroskop görüntüsü, B. %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH₄OH içeren PBS ile deselülerizasyon sonrası görüntü ve C. 20 mM NH₄OH içeren distile su ile deselülerizasyon sonrası mikroskop görüntüsü. 63x objektif kullanılarak fotoğraflar çekilmiştir.

4.7.2. İmmünfloresan Mikroskobu ile İnceleme Yapılması

Askorbik asit içeren DMEM-LG ve osteojenik farklılaşma besiyeri ile üretilen EM yapıları %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH₄OH içeren PBS ve 20 mM NH₄OH içeren distile su ile deselülerize edilmeden önce ve sonra floresan

eklentili mikroskop ile incelendiğinde EM yapısındaki hücrelerin deselülerizasyon işlemi ile ortamdan uzaklaştırıldığı, fibronektin spesifik antikor ile boyanan EM yapısının korunabildiği gözlenmiştir (Şekil 4.22).

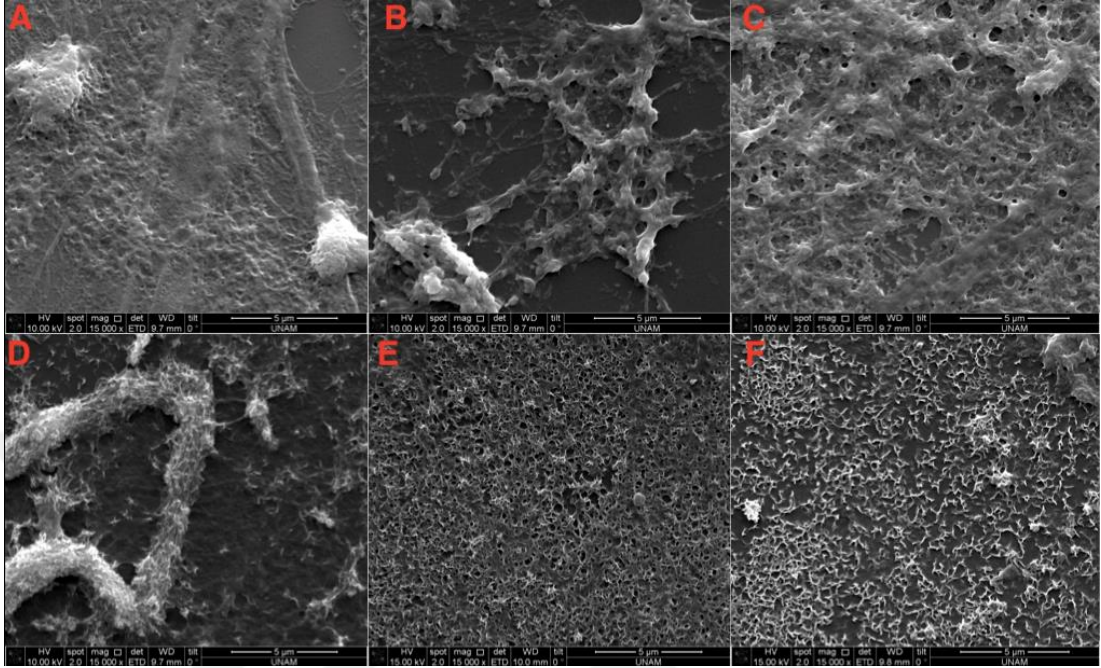


Şekil 4.22: İmmünfloresan çalışma sonuçlarının görüntüleri. (A) Askorbik asit kullanılarak üretilen EM yapısının deselülerizasyon öncesi, (B) %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH₄OH içeren PBS ve (C) 20 mM NH₄OH içeren distile su ile deselülerizasyon işlemi sonrasındaki görüntüleri. (D) Osteojenik farklılaşma besiyeri kullanılarak üretilen EM yapısının deselülerizasyon öncesi, (E) %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH₄OH içeren PBS ve (F) 20 mM NH₄OH içeren distile su ile deselülerizasyon işlemi sonrasındaki görüntüleri. 63x objektif ile fotoğraflar çekilmiştir. (Fibronektin –Yeşil / DAPI- Mavi).

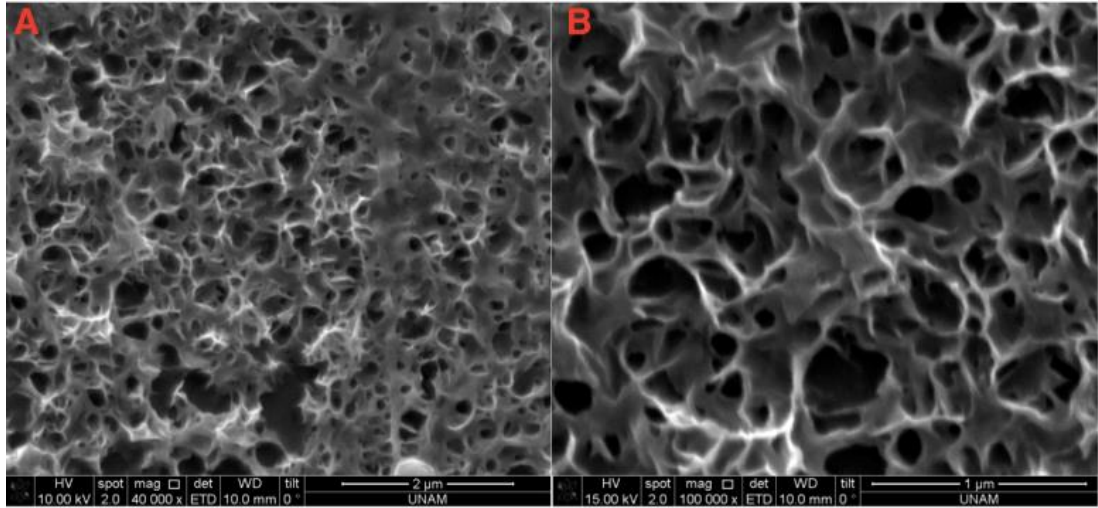
4.7.3. Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu ile İnceleme Yapılması

Askorbik asit içeren DMEM-LG ve osteojenik farklılaşma besiyeri kullanılarak EM üretimi ve sonrasında deselülerize edilmiş EM yapıları elektron mikroskobu kullanılarak incelendiğinde TCPS yüzeyde EM yapısının kullanılan kültür ortamı bileşimine göre farklılık gösterdiği, deselülerizasyon işlemi öncesinde hücrelerin EM üzerinde tespit edilebildiği, deselülerizasyon işlemi sonrasında ise ortamdan uzaklaştırıldığı gözlenmiştir. EM üretimi aşamasında askorbik asit kullanımına kıyasla osteojenik farklılaşma besiyerinin daha yoğun, daha homojen bir yapı oluşturduğu, %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH₄OH içeren PBS ile deselülerize edilmiş EM yapıları ölçek büyütülerek incelendiğinde (40000x ve

100000x) ise yapının gözenekli bir morfolojiye sahip olduğu saptanmıştır (Şekil 4.23 ve 4.24).



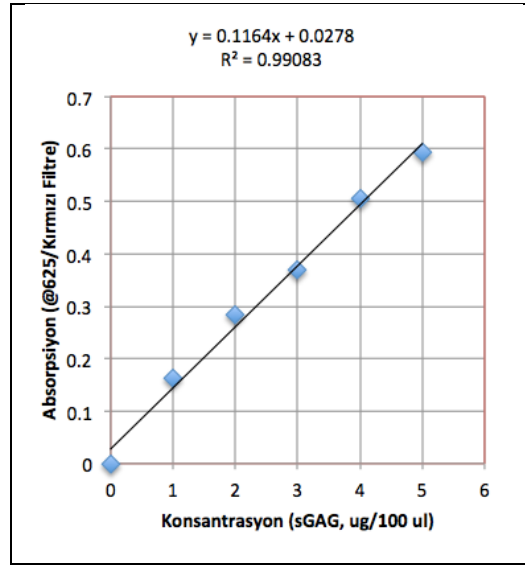
Şekil 4.23. Çevresel taramalı elektron mikroskobu görüntüleri-I. (A) Askorbik asit kullanılarak üretilen EM yapısının deselülerizasyon öncesi, (B) %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH_4OH içeren PBS ve (C) 20 mM NH_4OH içeren distile su ile deselülerizasyon sonrasındaki elektron mikroskobu görüntüleri. (D) Osteojenik farklılaşma besiyeri kullanılarak üretilen EM yapısının deselülerizasyon öncesi, (E) %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH_4OH içeren PBS ve (F) 20 mM NH_4OH içeren distile su ile deselülerizasyon sonrasındaki elektron mikroskobu görüntüleri. Büyütme değeri 15000x.



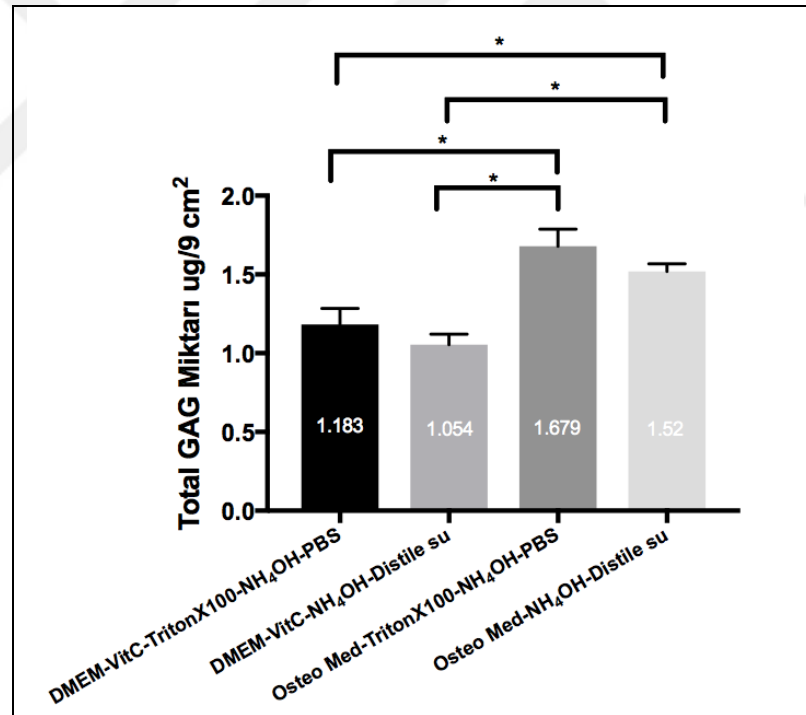
Şekil 4.24: Çevresel taramalı elektron mikroskobu görüntüleri-II. Osteojenik farklılaşma besiyerinde %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH_4OH içeren PBS ile deselülerize edilmiş olan EM yapısının elektron mikroskobu ile daha detaylı incelendiğinde aselüler yapıda gözenekli morfolojiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Büyütme değeri 40000x ve 100000x.

4.7.4. Total Glukozaminoglikan (GAG) Miktarının Saptanması

Kit içeriğindeki referans standartlar ve GAG yapısını boyayan madde kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş (Şekil 4.25) ve spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Askorbik asit içeren DMEM-LG ile osteojenik farklılaşma besiyeri kullanılarak üretilen EM yapılarında %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH_4OH içeren PBS ve 20 mM NH_4OH içeren distile su ile deselülerizasyon işlemi sonrası total GAG miktarı hesaplanmıştır (Şekil 4.26).



