T.C
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YAĞ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN BÜYÜME FAKTÖRLERİ ETKİSİYLE İSKELET KAS HÜCRESİNE İNDÜKLENMESİ

Hazırlayan
Büşra DOĞAN

Danışmanlar
Prof. Dr. Harun ÜLGER
Dr. Dilek KAAN

Yüksek Lisans Tezi

Temmuz 2019
KAYSERİ

T.C
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YAĞ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN BÜYÜME FAKTÖRLERİ ETKİSİYLE İSKELET KAS HÜCRESİNE İNDÜKLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Büşra DOĞAN

Danışmanlar
Prof. Dr. Harun ÜLGER
Dr. Dilek KAAN

Temmuz 2019
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurula uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özüne olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdğimi belirtirim.

Adı- Soyadı: Büşra DOĞAN

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

"Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrenin Büyüme Faktörleri Etkisiyle İskelet Kas Hücresine İndüklenmesi" adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Büşra DOĞAN

Danışmanlar;
Prof. Dr. Harun ÜLGER

Dr. Dilek KAAN

Kök Hücre Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

KABUL VE ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Harun ÜLGER ve Dr. Dilek KAAN danışmanlığında Büşra DOĞAN tarafından hazırlanan **"Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrenin Büyüme Faktörleri Etkisiyle İskelet Kas Hücresine İndüklenmesi"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

19 / 07 / 2019

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Harun ÜLGER
Dr. Dilek KAAN
Üye : Doç. Dr. Zühal HAMURCU

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Aysun ADAN



ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../ 2019

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi sayın danışman hocalarım Prof. Dr. Harun ÜLGER ve Dr. Dilek KAAN'a, deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarıyla büyük katkı sağlayan Arş. Gör. Sümeyye UÇAR, Dr. Güler TOPRAK ve Dr. Ahmet EKEN'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında hep yanımda olan, desteğini hiç esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim. Tezin yapılmasında büyük katkıları olan Genom ve Kök Hücre Merkezi yöneticileri ile çalışanlarına, çalışmalarım süresince desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen laboratuvar çalışanlarına desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Büşra DOĞAN

Kayseri, Temmuz 2019

YAĞ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN BÜYÜME FAKTÖRLERİ ETKİSİYLE İSKELET KAS HÜCRESİNE İNDÜKLENMESİ

Büşra DOĞAN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı

Yüksel Lisans Tezi, Temmuz 2019

Danışmanlar: Prof. Dr. Harun ÜLGER, Dr. Dilek KAAN

ÖZET

Bu çalışmada adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre (MKH)'lerin IGF1 (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü) ve FGF2 (Fibroblast Büyüme Faktörü) büyüme faktörlerinin etkisiyle iskelet kas hücrelerine farklılaşması miyoblast belirleme proteini1 (MyoD1) antibodisi ile boyanarak akım sitometrisi ile değerlendirildi.

MKH'leri 4 farklı gruba ayrıldı. I. grup hücreler (kontrol grubu) yalnızca miyojenik medium içinde, II. grup hücreler miyojenik mediuma 100 ng/ml FGF2 ilave edilerek, III. grup hücreler miyojenik mediuma 20 ng/ml IGF1 ilave edilerek ve IV. grup hücreler 100 ng/ml FGF2 ve 20 ng/ml IGF1 ilave edilerek inkübe edildi. Mezenkimal kök hücrelerin immunfenotiplendirilmesi için CD44, CD73, CD90 ve CD105 pozitif, CD45, CD34, CD11b, CD19 ve HLA-DR negatif markerlar kullanıldı. 28. gün sonunda miyojenik diferansiyasyon belirleme amacıyla MyoD1 antibodisi ile boyanan hücreler akım sitometri yardımıyla analiz edildi. Analizler sonucunda kontrol grubunun %11.5, FGF2 grubunun %39.2, IGF1 grubunun %23.1, IGF1+FGF2 grubunun %39.3 oranlarında farklılaşma gösterdiği tespit edildi. Kontrol grubu ile FGF2, IGF1 ve FGF2+IGF1 grupları ile karşılaştırıldığında IGF grubunda miyojenik farklılaşmadaki artış anlamlı bulundu *($p < 0,05$)*. Yapılan bu çalışmanın sonuçları IGF1 ve FGF2' nin MKH'lerin miyojenik farklılaşmaya olumlu katkısının olduğunu, kök hücrelerin rejenerasyon kapasitesi ve farklılaşma özelliğinin büyüme faktörleri ile desteklenmesinin kas hastalıkları ile ilgili çalışmalara ve bu hastalıkların tedavi edilmesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kök Hücre; Miyojenik Farklılaşma; Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre; Büyüme faktörleri; IGF; FGF.

INDUCTION TO SKELETON MUSCLE CELL BY THE EFFECT OF GROWTH FACTORS OF ADIPOSE TISSUE SOURCE MESENCHYMAL STEM CELL

Büşra DOĞAN

Ercıyes Unıversıty, Graduate School Of Health Scıences

Department Of Stem Cell Scıences

Master's Thesıs, July 2019

Supervisior: Prof. Dr. Harun ÜLGER, Dr. Dilek KAAN

ABSTRACT

The differantitaion of adipose tissue derived mesenchymal stem cells (MSCs) into skeletal muscle cells by the effect of IGF and FGF growth factors was evaluated by flow cytometry by staining with myoblast detection protein 1 (MyoD1) antibody in this study.