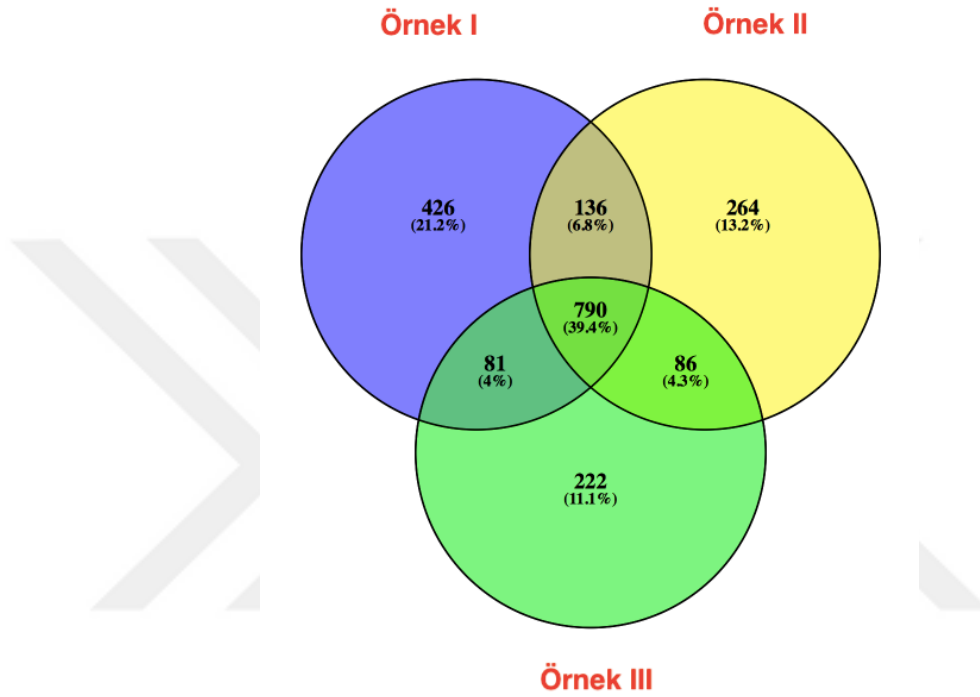
Şekil 4.25. Kalibrasyon eğrisi. Referans standartlar kullanılarak elde edilen absorpsiyon değerleri ile denklem oluşturulmuş ($y=0.1164x + 0.0278$), ($R^2=0,99083$) ve grafik çizilmiştir.



Şekil 4.26: Total GAG miktarı grafiği. Ölçülen total GAG miktarları sırasıyla 1.183, 1.054, 1.679 ve 1.52 μg 'dır. Elde edilen sonuçlara göre osteojenik farklılaşma besiyeri kullanımı ile daha fazla GAG üretilmiş, istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmıştır ($p<0,05$). Deselülerizasyon yöntemleri kıyaslandığı zaman istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiş ancak Triton X-100 ve 20 mM NH₄OH içeren PBS kullanımı ile EM bünyesinde daha fazla GAG korunmuştur ($p>0,05$).

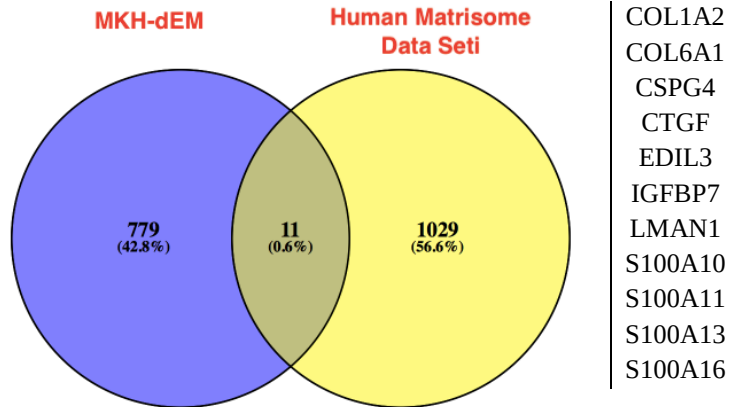
4.8. Total Protein İzolasyonu ve Protein Kompozisyonunun Araştırılması

Toplamda 3 örnek kullanılarak izole edilen protein çözeltisi 9 tekrarlı olacak şekilde analiz edilerek (n=3, toplam 9 analiz) %0,01 FDR (*false discovery rate*) ile 2005 farklı protein tanımlanmıştır. 2005 protein içerisinde 790 tanesinin (%39,4) her üç örnek içerisinde de bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.27).



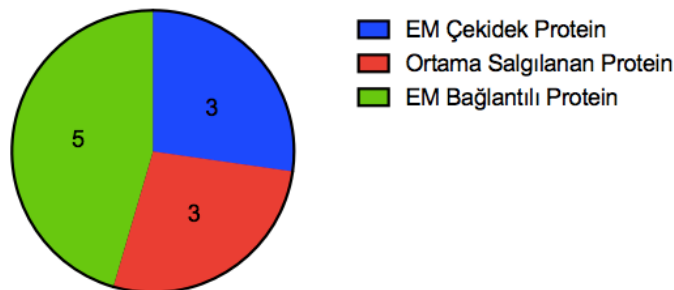
Şekil 4.27. Saptanan proteinlerin örneklere göre dağılımının gösterimi. Elde edilen sonuçlara göre 790 proteinin (%39,4) her üç örnekte de bulunduğu saptanmıştır.

790 protein insan matrisom veri seti (Human Matrisome Data Set) ile karşılaştırıldığında 11 proteinin eşleştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.28).



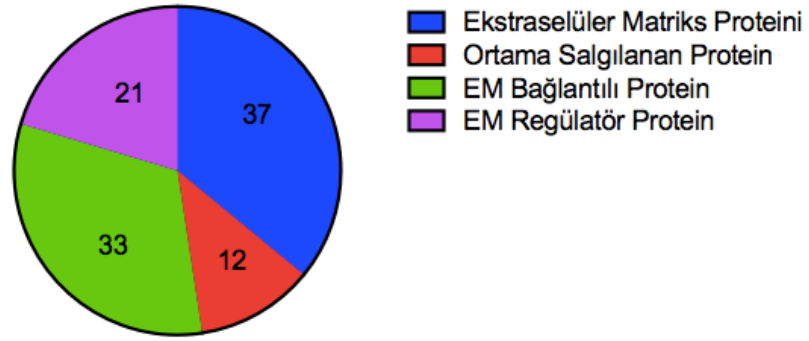
Şekil 4.28. Saptanan 790 MKH-dEM proteinin insan matrizom veri seti ile kıyaslanmasının venn şeması ile gösterimi ve eşleşen proteinlerin listesi.

Eşleşen 11 proteinden COL1A2, COL6A1, CSPG4'ün EM yapısını oluşturan protein ailesi üyesi; EDIL3, CTGF, IGFBP2'nin hücreler tarafından ortama salgılanan EM bünyesine tutunan protein ailesi üyesi ve LMAN1, S100A10, S100A11, S100A13, S100A16'nın ise EM bağlantılı protein ailesi üyesinden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. İnsan matrizom verisi ile eşleşen proteinlerin EM ve ilişkili protein gruplarına göre dağılım grafiği.

3 örnek için toplamda tayin edilen 2005 protein, EM ve ilişkili protein gruplarına göre araştırıldığında ise veri seti ile 103 protein eşleşmiştir (EK-1). 103 proteinden 37 tanesi EM yapısını oluşturan protein ailesi üyesi, 33 tanesi EM bağlantılı protein ailesi üyesi, 21 protein EM yapısını regüle eden protein ailesi üyesi iken 12 protein ise ortama salgılanan EM bünyesine tutunan protein ailesi üyesi olduğu saptanmıştır (Şekil 4.30).



Şekil. 4.30. 3 örnek bünyesinde toplamda tayin edilen 2005 proteinden EM ve ilişkili protein gruplarına giren proteinlerin dağılım grafiği

5. TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmalardan elde edilen önemli sonuçlarla MKH kaynaklı terapötik etki kabul edilmiş durumdadır. Araştırmacılar artık etki mekanizmasını aydınlatmak, daha güvenli hale getirmek ve kişiselleştirilmiş tıp kavramına göre uyumlu şekle dönüştürmeye çalışmaktadır. MKH birden fazla dokudan izole edilebilir olmasına rağmen kemik iliği hala MKH izolasyonu için ana kaynak olarak kabul edilmektedir. Hatta, FDA'ya yapılan MKH kaynaklı yeni araştırma ilacı (*Investigational New Drug*, IND) başvurularının yarısından fazlasının, kemik iliği kaynaklı olduğu göze çarpmaktadır (7). Ancak kemik iliği izolasyonu donörde ağrı ve strese neden olan, lokal ve/veya genel anestezi altında yapılan, eğitimli personel ve ameliyathane koşulları gerektiren girişimsel bir işlemdir (211). Kemik iliği nakli, hematopoetik kök hücre nakli amacıyla hematolojik, metabolik hastalıklar ve immün sistem bozukluklarında yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Sadece Avrupa'da 2012 yılında 35.000'in üzerinde, 2014 yılında ise 40.000'in üzerinde hematopoetik kök hücre naklinin yapıldığını ve Türkiye'nin de son 10 yıl içerisinde en fazla nakil yapan 5 ülke arasına girdiği bildirilmiştir (212, 213). Nakil işlemi sırasında kullanılan sonrasında tıbbi atık olarak uzaklaştırılan filtre ve torba sistemlerinin MKH izolasyonu amacıyla değerlendirilmesi bu aşamada önem kazanmaktadır.

Bu çalışma kapsamında kullandığımız filtre ve torba sistemlerinden izole edilen hücre sayısı 13×10^6 ile 100×10^6 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Dağılım genişliği, kullandığımız örneklem büyüklüğü kadar ($n=5$), donör yaşı, kilosu, cinsiyeti, nakil sırasında sistem içerisine aktarılan aspire edilmiş kemik iliği hacmi ve nakil öncesi donöre uygulanan hazırlık rejimi (mobilizan ajan kullanılma) durumu ile orantılıdır. Literatürde kısıtlı çalışma olmakla birlikte mevcut yayınlar incelendiğinde filtre ve/veya torba sistemlerinden izole edilen hücrelerin de geniş dağılım gösterdiği tespit edilmiştir (214-217). Sistem bünyesinde takılan hücrelerin izole edilmesi esnasında uygulanan fiziksel kuvvet (çalkalama, bastırma) ve eritrosit yükünü azaltmak amacıyla kullanılan yıkama çözeltisinin MKH izolasyonu işlemini hızlandırdığı ve kolaylaştırdığını düşünmekteyiz. MKH izolasyonu amacıyla yaygın olarak kullanılan, farklı yoğunluklu (1,0-1,3 g/mL) polimerik çözeltiler (Ficoll-

paqueTM, PercollTM ve RosetteSepTM) ile oluşturulan dansite gradient yöntemi ise görece daha uzundur ve hücreler sabit olmayan ara fazdan toplandığı için uygulaması daha zordur. Ayrıca polimerik çözeltinin uzaklaştırılması için PBS ile tekrarlı yıkama ve santrifüjleme işlemi sonucu hücre kaybı daha fazla olmaktadır (218-220).

In vitro koşullarda hücre kültürü süreci başlatıldıktan sonra PCR yöntemi kullanılarak mikoplazma kontaminasyonu araştırılmış ve kontaminasyon saptanmamıştır. Mikoplazma kontaminasyonunun *in vitro* koşullarda tespiti oldukça zor olmakla birlikte, hücre bölünmesi ve çoğalmasını yavaşlatan, protein, RNA ve DNA sentezini bozan, gen ekspresyonu ve sinyalizasyon mekanizmasını etkileyen, membran ve organel kompozisyonuna zarar veren, kromozomal değişikliklere sebep olan önemli bir biyolojik safsızlıktır (221, 222). Hatta literatürdeki mevcut yayınların %35'inin mikoplazma kontamine hücreler kullanılarak elde edildiği bildirilmektedir (223). Bu durum elde edilen sonuçların güvenilirliğini azaltmaktadır. Farklı donör kaynaklı hücre kültürü işleminde mikoplazma yükünün olmadığının gösterilmesi, diğer iş paketlerinin gerçekleştirilmesi ve elde edilen sonuçların yorumlanması aşamasında oldukça önemlidir.

Hücre kültürü çalışmaları ile plastiğe yapışan ve koloni oluşturarak çoğalan, iğsi görümlü, özgül antijen ekspresyonuna sahip, uygun kimyasallar varlığında adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşabilen hücrelerin gözlenmesi, MKH karakterizasyonu için optimum kriter olarak kabul edildiğinden (82), izole edilen hücrelerin MKH olduğunun, filtre ve torba sistemlerinin MKH kaynağı olarak kullanılabileceğinin doğrulanmasını sağlamıştır. Literatürde AMEM, DMEM-HG, OptimemTM tabanlı besiyerlerinin ve MCDB201TM gibi ek bileşenlerin kullanımına ilişkin sonuçlar bulunmakla birlikte (224, 225), çalışma boyunca hücre kültürü işleminde temel olarak kullandığımız DMEM-LG, %10 FBS ve 2 mM L-Glutamin bileşiminin MKH çoğalması, idamesi ve köklülük özelliklerinin korunmasında yeterli olduğu saptanmıştır.

Çalışmanın temel konusu olan *in vitro* kültür ortamında EM üretimi aşamasında normal besiyeri, 50 mg/L askorbik asit içeren besiyeri, aMEM ve

osteojenik farklılaşma besiyeri denenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar tek başına DMEM-LG ve %10 FBS kullanımının EM üretimi için uygun ve yeterli olmadığını göstermiştir. Literatür ile uyumlu olarak 50 mg/L konsantrasyonda askorbik asit kullanıldığında hücrelerin daha sıkı yerleşim gösterdiği, EM üretimini arttırdığı tespit edilmiştir. Hatta normal kültür ortamı kullanılarak EM üretimi aşamasında kültür kabı içerisinde bölgesel olarak boşlukların kaldığı, ortama askorbik asit ilavesi ile bu boşlukların kapandığı gözlenmiştir. Bu bulguların, askorbik asit kullanımı ile kollajen başta olmak üzere diğer proteinlerin sentezinin artmasına ve MKH köklülüğünün korunduğuna ilişkin sonuçlarla (178-181) uyumlu olduğu düşünülmektedir. Bu aşamada, bileşiminde 50 mg/L askorbik asit bulunan AMEM denendiğinde de, EM üretimi açısından askorbik asit ilave içeren normal besiyeri ile aynı etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Bileşiminde doğrudan askorbik asit içerdiği için AMEM daha stabil ve kullanımı daha kolay olsa da, yüksek ölçekte EM üretim sürecinde maliyetin arttığı tespit edilmiştir. Osteojenik farklılaşma besiyeri kullanılarak EM üretimi sürecinde ise EM yapısının daha yoğun ve fazla olduğu, osteojenik farklılaşma ile karakterize koyu kahve-siyah renkli kalsiyum depozitlerinin oluştuğu gözlenmiştir. Bu aşama MKH tarafından kemik yapısına benzer EM üretimini sağladığı için literatürde özel üretim olarak adlandırılan sürece örnek teşkil etmektedir.

EM üretim süreciyle ilgili literatürdeki yayınlar incelendiğinde kültür yüzeyi üzerine protein ve/veya polimer ile kaplama yapıldığında, hücre yapışması, çoğalması ve EM üretiminin hızlandığı, deselülerizasyon aşamasında ise yapının yüzeyden kopmasının engellendiği açıklanmaktadır. Ancak kaplama materyali üzerinde geliştirilen EM yapısı ile kaplama birbirinden ayıramayacağı gibi, çoğalma ve EM üretim aşamasında MKH gen ve protein ekspresyonu etkilenmekte ve bu durum dolaylı olarak EM kompozisyonunda değişime neden olmaktadır (24, 159, 181, 186, 187, 193, 226). Girişime neden olacak bu durumu ortadan kaldırmak amacıyla, çalışma kapsamında MKH kültürü için temel yüzey olarak kabul edilen TCPS özellikle kültür kapları kullanılmıştır.

Çalışma kapsamında EM izolasyonu ve deselülerizasyon sürecinde literatürde yaygın olarak kullanılan yöntemler denenmiştir. Kullanılan yöntemlerin *1-Hücre tipi* ve *2-Üretilen EM yapısı*'na göre optimize edilmesi gerektiği gözlenmiştir. Örneğin tekrarlı dondurma çözme yönteminde yüzeyde kırıklar ve kopmalar tespit edilirken, soğuk EDTA uygulamasının ise yüzeyden ayrılmaya yetecek kadar etkili olmadığı saptanmıştır. Triton X-100 ve NH₄OH içeren PBS ile NH₄OH içeren distile suyun, MKH kaynaklı EM yapısının aselüler hale getirilmesinde başarılı ve etkili olduğu, ancak bu işlemin 37°C'de inkübasyon yapılarak uygulanması gerektiği, yaygın olarak kullanılan düşük hızda orbital çalkalayıcıda inkübasyon veya pipetleme işleminin üretilen EM'nin yüzeyden kopmasına, tek tabaka özelliğın bozularak kenarlardan katlanmasına neden olduğu gözlenmiştir. Bu süreçte, deselülerizasyon işlemi sonrasında yıkama aşaması da oldukça önemlidir. İlk yıkama aşamasında Ca⁺²/Mg⁺² içeren PBS kullanımının önemli bir etkiye sahip olduğu ve yapının monolayer şekilde yüzeyde korunmasını sağladığı tespit edilmiştir. Hücre adezyonu işlemi, pH bağımlı şekilde, negatif yüklü yüzeyde divalent katyon iyonların varlığı ile düzenlendiğinden (227, 228); benzer etki ile deselülerize edilmiş EM kompozisyonunda bulunan proteinlerin konformasyonunun, yapısının ve kararlılığının iyon etkisi ile değişerek (229) TCPS üzerinde tutunmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

EM bütünlüğünün makroskobik ve mikroskobik seviyede korunmasını sağlayan deselülerizasyon yöntemleri saptandıktan sonra kalıntı DNA içeriğini incelenmiştir. Kalıntı DNA içeriğinin saptanması, deselülerizasyon işlemi sonrasında elde edilen materyalin *in vivo* kullanıma uygunluğunu değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Elde edilen sonuçlara göre genomik DNA miktarı, kontrole kıyasla Triton X-100, NH₄OH içeren PBS kullanıldığında %24,48 seviyesine, NH₄OH içeren distile su kullanıldığında ise %15,69 seviyesine kadar azaltıldığı ve bu ölçümler arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. DAPI boyası ile elde edilen görüntüler de bu sonuçları desteklemiştir. Literatürde kabul gören kalıntı DNA limiti, 300 bp'den kısa olacak şekilde 50 ng DNA/mg deselülerize edilmiş ve kurutulmuş EM olduğu bildirilmektedir (230). Çalışmamız kapsamında EM yapıları kurutulmamıştır ancak, normalize edilmemiş

DNA miktarları Triton X-100 ve NH_4OH içeren PBS ile deselülerize edilmiş MKH-dEM bünyesinde ortalama 42,53 ng, NH_4OH içeren distile su ile deselülerize edilmiş MKH-dEM bünyesinde ise 27,28 ng olarak ölçülmüştür. Bu değerler deselülerizasyon yönteminin daha uzun sürede yapılması, deselülerize edici ajan konsantrasyonunun ve yıkama işlemlerinin artırılması ile azaltılabilir ancak bu sefer de EM kompozisyonunda yapısal ve içerik olarak bozulmalar meydana gelebilir. Ancak DNA yapısının tamamen uzaklaştırılması mümkün değildir. Gilbert ve ark. (197) tarafından yapılan çalışmada deselülerize edilmiş ticari olarak kullanılan ürünlerde bile kalıntı DNA olduğu bildirilmiştir. Ayrıca materyalin *in vivo* kullanımını ve immünojenik karakterini değerlendirmede kalıntı DNA miktarının saptanması tek başına yeterli değildir. Örneğin ksenojenik ve allojenik nakillerde doku bünyesindeki kalıntı MHC (*major histocompatibility complexes*) miktarının saptanması daha önemlidir (191). Bu çalışma kapsamında elde edilen MKH-dEM yapısının *in vivo* kullanımı hedeflenemediğinden kalıntı MHC miktar tayini yapılmamıştır.

İmmünfloresan tekniği ile, askorbik asit içeren DMEM-LG ve osteojenik farklılaşma kültür ortamı ile üretilen EM yapıları, deselülerizasyon öncesinde ve Triton X-100 ve NH_4OH içeren PBS ve NH_4OH içeren distile su ile deselülerizasyon sonrasında fibronektin spesifik antikoru ve DAPI ile boyanarak incelenmiştir. Elde edilen görüntülere göre, seçilen deselülerizasyon yöntemleri hem DNA miktarını azaltmış, hem de EM'in majör bileşenlerinden olan fibronektin yapısını korumuştur. Bu veriler literatürdeki yayınlar ile uyumlu olmakla birlikte, kalitatif özellikte olduğu için iki farklı deselülerizasyon yönteminin birbirine göre kıyaslanmasında yeterli değildir. Fibronektin dimerik yapıda bir protein olup (440 kDa), EM kompozisyonunda integrin aracılı hücre adhezyonu sürecinde major komponent olarak görev almaktadır. En bilinen integrin bağlanma motifi olan RGD (Arg-Gly-Asp) sekansı fibronektin yapısında bulunmaktadır. Fibronektin yapısının korunduğunun gösterilmesi önemlidir çünkü Ramanathan ve Karuri tarafından yapılan çalışmada dEM bünyesindeki fibronektin seviyesi azaldığı zaman *in vitro* koşullarda yapı üzerine hücre adhezyonunun azaldığı, *in vivo* uygulamalarda ise immün yanıtın arttığı tespit edilmiştir (231, 232).

ESEM sonuçları bu çalışmanın önemli aşamalarından birini oluşturmaktadır. Ters faz ışık mikroskobu ve floresan parçalı mikroskop sadece belirli seviyede incelemeye olanak tanırken, ESEM ile askorbik asit içeren DMEM-LG ve osteojenik farklılaşma besiyerlerinin ve iki farklı deselülerizasyon yönteminin EM topografisine olan etkisi 1 μm 'lik ölçeğe kadar değerlendirilmiştir. Elde edilen görüntülere göre, deselülerizasyon işlemi öncesinde hücreler EM ile üzerinde ve/veya içerisinde parlak beyaz renk ile tespit edilirken, deselülerizasyon işlem sonrasında sitoplazmik içeriğin azaltılması sonucu bu görüntünün değiştiği saptanmıştır. Askorbik asit içeren DMEM-LG'ye kıyasla osteojenik farklılaşma besiyeri ile daha yoğun, daha benzer ve muntazam yapıda EM üretildiği tespit edilmiştir. Bu sonucun, diğer iş paketlerinden elde edilen verilerle uyumlu olduğu saptanmıştır. Osteojenik farklılaşma besiyeri kullanımı ile üretilen ve Triton X-100 ve NH_4OH içeren PBS ile deselülerize edilen MKH-dEM yapısının insan trabeküler kemik görüntüsüne benzer morfolojiye sahip olduğu gözlenmiştir (233). Literatürde konu ile ilgili mevcut çalışmalar arasında bu tür bir sonuç bulunmadığı tespit edilmiş olup daha çok fibriller yapıda MKH-dEM'in izolasyonu bildirilmiştir (181, 202). Trabeküler kemik, kök hücre nişinin bulunduğu yer olarak tanımlanmaktadır. Elde ettiğimiz bu sonuç, kemik iliği nişinin osteojenik farklılaşmış MKH tarafından yapıldığı (51) *in vitro* kültür ortamında niş benzeri bir yapının oluşturulabildiği savını desteklemektedir. *In vitro* kültür ortamında trabeküler kemik morfolojisine sahip yapının MKH-dEM ile üretilibildiğinin gösterilmesi bu tezin önemli çıktılarından biridir.