MSCs were divided into four groups. I.Group cells (control group) were incubated only in myogenic medium. II. group cells were incubated by adding 100 ng / ml FGF2 to the myogenic medium, III. group cells were incubated by adding 20 ng / ml IGF1 to the myogenic medium, IV. group cells were incubated by adding 100 ng / ml FGF2 and 20 ng / ml IGF1 to the myogenic medium. CD44, CD73, CD90 and CD105 positive, CD45, CD34, CD11b, CD19 and HLA-DR negative markers were used for immunophenotyping of mesenchymal stem cells. Cells dyed with MyoD1 antibody were analyzed by flow cytometry so as to determine myogenic differentiation at the end of 28 days. It was confirmed that 11.5% of the control group, 39.2% of the FGF2 group, 23.1% of the IGF1 group and 39.3% of the IGF1-FGF2 group showed differentiation. When the control group and FGF2, IGF1 and FGF2 + IGF1 groups were compared, the increase in myogenic differentiation was significant for IGF1 *($p < 0,05$).* Results of this study show that IGF-1 and FGF-2 have a positive contribution on myogenic differentiation of MSCs, contribute to the studies related to muscle diseases and treatment of these diseases to support by growth factors the feature of the regeneration capacity and differentiation.

Keywords: Stem Cell, Myogenic Differentiation; Adiposed Mesenchymal Stem Cell; Growth factors; IGF; FGF.

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI ii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vi
İÇİNDEKİLER vii
KISALTMALAR ve SİMGELER x
TABLOLAR LİSTESİ xii
ŞEKİLLER LİSTESİ xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2.GENEL BİLGİLER 3
2.1. Kök Hücreler 3
2.1.1. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri 3
2.1.1.1. Self-Renewal (Kendini Yenileme) 3
2.1.1.2. Pluripotensi (Köklülük) 4
2.1.1.3. Plastisite (Differansiyasyon) 5
2.1.2. Kök Hücre Türleri 6
2.1.2.1. Farklılaşma Potansiyellerine Göre Kök Hücreler 6
2.1.2.2. Elde Edildikleri Kaynağa Göre Kök Hücreler 7
2.1.2.2.1. Embriyonel Kök Hücre: 7
2.1.2.2.2. Yetişkin Kök Hücreler 8
2.1.2.2.3. Fetüs Kök Hücreleri 8
2.1.2.2.4. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre 8
2.1.3. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) 9
2.1.3.1. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları 11

2.1.3.2.Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Özellikleri 11
2.1.3.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklanma Kümeleri..... 12
2.1.3.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşabilme Kapasitesi 15
2.1.3.5. Mezenkimal Kök Hücre Kullanımının Dezavantajı..... 17
2.2. İnsanda Kas Dokusu 18
2.2.1.İskelet Kaslarında Bulunan Kök Hücreler 20
2.2.2. Kas Dokusu ve Kök hücre 21
2.2.3. Kas Düzenleyici Faktörler 21
2.3. Büyüme Faktörleri 22
2.3.1. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) 23
2.3.1.1. Fibroblast Büyüme Faktörü1 (FGF1) 23
2.3.1.2. Fibroblast Büyüme Faktörü2 (FGF2) 23
2.3.2.İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) 24
3.GEREÇ VE YÖNTEM 26
3.1. İnsan Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyon Yöntemi . 26
3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu 27
3.2.1. Tripsinizasyon İşlemi Basamakları 27
3.2.2. Karakterizasyon İşlemi Basamakları 28
3.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin İskelet Kas Hücrelerine Diferansiyasyonu.... 29
3.3.1. Grupların Özellikleri..... 29
3.3.2. Miyojenik Mediumunun Hazırlanması..... 29
3.4. İskelet Kas Diferansiyasyonunun Akım Sitometri ile Okunması..... 30
3.4.1. Intraselüler Boyama (ICC) ve Flow Sitometri Analizi İşlemi Basamakları 30
3.5. İstatistiksel Değerlendirme..... 30
4.BULGULAR 31
4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu 31

4.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Karakterizasyonu 31

4.1.2. Akım Sitometresi 32

4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin İskelet Kas Hücrelerine Diferansiyasyonu 34

4.2.1. Flow Sitometri Analiz Veri Sonuçlarının Yorumlanması 43

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 48

5.1. Tartışma ve Sonuç 48

6.KAYNAKLAR 53

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR ve SİMGELER

MKH :	Mezenkimal Kök Hücre
HMKH:	İnsan Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
IGF:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri
FGF2:	Fibroblast Büyüme Faktörü 2
TGF-β :	Transforming Growth Factor Beta
	(transforme edici büyüme faktörü beta)
FGF-RI	Fbroblast Büyüme Faktörü Reseptörleri
EKH:	Embriyonel Kök Hücre
CD:	Clusters of Differentiation
	Yüzey farklılaşma antijenleri
CD44:	Homing Hücre Yapışma Molekülü
CD45:	Protein Tirozin Fosfataz, Reseptör tip C
CD105:	Endoglin
CD34:	Hematopoetik Projenik Hücre Antijeni
CD73:	Ekto-5'- Nükleaz
CD11b:	Integrin alfa M
CD14:	Miyeloid Hücre-Spesifik Lösin-Zengin Glikoprotein
CD79a:	B-Hücre Antijen ReseptörKomplex-
CD146:	Melanoma Hücre Adezyon Molekülü
CD166:	Aktive Edilmiş Lökosit Hücre Molekülü
CD117:	Mast/Kök Hücre Büyüme Faktör Reseptörü

HLA:	İnsan Lökosit Anijenleri
BSA:	Bovine Serum Albumin
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS:	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Modified
FBS:	Fetal Bovine Serumu
PBS:	Fosfat Tampon Salin
FITC:	Fluorescein Isothiocyanate
ISCT:	Uluslararası Hücresel Terapi Derneği
DNA :	Deoksiribonükleik Asit
mRNA:	Mesajcı Ribonükleik Asit
Mrf:	Miyojenik Regülatör Faktör
Mrf4:	Miyogenik faktör-4
Myf5:	Miyogenik faktör-5
MyoG :	Miyogenin
MyoD:	Myoblast determination protein (myf3)
Pax3, 7:	Paired Box Gene 3, 7
PC5:	Phycoerythrin Cyanin 5 (PC5)
PE :	Phycoerythrin (RD1)
PI :	Propidium Iodide
ml :	Mililitre
µl:	Mikrolitre

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Mezenkimal kök hücreler yüzeylerinde taşınan adezyon moleküller..... 14

Tablo 2.2. MKH'lerin karakterizasyonunda kullanılan farklılaşma protokollerinden bazıları 16

Tablo 2.3. MKH 'lerin *in vitro* farklılaşma potansiyeli 17

Tablo 4.1. Akış sitometrisi sonucu mezenkimal kök hücrelerin ekpresyonları..... 34

Tablo 4.2. Grupların akım sitometri verilerinin kıyaslanması. 47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Mezenkimal kök hücrenin farklılaşabildiği dokular 10

Şekil 2.2. Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin mikroskopik görünümü 12

Şekil 2.3. *İn vitro olarak* iskelet kası farklılaşması 20

Şekil 2.4. Kas lifinin gelişimi 21

Şekil 4.1. Hücre kültürünün 4. günü, fibroblast benzeri morfoloji gösteren kültür kabı 31

Şekil 4.2. İnsan adipoz kaynaklı MKH'lerin ekim işleminin 8. gününe ait mikroskobik görüntüsü. 32

Şekil 4.3. İnsan adipoz kaynaklı kök hücrelerin akım sitometri ile immünfenotiplendirilmesi. 33

Şekil 4.4. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin koşullu (miyojenik) medium ile inkübe sonrası kontrol grubunun 1. hafta sonu mikroskop görüntüleri.. 35

Şekil 4.5. IGF1 grubunun 1. hafta sonu mikroskop görüntüleri. 36

Şekil 4.6. FGF2 grubunun 1. hafta sonu mikroskop görüntüleri. 37

Şekil 4.7. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin koşullu (miyojenik) medium ile inkübe edilmiş IGF1+FGF2 grubunun 1. hafta sonu mikroskop görüntüleri..... 38

Şekil 4.8. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin koşullu (miyojenik) medium ile inkübe edilmiş FGF2+IGF1 grubunun 2. hafta sonu mikroskop görüntüleri (X20). 39

Şekil 4.9. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin koşullu (miyojenik) medium ile inkübe edilmiş FGF2+IGF1 grubunun 3.hafta sonu mikroskop görüntüleri (X20). 40

Şekil 4.10. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin koşullu (miyojenik) medium ile inkübe edilmiş kontrol grubunun 4. hafta sonu mikroskop görüntüleri 41

Şekil 4.11. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin koşullu (miyojenik) medium ile inkübe edilmiş FGF2+IGF1 grubunun 4. hafta sonu mikroskop görüntüleri..... 42

Şekil 4.12. Akım sitometri cihazı kullanılarak kontrol grubunun değerlendirilmesi. 43

Şekil 4.13. Akım sitometri cihazı kullanılarak IGF1 grubunun değerlendirilmesi. 44

Şekil 4.14. Akım sitometri cihazı kullanılarak FGF2 grubunun değerlendirilmesi..... 45

Şekil 4.15. Akım sitometri cihazı kullanılarak IGF1+FGF2 grubunun değerlendirilmesi. 46

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde olduğu gibi geçmişte de transplantasyon insanoğlunun ilgisini çekmiş ve buna dair ilk bilgi anlatılan bir mitolojik hikayededir. Zeus tarafından Kaf dağındaki kayaya bağlanıp karaciğerinin hergün bir kartal tarafından yenilmesi cezasına çarptırılan Prometheus'un karaciğeri zarar gördükçe kendisini yenileyebilmiştir. Bu hikayede ifade edilen; bir doku veya organın rejenerasyon yeteneği olduğudur. Bu da kök hücre kavramına karşılık gelen ilk hikâyedir (Sağsöz ve Ketani, 2008). Kök hücre kavramı, organizmanın ömrü boyunca kendini yenileme kabiliyetini açıklayan teorik bir önermeyle 19. yüzyılın sonunda ortaya çıkmıştır (Bianco ve ark., 2008). Hasar gören doku ve organların tedavisi için büyük umut ışığı olmuştur.

İnsan vücudunun en büyük dokusu kas doku olup; doğumdan yetişkinliğe kadar % 25-40 arasında değişen bir oranda bulunur (Serbest ve Eldoğan, 2014). Kas dokusu yaşam boyunca fizyolojik kullanımla yıpranmalar gösterip hasara uğrayabilir (Akpulat, 2014). Omurgalıların çoğunda iskelet kası, terminal olarak farklılaşmış bir dokudur. Bu nedenle, mevcut miyofibrillerin çekirdekleri kalıcı olarak postmitotiktir ve gelişim sonrası büyümeye veya onarıma katılamazlar. Ancak kas dokusu hasar gördüğü zaman onarılır veya tamamen yenilenir (Cornelison ve ark., 2001). Bu yenilenme satellit hücrelerin kendiliğinden kas liflerine katılması ile sağlanmaktadır (Akpulat, 2014). Satellit hücreler, kas doku zarar gördüğünde aktif hale gelir ve rejenere olan kas içinde yeni miyofiberler oluşurmakla görevlidir. Musküler distrofi (kas erimesi) hastalarında erken dönemde satellit hücreleri kas hücresini rejenere edebilirken, hastalık ilerlemeye devam ettikçe satellit hücreler yaşlanırlar ve rejenerasyonda yer alamazlar (Ural, 2017). Günümüzde uygulanan medikal ve girişimsel tedaviler semptomatik iyileşme sağlarken, esas altta yatan yaygın miyosit (kas hücresi) kaybını düzeltmekte çoğu zaman yetersiz kalmaktadırlar (Taşolar ve Pekdemir, 2015). Bu sebeple yeni ve etkili tedavilerin geliştirilmesi acil ihtiyaçtır. Kök hücrelerin kendi kendilerini yenileyebilmeleri, yüksek derecede proliferasyon kabiliyetleri ve en azından bir tane farklı hücre tipine diferansiye