Glukozaminoglikanlar (GAG) tekrarlı disakkarit ünitelerini bünyesinde barındıran, negatif yüklü, hidrofilik karakterli, uzun, dallanmamış zincirlerdir. GAG yapıları protein ile bağlanarak proteoglikan olarak adlandırılmakta, ECM bünyesinde su tutulumunu ve fiziksel güçlere karşı direncin korunmasını sağlamaktadır (234). Kullanılan Glycosaminoglycan Assay Blyscan™ Kiti (Biocolor, İngiltere) ile, MKH-dEM bünyesindeki sülfatlanmış GAG yapılarının 1,9-dimethylmethylen blue ile renkli bileşenler oluşturmasıyla spektrofotometrik olarak miktar tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, osteojenik farklılaşma besiyeri ile EM bünyesinde daha fazla GAG üretiminin sağlandığı tespit edilmiştir. Deselülerizasyon yöntemleri arasında ise istatistiksel olarak fark olmamakla birlikte Triton X-100 ve NH_4OH

içeren PBS ile deselülerizasyon işlemi ile EM bünyesinde daha fazla GAG yapısının korunduğu saptanmıştır.

Total protein kompozisyonunun aydınlatılması bu çalışma bünyesindeki önemli iş paketlerinden birisidir. Literatürdeki mevcut çalışmalar, MKH-dEM yapısının kültür yüzeyi olarak kullanılmasını ve böylece *in vitro* ve *in vivo* koşullarda hücrel olaylardaki değişimini saptamayı hedeflemiştir (190, 191, 235). Ancak hücresiz tedavi yaklaşımına göre, elde edilen prelinik sonuçların klinikte uygulanabilir hale gelmesinde terapötik etkiden sorumlu biyoaktif bileşen veya bileşenlerin saptanması hayati önem taşımaktadır. Çalışma kapsamında daha önceki iş paketlerinden elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, osteojenik farklılaşma besiyeri ile üretilip, %0,5'lik Triton X-100 ve 20 mM NH₄OH içeren PBS ile deselülerize edildiğinde insan trabeküler kemik benzeri morfolojiye sahip olduğunu gösterdiğimiz MKH-dEM yapısı (n=3, toplam 9 tekrar) nLC-MS/MS ile protein bileşimi açısından değerlendirildiğinde 2005 farklı protein %0,01 FDR ile tanımlanmıştır. Bu sonuç, RIPA protein izolasyon tamponu, çözeltiden enzimatik kesme yöntemi ve nLC-MS/MS tekniği ile elde edilmiş olup, farklı izolasyon yöntemleri ve cihaz kombinasyonların kullanımı ile protein sayısında değişiklik olabilir (236, 237).

EM protein kompozisyonu (*matrisome*) başlıca I- EM yapısını oluşturan çekirdek proteinler, II- Yapıyı düzenleyen regülatör proteinler, III- Çekirdek proteinler ile ilişkili olan proteinler ve IV- Ortama salgılanmış, EM yapısına tutunmuş, bağlanmış proteinler olmak üzere dört ana gruba ayrıldığından (25) tanımlanan proteinler de bu gruplara göre Human Matrisome Data Set (209) ile karşılaştırılmıştır. Üç örnek bünyesinde de bulunduğu gösterilen 790 proteinden yalnızca 11 protein ile eşleşme saptanmıştır. Bu proteinlerden kollajen tip I alfa-2 zinciri (COL1A2), kollajen tip 6 alfa-1 zinciri (COL6A1) ve kondroitin sülfat proteoglikan-4 (CSPG4) EM yapısını oluşturan çekirdek protein ailesi üyesidir. COL1A2'nin eksprese ettirildiği osteoprojenitör hücrelerin *osteogenesis imperfecta* hastalığında (238), COL6A1'in ise kırıkta hasarında MKH ile birlikte kullanılmasına ilişkin (239) çalışmalar literatüre yeni girmiştir. CSPG4'ün ise sağlıklı dokularda köklülüğün ve hipoksik özelliğin korunmasında, anjiyogenezde ve

perisit fonksiyonlarında görev aldığı bildirilmiştir (240, 241). Bağ doku büyüme faktörü (CTGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayan protein-2 (IGFB2) ise hücreler tarafından salgılanan, EM yapısına tutunan protein ailesindendir. Battula ve ark. (242) CTGF'nin kemik iliğinde adipojenik farklılaşmayı ve lösemik hücrelerin kemik iliğine yerleşmesini baskılayıcı, hastalığın ilerlemesini engelleyici etkide olduğunu bildirmiştir. IGFB2'nin niş bünyesinde hematopoetik kök hücre çoğalmasını ve idamesini destekleyici görevi bulunmaktadır (243, 244). Mannoz bağlayan protein-1 (LMAN1), kalsiyum bağlayan protein A10 (S100A10), A11 (S100A11), A13 (S100A13) ve A16 (S100A16) ise EM bağlantılı protein ailesi üyesindendir. LMAN1'in hücre yaşlanmasını engelleyici görevi olduğu ve yaşlı MKH'de arttığı bildirilmiştir (245). S100 protein ailesinin ise hipoksik özelliklerin idamesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (246, 247). Her ne kadar EM bünyesini oluşturan proteinler saptanabilmiş olsa da yalnızca 11 protein üzerinden eşleme nedeni araştırıldığında Human Matrisome Data Setinin (209) kalın bağırsak, karaciğer, multiple myeloma, melanoma, metastatik dokular, meme kanseri ve over kanseri dokularına ait sonuçlardan elde edilen verileri de barındırdığı, yalnızca iki çalışmada insan kemik iliği ve MKH-dEM ile ilgili sonuçların bulunduğu, MKH-dEM üretim aşamasında ise askorbik asit kullanıldığı tespit edilmiştir. Bu sebeplerden ötürü veritabanı ile eşleşmeyen proteinler çalışmamızın özgünlüğü ve önemini arttırmaktadır.

Toplamda tanımlanmış olan 2005 protein, EM ve ilişkili proteinler açısından Uniprot (208) üzerinden manuel olarak araştırıldığında 103 proteinin eşleştiği saptanmıştır. Bu proteinler arasında benzer şekilde 1- EM yapısını oluşturan, 2- EM yapısına bağlantılı olan, 3- Ortama salgılanıp EM bünyesine bağlanan ve 4- EM yapısını regüle etme özelliğine sahip olan proteinler de tespit edilmiştir (EK-1). EM yapısını oluşturma ve regüle etme görevlerinin yanında CTHRC1, FND3CB, FRAS1 ve TNC'nin osteojenik farklılaşmayı arttırdığı; CXCR4, DCN, EGFLAM, SDC2 ve THBS1'in hematopoetik kök hücrenin nişe tutunmasını ve sessiz evrede kalmasını sağladığı; FBN1'in eritroid projenitörleri, PRG4'ün ise megakaryosit farklılaşmasının indüklendiği; EDIL3, ENG ve THBS1'in vasküler sistemi indüklendiği, PSAP, TECTA ve TNC'nin ise nörojenik sistemin indüklendiği tespit

edilmiştir. ARP2, CEMİP ve EDIL3'ün hücre migrasyonunda ve hipokside; GAL1, LGALS1 ve LGALS3'ün immünregülasyonda; MUC16 ve MUC18'in ise MKH öncülü olduğu düşünülen, endotel hücrelere de farklılaşabilen perisit hücrelerin fonksiyonunda etkili olduğu saptanmıştır. Bu bilgiler ışığında, osteojenik farklılaşma besiyeri sonrası elde edilen MKH-dEM yapısının protein içeriğinin tayin edilmesinin mevcut yayınlar içerisinde önemli katkı sağlayacağı, özgün çıktılara sahip olduğu (248), hem kemik iliği niş yapısını oluşturan ve hücrel olaylarda sorumlu proteinlerin tespit edilmesinde, hem de olası terapötik hedeflerin, terapötik etkiden sorumlu faktörlerin ve biyobelirteçlerin tanımlanmasında belirleyici rol oynayacağını düşünmekteyiz (249, 250).



6. SONUÇ

Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar doğrultusunda kemik iliği naklinde kullanılan, sonrasında tıbbi atık olarak uzaklaştırılan filtre ve torba sistemlerinden kolay, hızlı ve etkili biçimde hücre izole edilebileceği belirlenmiştir. İzole edilen hücrelerin plastiğe yapışarak ve koloni oluşturarak çoğaldığı, spesifik stromal antijen ekspresyonuna sahip olduğu ve adipojenik, osteojenik ve kondrojenik (*multilineage*) farklılaşma gösterdiği için MKH olarak tanımlanabileceği gösterilmiştir. İzole edilen MKH'den *in vitro* kültür koşullarında standart kültür yüzeyinde (TCPS) askorbik asit ilave edilmiş büyüme besiyeri ve osteojenik farklılaşma besiyeri kullanılarak EM üretimi yapılabileceği tespit edilmiştir. Üretilen EM'in, Triton X-100 ve NH₄OH içeren PBS ve NH₄OH içeren distile su ile aselüler hale getirilebildiği ve monolayer yapısının korunarak izole edilebildiği ters faz ışık ve elektron mikroskobu incelemeleri, immunfloresan çalışması, total genomik DNA içeriği ve GAG miktarının tayini ile gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, osteojenik farklılaşma besiyeri kullanılarak EM üretimi, Triton X-100 ve NH₄OH içeren PBS ile deselülerizasyon işlemiyle kişiselleştirilmiş tıp konsepti ile uyumlu ve özel yapım olarak da adlandırılan, insan kemik iliği niş mimarisine benzer yapıda MKH-dEM izole edildiği saptanmıştır. Protein kompozisyonu, nLC-MS/MS ile araştırıldığında 2005 farklı protein tespit edilmiştir. Veritabanı analizleri sonucu i- EM yapısını oluşturan, ii- EM ile bağlantılı olan, iii- EM yapısını regüle eden ve iv- EM yapısına tutunan sekretuar protein ailesinden önemli proteinler ve kemik iliğindeki kök hücre nişinin idamesi ve hücresel fonksiyonlarında görevli olan önemli proteinlerin de MKH-dEM bünyesinde bulunduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak hem mimari olarak hem de nişin idamesi ve kök hücre fonksiyonlarını düzenleyen proteinleri barındıran, *in vitro* kültür ortamında kemik iliği nişine ait bir model geliştirilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Rubin LL, Haston KM. Stem cell biology and drug discovery. *BMC Biol.* 2011;9:42.
2. Zhang L, McHale CM, Greene N, Snyder RD, Rich IN, Aardema MJ, et al. Emerging approaches in predictive toxicology. *Environ Mol Mutagen.* 2014;55(9):679-88.
3. Mikkola HK, Orkin SH. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development.* 2006;133(19):3733-44.
4. Eggen K. Using stem cells and reprogramming to understand disease. *Regen Med.* 2008;3(6):799-801.
5. Tabar V, Studer L. Pluripotent stem cells in regenerative medicine: challenges and recent progress. *Nat Rev Genet.* 2014;15(2):82-92.
6. Li MD, Atkins H, Bubela T. The global landscape of stem cell clinical trials. *Regen Med.* 2014;9(1):27-39.
7. Mendicino M, Bailey AM, Wonnacott K, Puri RK, Bauer SR. MSC-based product characterization for clinical trials: an FDA perspective. *Cell Stem Cell.* 2014;14(2):141-5.
8. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(6):747-54.
9. Pourgholaminejad A, Aghdami N, Baharvand H, Moazzeni SM. The effect of pro-inflammatory cytokines on immunophenotype, differentiation capacity and immunomodulatory functions of human mesenchymal stem cells. *Cytokine.* 2016;85:51-60.
10. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
11. Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon SJ, Jeon HB, Choi SJ, et al. Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy. *Int J Mol Sci.* 2013;14(9):17986-8001.
12. Baer PC. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J Stem Cells.* 2014;6(3):256-65.
13. van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology.* 2008;47(5):1634-43.