olabilmeleri en önemliği özellikleridir. Daha önce yapılan çalışmalarda hematopoietik kök hücrelerin iskelet kaslarına (Ferrarive ark., 1998; Gussoni ve ark., 1999) ve kalp kası hücrelerine (Jackson ve ark., 2001; Orlik ve ark., 2001) dönüşebileceği rapor edilirken sonraki çalışmalarda hematopoietik kök hücrelerin kardiomiyositlere dönüşmediği bildirilmiştir (Murry ve ark., 2004; Balsam ve ark., 2004). Bununla birlikte insülin benzeri büyüme faktörlerinin (IGF1 ve IGF2) kas hipertrofisine yardımcı olduğu, her iki sitokinin de satellit hücrelerinin proliferasyon ve diferansiyasyonunu sağladığı birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (D'Amario ve ark., 2011; Huang ve ark., 2012; Wail ve Canty, 2013; Ural, 2017). Fibroblast büyüme faktörü2 (FGF2), tek tabakalı kültürlerde MKH (Mezenkimal Kök Hücre) 'nin büyüme hızını ve ömrünü belirgin şekilde arttırdığı yapılan başka bir çalışmada bildirilmiştir (Tsutnami ve ark., 2001). FGF2, IGF1'in miyojenik öncül hücrelerin proliferasyonunu uyardığı yapılan deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (Deasy ve ark., 2002). Bu sonuçlara göre bir diğer büyüme faktörü olan FGF'lerin de MKH'nin kendini yenilemesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Yapılan çalışmalar, farklı kök hücre gelişim programları ve/veya genetik gereklilikleri olan farklı kas gövde ve progenitör hücrelerinin çeşitli kasların üretilmesi ve/veya yenilenmesi için önemli olduğunu göstermektedir (Kang ve ark., 2008).

Bu tez çalışmasında büyüme faktörlerinden IGF1 ve FGF2'nin, adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin iskelet kas hücresine farklılaşma sürecine etkisinin araşltırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler

Kök hücre, özelleşmemiş hücre tiplerine öncülük edebilen (Demirdöver, 2015), kendisini yenileyebilen ve farklı hücre türlerine dönüşebilme yeteneğine sahip olan hücrelerdir (Şahin ve ark., 2005). Aktif farklılaşma sinyali ile uyarıldıklarında diferansiye olarak birbirlerinden farklı hücre türlerine dönüşebilmeleri sebebiyle *in vitro* olarak çoğaltılabilme özelliğine sahiptirler (Eroğlu, 2014). Hücrelerin kök hücre sınıfına girebilmesi için literatürde kabul edilmiş 5 temel özelliği taşıması gerekir. Bunlar (Yaşar, 2014):

1-Kök hücrelerin rejenere olabilmesi ve devamlı olarak bölünebilmesi gerekir

2-Kök hücreler özelleşmemiş yapılardır.

3-Kök hücre kökenli yeni bir hücre, özelleşmiş hücre tiplerine kaynaklık edebilmelidir.

4-Kök hücreler, zarar gören dokuya transfer edildiğinde o dokunun hücrelerini foksiyonel olarak çoğaltabilmelidir.

5-Kök hücreler *in vivo* ortamlarda da farklılaşmamış kuşaklara katkı sağlayabilmelidir.

2.1.1. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri

İşlevsel olarak henüz farklılaşmamış, potansiyel olarak heterojen olan kök hücrelerin başlıca üç temel özelliği vardır:

2.1.1.1. Self-Renewal (Kendini Yenileme)

Kök hücrelerin temel kriterlerinden olan kendini yenileme ifadesi, hücrenin çoğalabilme, ölümsüz, sürekli ve sınırsız bölünme özelliğine sahip olabilme özelliklerini belirler (Öztel, 2010). Kök hücrelerin asimetrik olarak bölünebilmesi onları diğer hücrelerden ayıran önemli farklılıklarından biridir (Kıvanç ve ark., 2015). Kendini yenileme ve farklılaşma arasındaki denge, asimetrik veya simetrik olabilen hücre bölünmesi olayının kontrolü ile sağlanır (Daynac ve ark., 2017). Asimetrik hücre

bölünmesiyle hücre bir taraftan öncü hücreyi oluşturacak olan hücreyi meydana getiriken diğer taraftan da kendi yedeğini oluşturan bölünme şeklidir. Bu sayede kök hücre havuzunun ömür boyu sabit kalması sağlanmış olur (Kıvanç ve ark., 2015).

Kök hücre havuzunu sabit tutabilmenin gerekliliği kadar, embriyonun gelişimi esnasında gerekli hücre ya da doku hasarlarının giderilmesi için yeni hücre ihtiyacını karşılamak gerekir. Bu durum, simetrik hücre bölünmesi ile gerçekleştirilir. Bilhassa doku fonksiyonlarının zarar görmesi durumlarında bu bölünme türüyle kök hücrenin öncü hücreye dönüşmesi sağlanarak kısa sürede onarılma mekanizması güvence altına alınmış olur (Öncü hücre + Öncü hücre). Ek olarak kök hücreler simetrik olarak bölünebilme yeteneğiyle yeni kök hücreler de oluşturabilirler (Kök hücre + Kök hücre) (Matur ve Solmaz, 2011).

Kök hücrelerin klon oluşturması sayesinde hücreler kültüre edilebilir ve aynı tipten çok fazla koloni üretilebilir. Böyle oluşturulan kök hücrelerin de kendi başına çoğalması ve klon oluşturmasını sağlamak gerekir. Bunun için de, telomeraz enzim etkinliğini yükseltmek gereklidir (Akgün 2017). Kök hücreler de telomeraz enzimi sayesinde, etkisini üst düzeyde göstermesinden dolayı telomerler kısalmaz; bu sayede, kök hücrelerin yaşlanmasına ve bölünebilme yeteneğinin azalmasına engel olmaktadır (Erden, 2014).

2.1.1.2. Pluripotensi (Köklülük)

Köklülük, kök hücrelerin diğer bütün hücrelerden farklı oluşunu hücresel ve moleküler özellikleri açıklayan bir terimdir. Kök hücrelerin parmak izi olarakta nitelendirilebilir (Kıvanç ve ark., 2015). Pluripotensi; her üç germ yaprağına ve bunların türevlerine farklılaşabilme durumudur (Akkoç ve Toplu, 2016). Bu dinamik etkiye sahip olmanın bir takım iç ve dış faktörlerin etkisiyle gerçekleşebileceği ifade edilmektedir. Dış etkenleri hücrenin bulunduğu ortamdaki diğer hücrelerin salgıladığı parakrin etkili moleküller, otokrin faktörler, hücre-hücre temasları, reseptör-ligant etkileşimi, hücre yüzeyi ve hücre içi sinyal yolakları oluştururken, iç etkenler olarak ise bir dizi transkripsiyon faktörü, kromatin düzenleyici ve buna benzer proteinler ile bunların üzerindeki epigenetik mekanizmalar sayılmaktadır (Can, 2014).

2.1.1.3. Plastisite (Differansiyasyon)

Hücrenin farklı dokulardaki hücrelere dönüşebilme durumuna "Plastisite" ya da "Differansiyasyon" hücrenin farklı dokulardaki hücrelere dönüşebilme kapasitesine ise "Farklılaşma Kapasitesi" denilmektedir. Bu terimler birbiri yerine de kullanılabilmektedir (Ateş, 2016).

"Plastisite" terimini açıklayan 5 farklı metabolik yol vardır (Güneş, 2005);

1) Transdeterminasyon; Bazı hücre dizilerini oluşturmaya programlanmış olan kök hücre başka bir kök hücreye farklılaşır ve bu prekürsör hücrelerin hücre tiplerini meydana getirir.

2) Trandiferansiyasyon;Farklılaşmış bir hücre uygun koşullar altında bir diğer farklılaşmış hücrenin fenotipini kazanır.

3) Dediferansiyasyon; Bir progenitör veya prekürsör hücrenin dediferansiyasyonu; bunu takiben bir diğer hücre dizine farklılaşmasıdır.

4) Hücre füzyonu; Kök hücre veya daha olgun hücrelerin yönlenmiş hücre dizileriyle füzyonu, yeni yönlenmiş hücre dizilerinin meydana gelmesine sebep olur.

5) Totipotent kök hücreden multipotent doku spesifik hücrelerin gelişmesidir

Organizma ya da organdaki hücrelerin sayısı yeterli miktara ulaşınca, hücrenin çoğalma ile ilgili mekanizmalar devre dışı bırakılır ve hücrenin farklılaşma ile ilgili olan mekanizmalar açılır. Bu durumda hücre bölünme döngüsü 'G0 fazı' yani 'dinlenme fazı'nda kalır. Farklılaşmayı devam ettiren etkenlerin ortamdan çekilmesiyle hücre tekrar bölünme döngüsünün G1 fazına girerek döngüye devam eder (Erden, 2014).

Kök hücreler, vücut ihtiyaçlarına bağlı olarak organize bir şekilde daha özel hücre tipleri üretme yeteneklerinden dolayı doku homeostazı mekanizması için vazgeçilmezdir. Kök hücreler, aynı zamanda farklılaşmamış ve kendi kendini yenileyici bir durumda tutan, niş olarak da adlandırılan özel mikro ortamlarda bulunur. Çeşitli dokularda yapılan kapsamlı çalışmalar, kemik iliği, cilt, bağırsak, iskelet kası, vokal kord, beyin, omurilik, mide, yemek borusu ve diğerleri dahil olmak üzere kök hücre davranışını modüle etmede nişin önemini göstermiştir. Yakın geçmişte modern teknoloji teknikleri kullanarak kök hücre nişlerinin tanımlanması ve karakterizasyonunda olağanüstü ilerleme kaydedilmiştir. Bu gelişme, kök hücrelerin bulunduğu mikroortamdaki ana hücresel bileşenlerin tanımlanmasına ve kök hücre

davranışının kontrol edildiği moleküler mekanizmaların tanımlanmasına yol açarak kök hücre düzenlemesinde yer alan temel niş sinyallerini ortaya çıkarmaktadır (Birbrair, 2017).