14. Meyerrose T, Olson S, Pontow S, Kalomoiris S, Jung Y, Annett G, et al. Mesenchymal stem cells for the sustained in vivo delivery of bioactive factors. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(12):1167-74.
15. Roche S, D'Ippolito G, Gomez LA, Bouckennooghe T, Lehmann S, Montero-Menei CN, et al. Comparative analysis of protein expression of three stem cell populations: models of cytokine delivery system in vivo. *Int J Pharm.* 2013;440(1):72-82.
16. Hidalgo-Bastida LA, Cartmell SH. Mesenchymal stem cells, osteoblasts and extracellular matrix proteins: enhancing cell adhesion and differentiation for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(4):405-12.
17. Scherzer MT, Waigel S, Donniger H, Arumugam V, Zacharias W, Clark G, et al. Fibroblast-Derived Extracellular Matrices: An Alternative Cell Culture System That Increases Metastatic Cellular Properties. *Plos One.* 2015;10(9).
18. Sonam S, Sathe SR, Yim EK, Sheetz MP, Lim CT. Cell contractility arising from topography and shear flow determines human mesenchymal stem cell fate. *Sci Rep.* 2016;6:20415.
19. Chen XD, Dusevich V, Feng JQ, Manolagas SC, Jilka RL. Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2007;22(12):1943-56.
20. Lai Y, Sun Y, Skinner CM, Son EL, Lu Z, Tuan RS, et al. Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix ex vivo: a robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2010;19(7):1095-107.
21. Deutsch ER, Guldborg RE. Stem cell-synthesized extracellular matrix for bone repair. *J Mater Chem.* 2010;20(40):8942-51.
22. Sun Y, Li WP, Lu ZD, Chen R, Ling J, Ran QT, et al. Rescuing replication and osteogenesis of aged mesenchymal stem cells by exposure to a young extracellular matrix. *Faseb J.* 2011;25(5):1474-85.
23. Rao Patabhi S, Martinez JS, Keller TC, 3rd. Decellularized ECM effects on human mesenchymal stem cell stemness and differentiation. *Differentiation.* 2014;88(4-5):131-43.
24. Xing Q, Yates K, Tahtinen M, Shearier E, Qian Z, Zhao F. Decellularization of fibroblast cell sheets for natural extracellular matrix scaffold preparation. *Tissue Eng Part C Methods.* 2015;21(1):77-87.
25. Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(1):a004903.

26. Tajbakhsh S. Stem cell: what's in a name? 2009.
27. Wonders C. Glossary of Stem Cell-Related Terms 2016 [cited 2016]. Available from: <http://www.isscr.org/visitor-types/public/stem-cell-glossary>.
28. Alvarez CV, Garcia-Lavandeira M, Garcia-Rendueles ME, Diaz-Rodriguez E, Garcia-Rendueles AR, Perez-Romero S, et al. Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *J Mol Endocrinol*. 2012;49(2):R89-111.
29. de Wert G, Mummery C. Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. *Hum Reprod*. 2003;18(4):672-82.
30. Hurlbut WB. Framing the future: embryonic stem cells, ethics and the emerging era of developmental biology. *Pediatr Res*. 2006;59(4 Pt 2):4R-12R.
31. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
32. Gonzalez F, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet*. 2011;12(4):231-42.
33. Bilic J, Belmonte JCI. Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cells Versus Embryonic Stem Cells: Close Enough or Yet Too Far Apart? *Stem Cells*. 2012;30(1):33-41.
34. Ogaki S, Morooka M, Otera K, Kume S. A cost-effective system for differentiation of intestinal epithelium from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2015;5:17297.
35. Beers J, Linask KL, Chen JA, Siniscalchi LI, Lin Y, Zheng W, et al. A cost-effective and efficient reprogramming platform for large-scale production of integration-free human induced pluripotent stem cells in chemically defined culture. *Sci Rep*. 2015;5:11319.
36. Baghbaderani BA, Tian X, Neo BH, Burkall A, Dimezzo T, Sierra G, et al. cGMP-Manufactured Human Induced Pluripotent Stem Cells Are Available for Pre-clinical and Clinical Applications. *Stem Cell Reports*. 2015;5(4):647-59.
37. Yaffe MP, Noggle SA, Solomon SL. Raising the standards of stem cell line quality. *Nat Cell Biol*. 2016;18(3):236-7.
38. Trounson A, DeWitt ND. Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(3):194-200.
39. Ferreira LM, Mostajo-Radji MA. How induced pluripotent stem cells are redefining personalized medicine. *Gene*. 2013;520(1):1-6.
40. Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*. 2015;16(3):225-38.

41. Najumudeen AK, Jaiswal A, Lectez B, Oetken-Lindholm C, Guzman C, Siljamaki E, et al. Cancer stem cell drugs target K-ras signaling in a stemness context. *Oncogene*. 2016;35(40):5248-62.
42. Chen K, Huang YH, Chen JL. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(6):732-40.
43. Nassar D, Blanpain C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol*. 2016;11:47-76.
44. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 2008;9(1):11-21.
45. Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*. 2010;327(5965):542-5.
46. Cheung TH, Rando TA. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(6):329-40.
47. Rumman M, Dhawan J, Kassem M. Concise Review: Quiescence in Adult Stem Cells: Biological Significance and Relevance to Tissue Regeneration. *Stem Cells*. 2015;33(10):2903-12.
48. Montagnani S, Rueger MA, Hosoda T, Nurzynska D. Adult Stem Cells in Tissue Maintenance and Regeneration. *Stem Cells Int*. 2016;2016:7362879.
49. Goichberg P. Current Understanding of the Pathways Involved in Adult Stem and Progenitor Cell Migration for Tissue Homeostasis and Repair. *Stem Cell Rev*. 2016.
50. Scadden DT. The stem cell niche in health and leukemic disease. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20(1):19-27.
51. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;505(7483):327-34.
52. Ferraro F, Celso CL, Scadden D. Adult stem cells and their niches. *Adv Exp Med Biol*. 2010;695:155-68.
53. Singh SR. Stem cell niche in tissue homeostasis, aging and cancer. *Curr Med Chem*. 2012;19(35):5965-74.
54. Rezza A, Sennett R, Rendl M. Adult stem cell niches: cellular and molecular components. *Curr Top Dev Biol*. 2014;107:333-72.
55. Knoepfler PS. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells*. 2009;27(5):1050-6.
56. Herberts CA, Kwa MS, Hermesen HP. Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med*. 2011;9:29.

57. Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell*. 2007;128(3):445-58.
58. Caplan AI. Are All Adult Stem Cells The Same? *Regenerative Engineering and Translational Medicine*. 2015;1(1):4-10.
59. Visvader JE, Clevers H. Tissue-specific designs of stem cell hierarchies. *Nat Cell Biol*. 2016;18(4):349-55.
60. Lane SW, Williams DA, Watt FM. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nat Biotechnol*. 2014;32(8):795-803.
61. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood*. 2015;125(17):2605-13.
62. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008;2(4):313-9.
63. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2001;226(6):507-20.
64. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-50.
65. Fernandez M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguell JJ. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant*. 1997;20(4):265-71.
66. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30.
67. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001;98(8):2396-402.
68. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001;44(8):1928-42.
69. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. 2001;3(9):778-84.
70. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.
71. in 'tAnker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FHJ, Willemze R, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. 2003;102(4):1548-9.

72. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*. 2004;22(7):1338-45.
73. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004;22(7):1330-7.
74. Kolaparthi LK, Sanivarapu S, Moogla S, Kutcham RS. Adipose Tissue - Adequate, Accessible Regenerative Material. *Int J Stem Cells*. 2015;8(2):121-7.
75. Li J, Wong WH, Chan S, Chim JC, Cheung KM, Lee TL, et al. Factors affecting mesenchymal stromal cells yield from bone marrow aspiration. *Chin J Cancer Res*. 2011;23(1):43-8.
76. Fossett E, Khan WS. Optimising human mesenchymal stem cell numbers for clinical application: a literature review. *Stem Cells Int*. 2012;2012:465259.
77. Siegel G, Kluba T, Hermanutz-Klein U, Bieback K, Northoff H, Schafer R. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med*. 2013;11:146.
78. Pendleton C, Li Q, Chesler DA, Yuan K, Guerrero-Cazares H, Quinones-Hinojosa A. Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue vs Bone Marrow: In Vitro Comparison of Their Tropism towards Gliomas. *Plos One*. 2013;8(3).
79. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med*. 2014;12:8.
80. Oberbauer E, Steffenhagen C, Wurzer C, Gabriel C, Redl H, Wolbank S. Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. *Cell Regen (Lond)*. 2015;4:7.
81. Rosenbaum AJ, Grande DA, Dines JS. The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment. *Organogenesis*. 2008;4(1):23-7.
82. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
83. Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2009;18(3):487-96.
84. Ning H, Lin G, Lue TF, Lin CS. Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;413(2):353-7.

85. Alvarez R, Lee HL, Hong C, Wang CY. Single CD271 marker isolates mesenchymal stem cells from human dental pulp. *Int J Oral Sci.* 2015;7(4):205-12.
86. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol.* 2000;164(2):247-56.
87. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002;105(1):93-8.
88. Kicic A, Shen WY, Wilson AS, Constable IJ, Robertson T, Rakoczy PE. Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. *J Neurosci.* 2003;23(21):7742-9.
89. Lee KD, Kuo TKC, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology.* 2004;40(6):1275-84.
90. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells.* 2004;22(3):377-84.
91. Arnhold S, Heiduschka P, Klein H, Absenger Y, Basnaoglu S, Kreppel F, et al. Adenovirally transduced bone marrow stromal cells differentiate into pigment epithelial cells and induce rescue effects in RCS rats. *Invest Ophth Vis Sci.* 2006;47(9):4121-9.
92. Qian H, Yang H, Xui WR, Yan YM, Chen QL, Zhu W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate rat acute renal failure by differentiation into renal tubular epithelial-like cells. *Int J Mol Med.* 2008;22(3):325-32.
93. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell.* 2012;10(6):709-16.
94. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant.* 2016;25(5):829-48.
95. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell.* 2011;9(1):11-5.
96. El-Badri NS, Maheshwari A, Sanberg PR. Mesenchymal stem cells in autoimmune disease. *Stem Cells Dev.* 2004;13(5):463-72.
97. Olson SD, Pollock K, Kambal A, Cary W, Mitchell GM, Tempkin J, et al. Genetically engineered mesenchymal stem cells as a proposed therapeutic for Huntington's disease. *Mol Neurobiol.* 2012;45(1):87-98.

98. Drela K, Siedlecka P, Sarnowska A, Domanska-Janik K. Human mesenchymal stem cells in the treatment of neurological diseases. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2013;73(1):38-56.
99. Razavi Tousi SM, Faghihi M, Nobakht M, Molazem M, Kalantari E, Darbandi Azar A, et al. Improvement of Heart Failure by Human Amniotic Mesenchymal Stromal Cell Transplantation in Rats. *J Tehran Heart Cent*. 2016;11(3):123-38.
100. Mohammadi M, Jaafari MR, Mirzaei HR, Mirzaei H. Mesenchymal stem cell: a new horizon in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther*. 2016;23(9):285-6.
101. Ren G, Chen X, Dong F, Li W, Ren X, Zhang Y, et al. Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(1):51-8.
102. Patel DM, Shah J, Srivastava AS. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Int*. 2013;2013:496218.
103. Spaeth EL, Kidd S, Marini FC. Tracking inflammation-induced mobilization of mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*. 2012;904:173-90.
104. Al-Khaldi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: Improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg*. 2003;75(1):204-9.
105. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol-Heart C*. 2004;287(6):H2670-H6.
106. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*. 2008;180(4):2581-7.
107. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)*. 2005;2:8.
108. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-22.
109. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. 2009;113(26):6576-83.
110. Nakagawa H, Akita S, Fukui M, Fujii T, Akino K. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *Brit J Dermatol*. 2005;153(1):29-36.