Farklılaşma ilk olarak blastokist aşamasında başlar ve ikinci olarak transkripsiyon faktörleriyle devam eder. Farklılaşmaya dair en önemli mekanizma ise epigenetik kontroldür. Gametlerden başka diğer bütün hücreler aynı gen yapısına sahiptir ancak gen ifadeleri herbirinde başkadır. Burada DNA metilasyonunun rolü önemidir (Sir ve ark., 2016). Kök hücrelerin farklılaşmaya başlamasından itibaren DNA metilasyonunun normal bir gelişim için gerekli olduğu tespit edilmiştir ancak farklılaşmanın gerçekleşebilmesi için bazı gen bölgelerinde metillenme daha fazla olması gerekmektedir (Toparslan ve ark., 2015).

Kök hücrelerin farklılaşma sırasında gerçekleşen karmaşık mekanizmalarına dışardan müdahelede bulunulabilinirse, birçok dokuyu üretebilmek mümkün hale gelebilir. Bu özellikten faydalanabilmek ise doku yenilenme tedavileri için oldukça büyük bir öneme sahiptir (Yılmaz, 2009).

2.1.2. Kök Hücre Türleri

2.1.2.1. Farklılaşma Potansiyellerine Göre Kök Hücreler

Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre çeşitli gruplara ayrılmıştır.

Totipotent kök hücreler: Canlıdaki bütün hücreleri meydana getirme yeteneği olan kök hücrelerdir. Totipotent kök hücreler embriyoyu oluşturabildiği gibi, embriyo sonrası da bütün doku ve organlara dönüşebilir. Totipotent kök hücre kavramı embriyonun 5. gününe dek oluşan tüm blastomerleri kapsamaktadır (Karaduman, 2012).

Pluripotent kök hücreler: 3 germ tabakasından köken alarak canlıdaki hücrelerin tamamını oluşturabilme özelliğine sahip olan hücrelerdir. Blastosist evresindeki embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilir (Sevim ve ark., 2012).

Multipotent kök hücreler: Pluripotent hücrelere göre daha sınırlı bir farklılaşma kapasitesi olmasına rağmen *in vitro* olarak uygun uyaranlar kullanıldığında farklı türde hücrelere dönüşebilir. Örnek olarak beyindeki multipotent bir kök hücrenin nöronları ve nöroglia hücrelerini oluşturabilme durumu verilebilir (Eyüpoğlu, 2017).

Oligopotent kök hücreler: Kendi kendilerini yenileyebildiği gibi iki ya da daha fazla hücre türüne dönüşebilir. Örneğin;hematopoietik kök hücrelerin hem miyeloid hem de lenfoid tiplerine farklılaşabilme özelliği bu durumun en güzel örneğidir (Ergin, 2014).

Kuadripotent kök hücreler: Mezenkimal progenitor kök hücre tipidir.

Tripotent kök hücrele: Glialarla sınırlı prekursor kök hücre tipidir.

Bipotent kök hücreler: İki farklı hücre tipine diferansiye olabilen kök hücre tipidir.

Unipotent kök hücreler: İleri düzey organizmalarda tek bir hücre türüne farklılaşma özelliği gösteren hücre tipidir (Bhattacharya ve Stubblefield, 2016).

Dokuların rejenerasyonunda görev alabildiği gibi geniş doku hasarlarının tamiri için pluripotent kök hücreler kullanılabilir (Sir ve ark., 2016).

2.1.2.2. Elde Edildikleri Kaynağa Göre Kök Hücreler

2.1.2.2.1. Embriyonel Kök Hücre:

İnsanı oluşturabilme potasiyeline sahip ilk hücre zigottur (Ünsal ve ark., 2014). Bu erken dönem memeli hücrelerine embriyonel kök hücreler (EKH) denilmektedir. Sınırsız farklılaşma ve çoğalma yeteneğine sahip olup totipotent özellik gösterir (Thomson ve ark., 1998). EKH'ler ve embriyonik germ hücreleri yalnızca *in vivo* durumda gelişim göstermeyip (Yılmaz ve Uçar, 2006), *in vitro* olarak gerekli kültür ortamı oluşturulduğunda somatik her hücre tipine farklışabileceği yapılan çalışmalarda ifade edilmiştir (Fındıklı, 2006). Embriyonik kök hücrelerin rejeneratif tıp ile ilgili geniş bir kullanım alanında faydalanılabileceği düşünülmektedir. Bu hücrelerin alıcıya uyum sağlayacak şekilde yapılandırılması, nakillerdeki immün uyumun sağlanması konusundaki sorunların giderilmesine yardımcı olabilir (Gerontol, 2003).

Embriyonel kök hücreler, hasta bireyin deri hücresinden elde edilen hücre çekirdeğinin hücre çekirdeği çıkarılmış ovumun içine yerleştirilerek psödo döllenmenin başlatılması ve embriyo blastosist aşamasına geldiğinde iç hücre kitlesinden kök hücrelerin toplanmasıyla elde edilmektedir. Elde edilen embriyonik kök hücreler daha sonra *in vitro* ortamda istenilen dokuya dönüştürülüp hasarlı alana nakledilmektedir (Meran, 2016).

2.1.2.2.2. Yetişkin Kök Hücreler

Doku ya da organlarda nadir bulunan, kendini kopyalama özelliğine sahip, özelleşmiş hücrelere dönüşebilen, farklılaşmamış hücrelerdir (Bhattacharya ve Stubblefield, 2014). Erişkin kök hücrelerin en önemli görevi bulunduğu dokunun yaşamını devam ettirmektir. Doku zarar gördüğünde ise yetişkin kök hücrelerin görevi dokuyu onarmaktır (Matur ve Solmaz, 2011).

Erişkin kök hücreler iki temel esasa göre belirlenirler. Birincisi hücresel morfoloji, ikincisi ise yer aldığı doku ve organa onları bağlayan özel işaret proteinleridir. Erişkin kök hücreleri ilk araştırmalarda sadece içinde yer aldığı dokunun hücre hattına farklılaşabildikleri belirtilmiş, sonraki araştırmalar erişkin kök hücrelerin plastisite ve transdiferasyon özelliklerini kullanarak çeşitli hücre türlerine dönüşebilme yetenekleri olduğunu göstermiştir edilmiştir (Özmen ve ark., 2006).

Yetişkin kök hücreler, mikroçevrelerinin barındırdığı özelliğe göre yani yer aldığı dokuya göre davranış gösterirler. Kendine ait özel mikroçevre içerisinde dinlenme durumunda bekleyebildikleri gibi mikroçevrelerindeki değişiklikleri takiben prolifere olabilir ya da değişik hücre türlerine dönüşebilirler. Embriyonik kök hücre gibi yüksek telomeraz aktivitesine sahip olsalar bile çok daha sınırlı bir farklılaşma özelliklerine sahiptirler (Fuchs ve ark., 2004; Şimşek, 2012).

2.1.2.2.3. Fetüs Kök Hücreleri

Fetüs kök hücresi, fetüsten yalıtılmıştır ve özellikle fetüsteki eşey hücrelerinden faydalanılmaktadır. Bu hücreler embriyonik kök hücreler kadar olmasa bile pluripotent potansiyel gösterir. Ancak, hem anneden hem de babadan gelen genetik ifadeleri taşıdığından dolayı terapötik klonlama ve kök hücre terapilerinde kullanılması durumunda nakledilen hastada immünolojik reaksiyonlara sebep verir. Bu sebeple uygulama sahası oldukça kısıtlıdır (Emin, 2012).

2.1.2.2.4. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre

İnsan embriyonik kök hücrelerinin kendi kendilerini sonsuz rejenere edebilme özelliğinin yanı sıra pluripotent olması, yani üç farklı embriyonik tabakadan orjin alan hücre çeşidine farklılaşma yeteneği sayesinde hücresel tedavi çalışmaları açısından büyük umut vaat etmektedir (İskender ve Canatan, 2013).

İndüklenmiş pluipotent kök hücrelerin elde edilmesi hücre füzyonu, somatik hücre gen ve çekirdek aktarımı gibi yollarla hedef hücreye gen aktarılarak, pluripotent özellikte bir hücrenin yeniden programlanması ile sağlanmaktadır (Sevim ve Gürpınar, 2011). İndüklenmiş pluripotent kök hücre kavramının literatüre kazandırılması 2006 yılında fare hücreleri, 2007 yılında da ise insan hücre çalışmalarıyla olmuştur (Ateş, 2016). İnsan indüklenmiş pluipotent kök hücrelerini türetmek için kullanılan ilk yöntemlerde, hem vektör omurgası hem de transgenlerin genomla kalıcı olarak bütünleştirildiği viral vektörler kullanılarak erişkin hücreye embriyonel kök hücre benzeri özellik kazandırılmıştır (Yu ve ark., 2009). Ancak yapılan çalışmalarla genomik integrasyon ve kanser hücrelerine dönüşebilme riski gibi bazı problemlerle karşılaşıldığı için henüz hücresel tedavi amaçlı faydalanılabilmesinin yeterince güvenli olmadığı yargısına ulaşılmıştır (Sevimli ve Semerci, 2016) ve bu sorunların çözülmesi için konuyla ilgili çalışmalar hızla devam etmektedir.

2.1.3. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

İlk olarak 1976'da Friedenstein tarafından keşfedilen mezenkimal kök hücre (MKH)'ler kemik iliği kaynaklıydı (Berebichez ve ark., 2018). Yıllar içinde yapılan çalışmalarla MKH'lerin sadece kemik iliğinden değil, osteoblastlar, kondrositler ve adipositler gibi organ ve dokulardan da izole edilebildiği gösterilmiştir (Schipani ve Kronenberg, 2008). Bugünkü anlamda mezenkimal kök hücre kavramının açıklanması 1999 da yapıldı. Bu açıklama literatüre "Kemik iliğinden orjin alan ve uygun uyarıcılarla üç temel seri; osteojenik, kondrojenik, adipojenik seriye farklılaşabilen CD73, CD54 (ICAM-1), CD105, CD39, CD49e (α5- integrin) gibi belirteçleri ifade eden, uzantılı fibroblast-benzeri multipotent hücrelerdir.' şeklinde geçmiştir (Şekil 2.1.) (Chen ve ark., 2007; Pansky ve ark., 2007).