111. Tang YL, Zhao Q, Qin XY, Shen LP, Cheng LL, Ge JB, et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann Thorac Surg*. 2005;80(1):229-37.
112. Chen L, Xu Y, Zhao J, Zhang Z, Yang R, Xie J, et al. Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS One*. 2014;9(4):e96161.
113. Chen L, Xu Y, Zhao J, Zhang Z, Yang R, Xie J, et al. Correction: Conditioned Medium from Hypoxic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Enhances Wound Healing in Mice. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145565.
114. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, et al. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(7):804-11.
115. Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells*. 2014;32(5):1254-66.
116. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell*. 2015;17(1):11-22.
117. Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Dejeneffe M, Massy M, Libertalis M, et al. Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *Eur J Haematol*. 2006;76(4):309-16.
118. Majd H, Quinn TM, Wipff PJ, Hinz B. Dynamic expansion culture for mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*. 2011;698:175-88.
119. Saleh FA, Frith JE, Lee JA, Genever PG. Three-dimensional in vitro culture techniques for mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*. 2012;916:31-45.
120. Hagmann S, Moradi B, Frank S, Dreher T, Kammerer PW, Richter W, et al. Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Bmc Musculoskel Dis*. 2013;14.
121. Schirmaier C, Jossen V, Kaiser SC, Jungerkes F, Brill S, Safavi-Nab A, et al. Scale-up of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell production in stirred single-use bioreactors under low-serum conditions. *Eng Life Sci*. 2014;14(3):292-303.
122. Diez JM, Bauman E, Gajardo R, Jorquera JI. Culture of human mesenchymal stem cells using a candidate pharmaceutical grade xeno-free cell culture supplement derived from industrial human plasma pools. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6.

123. Oikonomopoulos A, van Deen WK, Manansala AR, Lacey PN, Tomakili TA, Ziman A, et al. Optimization of human mesenchymal stem cell manufacturing: the effects of animal/xeno-free media. *Sci Rep*. 2015;5:16570.
124. Cesarz Z, Tamama K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:9176357.
125. Escobar CH, Chaparro O. Xeno-Free Extraction, Culture, and Cryopreservation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(3):358-65.
126. Maidhof R, Rafiuddin A, Chowdhury F, Jacobsen T, Chahine NO. Timing of mesenchymal stem cell delivery impacts the fate and therapeutic potential in intervertebral disc repair. *J Orthop Res*. 2016.
127. You D, Jang MJ, Kim BH, Choi KR, Lee C, Song G, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell therapy in a rat model of cavernous nerve injury: Preclinical study for approval. *Cytherapy*. 2016;18(7):870-80.
128. Sheashaa H, Lotfy A, Elhousseini F, Aziz AA, Baiomy A, Awad S, et al. Protective effect of adipose-derived mesenchymal stem cells against acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion in Sprague-Dawley rats. *Exp Ther Med*. 2016;11(5):1573-80.
129. Meamar R, Nematollahi S, Dehghani L, Mirmosayyeb O, Shayegannejad V, Basiri K, et al. The role of stem cell therapy in multiple sclerosis: An overview of the current status of the clinical studies. *Adv Biomed Res*. 2016;5:46.
130. Li S, Wang X, Li J, Zhang J, Zhang F, Hu J, et al. Advances in the Treatment of Ischemic Diseases by Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:5896061.
131. Griffin TP, Martin WP, Islam N, O'Brien T, Griffin MD. The Promise of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Diabetic Kidney Disease. *Curr Diab Rep*. 2016;16(5):42.
132. Kean TJ, Lin P, Caplan AI, Dennis JE. MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation. *Stem Cells Int*. 2013;2013:732742.
133. Lucas G, Chase MCV. *Mesenchymal Stem Cell Therapy*. 1 ed. 2013: Humana Press; 2013. XII, 456 p.
134. Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103(11):1204-19.
135. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *Journal of Translational Medicine*. 2014;12.

136. Baglio SR, Pegtel DM, Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Front Physiol.* 2012;3.
137. Rani S, Ryan AE, Griffin MD, Ritter T. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Mol Ther.* 2015;23(5):812-23.
138. Angoulvant D, Ivanov F, Ferrera R, Matthews PG, Nataf S, Ovize M. Mesenchymal stem cell conditioned media attenuates in vitro and ex vivo myocardial reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30(1):95-102.
139. Drago D, Cossetti C, Iraci N, Gaude E, Musco G, Bachi A, et al. The stem cell secretome and its role in brain repair. *Biochimie.* 2013;95(12):2271-85.
140. Adamowicz J, Pokrywczynska M, Drewa T. Conditioned medium derived from mesenchymal stem cells culture as a intravesical therapy for cystitis interstitials. *Med Hypotheses.* 2014;82(6):670-3.
141. Chang MC, Tsao CH, Huang WH, Chen PCH, Hung SC. Conditioned medium derived from mesenchymal stem cells overexpressing HPV16 E6E7 dramatically improves ischemic limb. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;72:339-49.
142. Chua A, Kua J, Ma D, Lee S. Hair Follicle Dermal Sheath Derived Mesenchymal Stem Cells: In-Vitro Characterization and Effects of Its Conditioned Medium on Cutaneous Wound Healing. *Cytotherapy.* 2014;16(4):S86-S.
143. Gao DY, Xie JF, Zhang JH, Feng CJ, Yao B, Ma K, et al. MSC attenuate diabetes-induced functional impairment in adipocytes via secretion of insulin-like growth factor-1. *Biochem Bioph Res Co.* 2014;452(1):99-105.
144. Skalnikova HK. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie.* 2013;95(12):2196-211.
145. Kalinina N, Kharlampieva D, Loguinova M, Butenko I, Pobeguts O, Efimenko A, et al. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:221.
146. Kennelly H, Mahon BP, English K. Human mesenchymal stromal cells exert HGF dependent cytoprotective effects in a human relevant pre-clinical model of COPD. *Sci Rep.* 2016;6:38207.
147. van Buul GM, Villafuertes E, Bos PK, Waarsing JH, Kops N, Narcisi R, et al. Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthr Cartilage.* 2012;20(10):1186-96.
148. Kwon HM, Hur SM, Park KY, Kim CK, Kim YM, Kim HS, et al. Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis. *Vascul Pharmacol.* 2014;63(1):19-28.

149. Amable PR, Teixeira MV, Carias RB, Granjeiro JM, Borojevic R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(2):53.
150. Sainio A, Jarvelainen H. Extracellular matrix macromolecules: potential tools and targets in cancer gene therapy. *Mol Cell Ther.* 2014;2:14.
151. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science.* 2009;326(5957):1216-9.
152. Lindner U, Kramer J, Rohwedel J, Schlenke P. Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Toward a Better Understanding of Their Biology? *Transfus Med Hemother.* 2010;37(2):75-83.
153. Teixeira FG, Panchalingam KM, Assuncao-Silva R, Serra SC, Mendes-Pinheiro B, Patricio P, et al. Modulation of the Mesenchymal Stem Cell Secretome Using Computer-Controlled Bioreactors: Impact on Neuronal Cell Proliferation, Survival and Differentiation. *Sci Rep.* 2016;6:27791.
154. Konala VB, Mamidi MK, Bhonde R, Das AK, Pochampally R, Pal R. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy.* 2016;18(1):13-24.
155. Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaiser S, Finkenzeller G, Stark GB, Sudkamp NP, et al. Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng.* 2006;12(10):2853-62.
156. Harvey A, Yen TY, Aizman I, Tate C, Case C. Proteomic analysis of the extracellular matrix produced by mesenchymal stromal cells: implications for cell therapy mechanism. *PLoS One.* 2013;8(11):e79283.
157. Kim J, Ma T. Autocrine fibroblast growth factor 2-mediated interactions between human mesenchymal stem cells and the extracellular matrix under varying oxygen tension. *J Cell Biochem.* 2013;114(3):716-27.
158. Xu Y, Shi T, Xu A, Zhang L. 3D spheroid culture enhances survival and therapeutic capacities of MSCs injected into ischemic kidney. *J Cell Mol Med.* 2016;20(7):1203-13.
159. Prewitz MC, Seib FP, von Bonin M, Friedrichs J, Stissel A, Niehage C, et al. Tightly anchored tissue-mimetic matrices as instructive stem cell microenvironments. *Nat Methods.* 2013;10(8):788-+.
160. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260(5110):920-6.
161. Watson CJ, Dark JH. Organ transplantation: historical perspective and current practice. *Br J Anaesth.* 2012;108 Suppl 1:i29-42.

162. Choi YC, Choi JS, Kim BS, Kim JD, Yoon HI, Cho YW. Decellularized extracellular matrix derived from porcine adipose tissue as a xenogeneic biomaterial for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;18(11):866-76.
163. Guo L, Qu J, Zheng C, Cao Y, Zhang T, Lu H, et al. Preparation and Characterization of a Novel Decellularized Fibrocartilage "Book" Scaffold for Use in Tissue Engineering. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144240.
164. Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng*. 2011;13:27-53.
165. Flynn LE. The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biomaterials*. 2010;31(17):4715-24.
166. Akhyari P, Aubin H, Gwanmesia P, Barth M, Hoffmann S, Huelsmann J, et al. The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011;17(9):915-26.
167. Jensen T, Roszell B, Zang F, Girard E, Matson A, Thrall R, et al. A rapid lung de-cellularization protocol supports embryonic stem cell differentiation in vitro and following implantation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;18(8):632-46.
168. Raghavan SS, Woon CY, Kraus A, Megerle K, Choi MS, Pridgen BC, et al. Human flexor tendon tissue engineering: decellularization of human flexor tendons reduces immunogenicity in vivo. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(7-8):796-805.
169. Goh SK, Bertera S, Olsen P, Candiello JE, Halfter W, Uechi G, et al. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials*. 2013;34(28):6760-72.
170. Devarathnam J, Sharma AK, Kumar N, Rai RB. Optimization of Protocols for Decellularization of Buffalo Aorta. *J Biomater Tiss Eng*. 2014;4(10):778-85.
171. Syed O, Walters NJ, Day RM, Kim HW, Knowles JC. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering. *Acta Biomater*. 2014;10(12):5043-54.
172. Mazza G, Rombouts K, Rennie Hall A, Urbani L, Vinh Luong T, Al-Akkad W, et al. Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. *Sci Rep*. 2015;5:13079.
173. Batchelder CA, Martinez ML, Tarantal AF. Natural Scaffolds for Renal Differentiation of Human Embryonic Stem Cells for Kidney Tissue Engineering. *PLoS One*. 2015;10(12):e0143849.

174. Gardin C, Ricci S, Ferroni L, Guazzo R, Sbricoli L, De Benedictis G, et al. Decellularization and Delipidation Protocols of Bovine Bone and Pericardium for Bone Grafting and Guided Bone Regeneration Procedures. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132344.
175. Sutherland AJ, Beck EC, Dennis SC, Converse GL, Hopkins RA, Berkland CJ, et al. Decellularized cartilage may be a chondroinductive material for osteochondral tissue engineering. *PLoS One*. 2015;10(5):e0121966.
176. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006;27(19):3675-83.
177. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-43.
178. Choi KM, Seo YK, Yoon HH, Song KY, Kwon SY, Lee HS, et al. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng*. 2008;105(6):586-94.
179. Wei F, Qu C, Song T, Ding G, Fan Z, Liu D, et al. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity. *J Cell Physiol*. 2012;227(9):3216-24.
180. Rakian R, Block TJ, Johnson SM, Marinkovic M, Wu J, Dai Q, et al. Native extracellular matrix preserves mesenchymal stem cell "stemness" and differentiation potential under serum-free culture conditions. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:235.
181. Prewitz MC, Stissel A, Friedrichs J, Traber N, Vogler S, Bornhauser M, et al. Extracellular matrix deposition of bone marrow stroma enhanced by macromolecular crowding. *Biomaterials*. 2015;73:60-9.
182. Zeiger AS, Loe FC, Li R, Raghunath M, Van Vliet KJ. Macromolecular crowding directs extracellular matrix organization and mesenchymal stem cell behavior. *PLoS One*. 2012;7(5):e37904.
183. Cigognini D, Gaspar D, Kumar P, Satyam A, Alagesan S, Sanz-Nogues C, et al. Macromolecular crowding meets oxygen tension in human mesenchymal stem cell culture - A step closer to physiologically relevant in vitro organogenesis. *Sci Rep*. 2016;6:30746.
184. Hoshiba T, Kawazoe N, Tateishi T, Chen G. Development of extracellular matrices mimicking stepwise adipogenesis of mesenchymal stem cells. *Adv Mater*. 2010;22(28):3042-7.
185. Zeitouni S, Krause U, Clough BH, Halderman H, Falster A, Blalock DT, et al. Human Mesenchymal Stem Cell-Derived Matrices for Enhanced Osteoregeneration. *Sci Transl Med*. 2012;4(132).

186. Santiago JA, Pogemiller R, Ogle BM. Heterogeneous differentiation of human mesenchymal stem cells in response to extended culture in extracellular matrices. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(12):3911-22.
187. Park JS, Chu JS, Tsou AD, Diop R, Tang Z, Wang A, et al. The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF-beta. *Biomaterials*. 2011;32(16):3921-30.
188. Burns JS, Kristiansen M, Kristensen LP, Larsen KH, Nielsen MO, Christiansen H, et al. Decellularized matrix from tumorigenic human mesenchymal stem cells promotes neovascularization with galectin-1 dependent endothelial interaction. *PLoS One*. 2011;6(7):e21888.
189. Lai W, Li Y, Mak S, Ho F, Chow S, Chooi W, et al. Reconstitution of bone-like matrix in osteogenically differentiated mesenchymal stem cell-collagen constructs: A three-dimensional in vitro model to study hematopoietic stem cell niche. *J Tissue Eng*. 2013;4:2041731413508668.
190. Choi DH, Suhaeri M, Hwang MP, Kim IH, Han DK, Park K. Multi-lineage differentiation of human mesenchymal stromal cells on the biophysical microenvironment of cell-derived matrix. *Cell Tissue Res*. 2014;357(3):781-92.
191. Cheng CW, Solorio LD, Alsberg E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. *Biotechnol Adv*. 2014;32(2):462-84.
192. Hoch AI, Mittal V, Mitra D, Vollmer N, Zikry CA, Leach JK. Cell-secreted matrices perpetuate the bone-forming phenotype of differentiated mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2016;74:178-87.
193. Liu X, Zhou L, Chen X, Liu T, Pan G, Cui W, et al. Culturing on decellularized extracellular matrix enhances antioxidant properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;61:437-48.
194. Kolf CM, Song L, Helm J, Tuan RS. Nascent osteoblast matrix inhibits osteogenesis of human mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:258.
195. Traphagen S, Yelick PC. Reclaiming a natural beauty: whole-organ engineering with natural extracellular materials. *Regen Med*. 2009;4(5):747-58.
196. Gonzalez-Andrades M, Carriel V, Rivera-Izquierdo M, Garzon I, Gonzalez-Andrades E, Medialdea S, et al. Effects of Detergent-Based Protocols on Decellularization of Corneas With Sclerocorneal Limbus. Evaluation of Regional Differences. *Transl Vis Sci Technol*. 2015;4(2):13.
197. Gilbert TW, Freund JM, Badylak SF. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *J Surg Res*. 2009;152(1):135-9.

198. He F, Liu X, Xiong K, Chen S, Zhou L, Cui W, et al. Extracellular matrix modulates the biological effects of melatonin in mesenchymal stem cells. *J Endocrinol*. 2014;223(2):167-80.
199. Hoshiba T, Kawazoe N, Tateishi T, Chen G. Development of stepwise osteogenesis-mimicking matrices for the regulation of mesenchymal stem cell functions. *J Biol Chem*. 2009;284(45):31164-73.
200. Kular JK, Basu S, Sharma RI. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J Tissue Eng*. 2014;5:2041731414557112.
201. Harvestine JN, Vollmer NL, Ho SS, Zikry CA, Lee MA, Leach JK. Extracellular Matrix-Coated Composite Scaffolds Promote Mesenchymal Stem Cell Persistence and Osteogenesis. *Biomacromolecules*. 2016;17(11):3524-31.
202. Thibault RA, Scott Baggett L, Mikos AG, Kasper FK. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on pregenerated extracellular matrix scaffolds in the absence of osteogenic cell culture supplements. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(2):431-40.
203. Chantraine CF, Feron O, Marbaix E, DeClerck YA. Bone marrow microenvironment and tumor progression. *Cancer Microenviron*. 2008;1(1):23-35.
204. Bergfeld SA, DeClerck YA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(2):249-61.
205. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423-37.
206. Melzer C, Yang Y, Hass R. Interaction of MSC with tumor cells. *Cell Commun Signal*. 2016;14(1):20.
207. Lander AD, Kimble J, Clevers H, Fuchs E, Montarras D, Buckingham M, et al. What does the concept of the stem cell niche really mean today? *BMC Biol*. 2012;10:19.
208. UniProt C. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D204-12.
209. Hynes Lab NL. Matrisome Project. MIT; 2018.
210. Alpar R. Spor Sağlık Ve Eğitim Bilimlerinden Örneklerle Uygulamalı İstatistik ve Geçerlik Güvenirlik. Ankara: Detay Yayıncılık; 2012.
211. Adams HJ, Nievelstein RA, Kwee TC. Opportunities and limitations of bone marrow biopsy and bone marrow FDG-PET in lymphoma. *Blood Rev*. 2015;29(6):417-25.

212. Niederwieser D, Baldomero H, Szer J, Gratwohl M, Aljurf M, Atsuta Y, et al. Hematopoietic stem cell transplantation activity worldwide in 2012 and a SWOT analysis of the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Group including the global survey. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(6):778-85.
213. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(6):786-92.
214. Mageed AS, Pietryga DW, DeHeer DH, West RA. Isolation of large numbers of mesenchymal stem cells from the washings of bone marrow collection bags: characterization of fresh mesenchymal stem cells. *Transplantation.* 2007;83(8):1019-26.
215. Dvorakova J, Hrubá A, Velebný V, Kubala L. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. *Cell Biol Int.* 2008;32(9):1116-25.
216. Sundin M, Remberger M, Lonnie H, Sundberg B, Ringden O, Le Blanc K. No increased trapping of multipotent mesenchymal stromal cells in bone marrow filters compared with other bone marrow cells. *Cytotherapy.* 2008;10(3):238-42.
217. Capelli C, Salvade A, Pedrini O, Barbui V, Gotti E, Borleri G, et al. The washouts of discarded bone marrow collection bags and filters are a very abundant source of hMSCs. *Cytotherapy.* 2009;11(4):403-13.
218. Grisendi G, Anneren C, Cafarelli L, Sternieri R, Veronesi E, Cervo GL, et al. GMP-manufactured density gradient media for optimized mesenchymal stromal/stem cell isolation and expansion. *Cytotherapy.* 2010;12(4):466-77.
219. Zhu B, Murthy SK. Stem Cell Separation Technologies. *Curr Opin Chem Eng.* 2013;2(1):3-7.
220. Yamamoto Y, Itoh S, Yamauchi Y, Matsushita K, Ikeda S, Naruse H, et al. Density Gradient Centrifugation for the Isolation of Cells of Multiple Lineages. *J Cell Biochem.* 2015;116(12):2709-14.
221. Nikfarjam L, Farzaneh P. Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. *Cell J.* 2012;13(4):203-12.
222. Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology.* 2002;39(2):75-90.
223. Pamies D, Bal-Price A, Simeonov A, Tagle D, Allen D, Gerhold D, et al. Good Cell Culture Practice for stem cells and stem-cell-derived models. *ALTEX.* 2017;34(1):95-132.

224. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):462-71.
225. Roobrouck VD, Clavel C, Jacobs SA, Ulloa-Montoya F, Crippa S, Sohni A, et al. Differentiation potential of human postnatal mesenchymal stem cells, mesoangioblasts, and multipotent adult progenitor cells reflected in their transcriptome and partially influenced by the culture conditions. *Stem Cells*. 2011;29(5):871-82.
226. Xing Q, Qian Z, Kannan B, Tahtinen M, Zhao F. Osteogenic Differentiation Evaluation of an Engineered Extracellular Matrix Based Tissue Sheet for Potential Periosteum Replacement. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(41):23239-47.
227. Takeichi M, Okada TS. Roles of magnesium and calcium ions in cell-to-substrate adhesion. *Exp Cell Res*. 1972;74(1):51-60.
228. Searles GE, Dixon WT, Thomas PD, Jimbow K. Divalent cations control cell-substrate adhesion and laminin expression in normal and malignant human melanocytes in early and late stages of cellular differentiation. *J Invest Dermatol*. 1995;105(2):301-8.
229. Koch A.W. EJ, Maurer P. Calcium Binding to Extracellular Matrix Proteins, Functional and Pathological Effects. In: Pochet R. DR, Haiech J., Heizmann C., Gerke V., editor. *Calcium: The Molecular Basis of Calcium Action in Biology and Medicine*: Springer, Dordrecht; 2000. p. 151-64.
230. Aamodt JM, Grainger DW. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials*. 2016;86:68-82.
231. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 20):3861-3.
232. Ramanathan A, Karuri N. Proteolysis of decellularized extracellular matrices results in loss of fibronectin and cell binding activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;459(2):246-51.
233. Fartner G.E. RO, Schitter G., Thurner P., Kindt J.H., Finch M.M., Weacer J.C., Golde L.S., Morse D.E., Lipman E.A., Rangelow I.W., Hansma P.K. Hierarchical interconnections in the nano-composite material bone: Fibrillar cross-links resist fracture on several length scales. *Composites Science and Technology*. 2006;66(9):1205-11.
234. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. 2010;123(24):4195-200.
235. Fitzpatrick LE, McDevitt TC. Cell-derived matrices for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Biomater Sci*. 2015;3(1):12-24.

236. Yang Y, Zhang S, Howe K, Wilson DB, Moser F, Irwin D, et al. A comparison of nLC-ESI-MS/MS and nLC-MALDI-MS/MS for GeLC-based protein identification and iTRAQ-based shotgun quantitative proteomics. *J Biomol Tech.* 2007;18(4):226-37.
237. Anagnostopoulos AK, Stravopodis DJ, Tsangaris GT. Yield of 6,000 proteins by 1D nLC-MS/MS without pre-fractionation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017;1047:92-6.
238. Besio R FA. New frontiers for dominant osteogenesis imperfecta treatment: gene/cellular therapy approaches. *Advances in Regenerative Biology.* 2015;2(1):1-9.
239. Smeriglio P, Lee J, Bhutani N. Soluble Collagen VI treatment enhances mesenchymal stem cells expansion for engineering cartilage. *Bioeng Transl Med.* 2017;2(3):278-84.
240. Price MA, Colvin Wanshura LE, Yang J, Carlson J, Xiang B, Li G, et al. CSPG4, a potential therapeutic target, facilitates malignant progression of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24(6):1148-57.
241. Keleg S, Titov A, Heller A, Giese T, Tjaden C, Ahmad SS, et al. Chondroitin sulfate proteoglycan CSPG4 as a novel hypoxia-sensitive marker in pancreatic tumors. *PLoS One.* 2014;9(6):e100178.
242. Battula VL, Chen Y, Cabreira Mda G, Ruvolo V, Wang Z, Ma W, et al. Connective tissue growth factor regulates adipocyte differentiation of mesenchymal stromal cells and facilitates leukemia bone marrow engraftment. *Blood.* 2013;122(3):357-66.
243. Coskun S, Hirschi KK. Establishment and regulation of the HSC niche: Roles of osteoblastic and vascular compartments. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2010;90(4):229-42.
244. Magnusson M, Sierra MI, Sasidharan R, Prashad SL, Romero M, Saarikoski P, et al. Expansion on stromal cells preserves the undifferentiated state of human hematopoietic stem cells despite compromised reconstitution ability. *PLoS One.* 2013;8(1):e53912.
245. Yoo JK, Choi SJ, Kim JK. Expression profiles of subtracted mRNAs during cellular senescence in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Exp Gerontol.* 2013;48(5):464-71.
246. Martin-Rendon E, Hale SJ, Ryan D, Baban D, Forde SP, Roubelakis M, et al. Transcriptional profiling of human cord blood CD133+ and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia. *Stem Cells.* 2007;25(4):1003-12.
247. Ozaki Y, Tamura S, Suzuki-Inoue K. New horizon in platelet function: with special reference to a recently-found molecule, CLEC-2. *Thromb J.* 2016;14(Suppl 1):27.

248. Ragelle H, Naba A, Larson BL, Zhou F, Prijic M, Whittaker CA, et al. Comprehensive proteomic characterization of stem cell-derived extracellular matrices. *Biomaterials*. 2017;128:147-59.
249. Naba A, Clauser KR, Ding H, Whittaker CA, Carr SA, Hynes RO. The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era. *Matrix Biol*. 2016;49:10-24.
250. Glavey SV, Naba A, Manier S, Clauser K, Tahri S, Park J, et al. Proteomic characterization of human multiple myeloma bone marrow extracellular matrix. *Leukemia*. 2017;31(11):2426-34.



8.EKLER

EK-1. EM ve İlişkili Protein Grupları ile Eşleşen Protein Listesi

	EM Yapısını Oluşturan Proteinler	EM Bağlantılı Proteinler	Ortama Salgılanan EM proteinleri	EM Regülatör Proteinler
1	BGN	ARP2	EDIL3	ADAM10
2	COL12A1	ANXA1	FBLN1	CTSA
3	COL14A1	ANXA11	IGFBP1	CTSB
4	COL16A1	ANXA2	IGFBP7	CTSD
5	COL1A1	ANXA3	IGFBP8	CTSK
6	COL1A2	ANXA4	PSAP	CXCR4
7	COL5A3	ANXA5	S100A10	MMP14
8	COL6A1	ANXA6	S100A11	MMP2
9	COL6A2	ANXA7	S100A13	MXRA7
10	COL6A3	ARP2/3	S100A16	PCOLCE
11	COL8A1	C1QBP	S100A4	PLXD1
12	CSPG4	C1QR1	S100A6	PLXDC2
13	CTHRC1	C1QTNF9		PLXNB2
14	DAG	C1T9A		PRSS1
15	DCN	CALU		PRSS3
16	EGFLAM	CEMIP		PRSS44
17	ENG	CKAP5		SERPE2
18	FBN1	CNN1		SERPH1
19	FN	CNN2		TIMP1
20	FNDC3B	CNN3		TIMP2
21	FRAS1	CTNBB1		TIMP3
22	HMCN1	EZR		
23	HSPG2	GAL1		
24	LAMA2	GPC4		
25	LAMC1	ITGA11		
26	LTBP1	ITGA4		
27	LTBP2	ITGB5		
28	NID-1	LGALS1		
29	POSTN	LGALS3		
30	PRG4	LMAN1		
31	SDC2	LMAN2		
32	SGCB	MUC16		
33	SGCD	MUC18		
34	TECTA			
35	THBS1			
36	TNC			
37	VTN			

EK.2. Etik Kurul İzni



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

Sayı : 16969557 - 708

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 13 TEMMUZ 2016 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2016/14
Proje No : GO 16/480(Değerlendirme Tarihi : 13.07.2016)
Karar No : GO 16/480- 53

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL'ün sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Duygu Uçkan ÇETİNKAYA ve Doç. Dr. Barış KUŞKONMAZ ile birlikte çalışacakları Arş. Gör. Ecz. Yağız ANASIZ'ın Doktora tezi olan, GO 16/480 kayıt numaralı ve "**Mezenkimal Kök Hücrelerden Deselülerize Ekstraselüler Matriks Eldesi**" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|--|--|
| 1. Prof. Dr. Sevdâ F. MÜFTÜOĞLU (Başkan) | 10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Üye) | 11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye) | İZİNLİ |
| 4. Prof. Dr. Necdet SAGLAM (Üye) | 12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye) | İZİNLİ |
| KATILMADI | 13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye) |
| 6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye) | İZİNLİ |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye) | 14. Yrd. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye) |
| İZİNLİ | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye) | 16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR (Üye) |
| 9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye) | 17. Öğr. Gör. Meltem ŞENGEL (Üye) |
| | İZİNLİ |
| | 18. Av. Meltem ONURLU (Üye) |

EK.3. Tez Çalışması İle İlgili Yayınlar ve Bildiriler

Tez Çalışması İle İlgili Yayınlar

Anasiz Y, Ozgul R.K., Cetinkaya Uckan D. 2017. A New Chapter for Mesenchymal Stem Cells: Decellularized Extracellular Matrices. Stem Cell Rev and Rep. 13: 587. <https://doi.org/10.1007/s12015-017-9757-x>

Anasiz Y, Ozgul RK, Kucukserin F, Kuskonmaz B, Uckan-Cetinkaya. Formation of Trabecular Bone Like Structures On MSC-dECM. *(Yayına hazırlanıyor)*

Anasiz Y, Ozgul RK, Kucukserin F, Kuskonmaz B, Uckan-Cetinkaya D. Finding Treasure in Medical Waste: Human Mesenchymal Stem Cells Isolation From Used Bone Marrow Collection Kits. *(Yayına Hazırlanıyor)*

Tez Çalışması İle İlgili Bildiriler

Anasiz Y., Özgül R.K., Kuşkonmaz B.B., Uçkan-Çetinkaya D. 2017. Tıbbi Atıktan Laboratuvara: Kİ Naklinde Kullanılan Filtre-Torba Sistemlerinin MKH İzolasyonu Amacıyla Değerlendirilmesi. “IV. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi. 28- 30 Nisan, Gaziantep. (Poster sunumu).

9.ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

Ad: Yağız Anasız

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara/Altındağ - 01.05.1988

Uyruğu: T.C.

Telefon: 0531 942 81 42

E-posta: yanasiz88@gmail.com

2. Eğitim

Doktora: 2011- 2018

Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Bilimleri ABD

Lisans: 2006-2011 (Yüksek Onur Öğrencisi)

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Lise: 2002-2006 (Onur Öğrencisi)

Ankara Anadolu Lisesi

İlköğretim: 1994- 2002

Gazi Osman Paşa İlköğretim Okulu (Ankara)

3. Mesleki Deneyim

Kasım 2017- Halen – Eczacı, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK), Ruhsatlandırma Departmanı, Biyolojik – Biyoteknolojik Ürünler Birimi

Kasım 2011- Kasım 2017 - Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı

Temmuz 2016- Ağustos 2017 – Misafir Araştırmacı, Bilkent Üniversitesi, Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM)

Mart 2011 – Mayıs 2011 – Stajyer, Ankara Üniversitesi Parenteral Çözelti Merkezi (Ankara) – Üretim ve kimyasal analiz stajı (HPLC, LC-MS)

Haziran 2010 – Temmuz 2010 – Stajyer, Drogosan İlaç Firması (Ankara) – Steril ve non steril ürün geliştirilmesi, dolum ve mikrobiyolojik kalite kontrolü, Ar&Ge Stajı

4. Pratik Deneyimler

Doku örneğinden Primer Kültür Hazırlanması

Adipoz Doku, Kemik iliği ve Periferik kandan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Mezenkimal Kök Hücre Kültürü (İnsan ve Domuz)

Ekstraselüler Matris İzolasyonu ve Deselülerizasyon İşlemleri

Hücre Kültür Modellerinin Geliştirilmesi

Immunhistokimya/ İmmü floresan Analizler

Flow Sitometri Analizi

PCR Çalışmaları

Mikoplazma Kontaminasyon Analizleri

5. Yayınlar / Bildiriler / Sözlü Sunumlar

Anasiz Y., Bozkir A., 2011. Göze uygulanan in-situ jel formülasyonlarının teknolojik özellikleri ve örnek formül geliştirilmesi. (BSc Project)

Anasiz Y., Kucukturkmen B. Bozkir A., 2011. Thermoreversible in situ gelling solutions for ophthalmic delivery of pilocarpine hydrochlorid. 3rd Pharmaceutical Sciences Fair and Exhibition, 13-17 Haziran, Prague-Czech Republic, 2011. (Poster sunumu)

Anasiz Y., Eldem T., 2015. Isolation and culture of porcine mesenchymal stem cells: preliminary study. 2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies, 15-18 Ekim, Antalya. (Sözlü Sunum)

Anasiz Y., Özgül R.K., Uçkan-Çetinkaya D., 2017. Eczacılıkta Yeni Bir Çağ: Kişiselleştirilmiş Tıp, Kök Hücreler ve Rejeneratif Tıp. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan. İstanbul. (Sözlü sunum).

Anasiz Y., Özgül R.K., Kuşkonmaz B.B., Uçkan-Çetinkaya D. 2017. Tıbbi Atıktan Laboratuvara: Kİ Naklinde Kullanılan Filtre-Torba Sistemlerinin MKH İzolasyonu Amacıyla Değerlendirilmesi. “IV. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi. 28- 30 Nisan, Gaziantep. (Poster sunumu).

Anasiz Y, Ozgul R.K., Cetinkaya Uckan D. 2017. A New Chapter for Mesenchymal Stem Cells: Decellularized Extracellular Matrices. Stem Cell Rev and Rep. 13: 587.

<https://doi.org/10.1007/s12015-017-9757-x>

Anasiz Y, Ozgul RK, Kucukserin F, Kuskonmaz B, Uckan-Cetinkaya. Formation of Trabecular Bone Like Structures On MSC-dECM. *(Yayına hazırlanıyor)*

Anasiz Y, Ozgul RK, Kucukserin F, Kuskonmaz B, Uckan-Cetinkaya D. Finding Treasure in Medical Waste: Human Mesenchymal Stem Cells Isolation From Used Bone Marrow Collection Kits. *(Yayına Hazırlanıyor)*

6. Burslar

TÜBİTAK-BİDEB 2211A / Yurtiçi Doktora Burs Programı

7. Projeler

TED-2015-8195. HÜ BAP. “Domuz Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü: Ön Çalışma”. Proje Yürütücüsü. (28,09,2015-28.03.2016). Proje Bütçesi 2000 TL

THD-2016-12181. HÜ BAP. “Mezenkimal Kök Hücrelerden Deselülerize Ekstraselüler Matriks Eldesi”. Araştırmacı (19.10.2016-19.10.2017). Proje Bütçesi 31858,94 TL

TÜBİTAK-SBAG-117S275. “Akut Myeloblastik Lösemi (AML) Hastalığında Aptamer Temelli Yeni Yüzey Belirteçlerinin Keşfi”. Doktora Öğrencisi- Bursiyer.

8. Katılınan Bilimsel Etkinlikler ve Alınan Sertifikalar

II. Kök Hücre Kursu ve VI. Kök Hücre Sempozyumu (24-25 Haziran 2011)

1st International Conference on Stem Cell Research and Applications (7-9 Ekim 2011)

HÜKÖK 1. Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp Günü (13 Mayıs 2012)

Basic Stem Cell Technics and Molecular Biology Applications Workshop (24-28 Eylül 2012)

XVII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu, Flow Sitometri Eğitimi (24-28 Eylül 2012)

Eppendorf PCR Semineri (18 Ekim 2012)

Rejeneratif Tıp Sempozyumu, Hücreden Doku Mühendisliğine (30 Mart 2013)

Biyomalzemelerin Medikal Alanda Kullanımı Çalıştayı (19 Mart 2013)

Kök Hücre Günü 2013 Toplantısı (8 Kasım 2013)

Advanced Technologies on Health Sciences Symposium (15-16 Eylül 2014)

1. Hacettepe Writing Workshop (1-2 Ekim 2014)

Kök Hücre Günü 2014 Toplantısı (19 Kasım 2014)

2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies (15-18 Ekim 2015)

EMBO|EMBL Symposium on Organoids: Modelling Organ Development and Disease in 3D Culture (12-15 Ekim 2016)

Hacettepe Üniversitesi, Tübitak 1000, Rejeneratif ve Restoratif Tıp Alanı Strateji Çalıştayı (16 Aralık 2016)

IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, (26-29 Nisan 2017)

V. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi (28- 30 Nisan 2017)

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

Eğiticilerin Eğitimi Sertifikası (Hacettepe Üniversitesi)

9. Kurslar

Kök Hücre Yaz Kursu 2017 (PEDISTEM)

Kurs Eğitimci Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü

Mikoplazma Ölçüm Teknikleri ve Analizi

10. Yabancı Dil & Sınav Sonuçları

ALES – 86,55 (2011-Haziran)

İngilizce (ÜDS 93,70) – 2010

Almanca (Zentrale Deutschprüfung zum Schulabschluss) – 2006