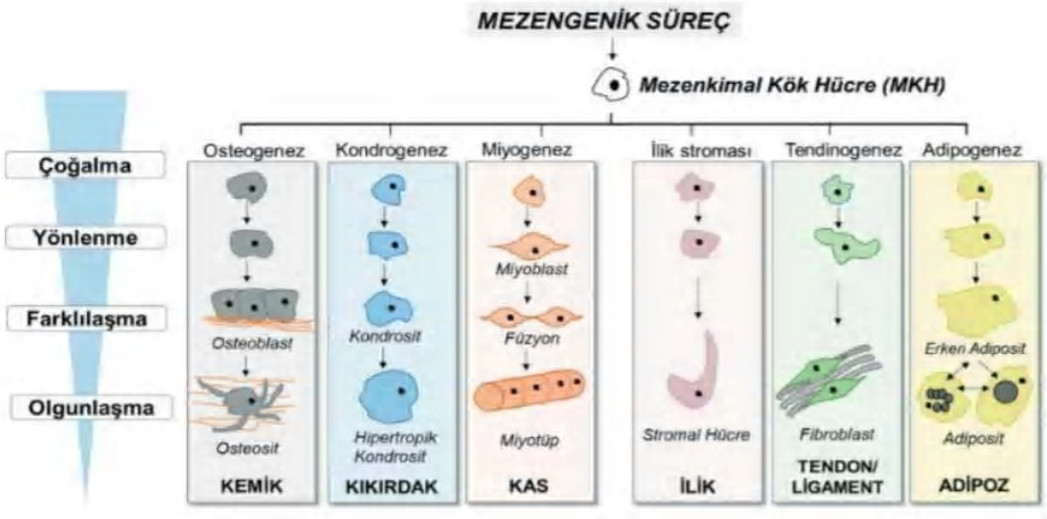
MKH, mezorderm tabakasından köken alır. Vücudun bazı bölümlerinde ise nöral krista kaynaklı mezenkimal dokudan da gelişirler (Tekeli ve ark., 2016). Mezenkimal stromal hücreler veya multipotent mezenkimal stromal hücreler olarak da adlandırılmaktadırlar (Matur ve Solmaz, 2011). MKH'ler orjin aldığı dokunun ismine göre de adlandırlar. Örneğin; yağ dokusu kaynaklı MKH'ler, kemik iliği kaynaklı MKH'ler gibi (Mete, 2009).

MKH'ler "destek hücresi" özelliği taşıyan, stromal kökenli, erişkin kök hücre tipidir. Bu hücreler hematopoetik özellikte olmayan (non-hematopoetik) pluripotent kök

hücrelerdir. Birçok değişik hücre türüne farklılaşabilme yetenekleri vardır. Pek çok dokudan elde edilebilmesi, sayıca çoğalabilmesi ve dayanıklı olması nedeniyle tıbbın birçok alanında kullanım potansiyeline sahiptirler (Yörükoğlu, 2012). Köken aldığı dokunun hücrelerinden başka hücrelere de farklılaşma kapasitesi olan bu hücrelerin *in vitro* şartlarda kendi kendilerini rejenere edebildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Yanbakan, 2015). Osteojenik, nörolojik, adipojenik ve kondrojenik hücreler mezenkimal kök hücrelerden farklılaşmış olsa da (Şekil 2.1.) farklılaşma sırasında ihtiyaç duyulan koşullarda birbirinden farklılık göstermektedir. Örneğin; kondrojenez damar yokluğu gerektirir, oysa osteojenez damar yakınlığına bağlıdır (Caplan, 1991).

Mezenkimal kök hücreler homojen bir grup olmadığından dolayı içerisinde multipotent erişkin progenitör hücreler, multilineage uyarılabilir kök hücreler ve çok küçük embriyonik hücre benzeri kök hücreler gibi farklı kök hücre türlerinide bulundururlar. Bahsi geçen hücre gruplarının bilindik MKH ve hemapoetik kök hücrenin öncülü olduğu düşünüldüğü gibi (Ovalı, 2008), multipotent erişkin progenitör hücrelerin MKH den oldukça farklı olduğuda düşünülmektedir (Reyes ve Verfailli, 2001).

Sonuç olarak; Mezenkimal kök hücreler araştırmalarda öne çıkmasında, farklılaşma kapasitesi, hasarlı dokuya göç etmeleri ve hasarlı dokuyla füzyon yapabilmeleri, kolay izole edilebilir olmaları, non-immujenik olmaları (Sotiropoulou ve ark., 2009), immünosupresif (Hass ve ark., 2011; Hocking, 2011) ve immumodulator (Ullah ve ark., 2015) etki gösterebilmeleri, gen modifikasyonuna duyarlılık özelliklerine sahip olması özellikleri etken olmuştur.



Şekil 2.1. Mezenkimal kök hücrenin farklılaşabildiği dokular (Eyüboğlu, 2017).

2.1.3.1. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları

MKH'lerin birçok dokudan köken alabiliyor olması ortak bir anatomik yerleşimden kaynaklabileceğini düşündürmüştür. Bu durumda en kuvvetli aday bölge damar çevresi ve perisitlerdir (Corselli ve ark., 2010; Can, 2012). MKH kaynaklarının başında, insan vücudunun özellikle damar bakımından zengin bağ dokusu içeren yağ dokusu ve göbek kordonu gibi dokular gelmektedir (Prockop, 1997).

MKH'lerin ana kaynağı kemik iliği olmakla birlikte kemik, kas dokusu, diş pulpası ve maksillofasial dokular, karaciğer, lipoaspirasyon materyalleri, kordon kanı, kordon stroması, plasenta, amniyon sıvısı, sinovial sıvıdan da elde edilebilirler (Gözen ve ark., 2015). Klinikte kemik iliğinden MKH izolasyonunun hasta bireyler için ağrılı ve masraflı olmasından dolayı araştırmacılar farklı kaynaklar arayışına girmişlerdir. Adipoz doku mezenkimal kök hücre bakımından oldukça zengindir (Eroğlu, 2014). Adipoz dokudan izole edilen multipotent hücreler adipoz kök hücreler olarak nitelendirilmektedir. Adipoz kök hücreler sağlıklı vericilerden liposakşın adı verililen yöntemle elde edilirler (Kıvanç ve ark., 2012). Yağ dokusunu oluşturan hücrelerin çoğunluğu adiposit olmakla birlikte içerisinde preadiposit, post-adiposit, mezenkimal kökenli kök hücre, makrofaj, fibroblast, retikülosit, vaskuler endotel hücreleri, mast hücreleri ve sinir sistemi elemanlarının da bulunduğu bildirilmektedir (Gündeşlioğlu, 2013).

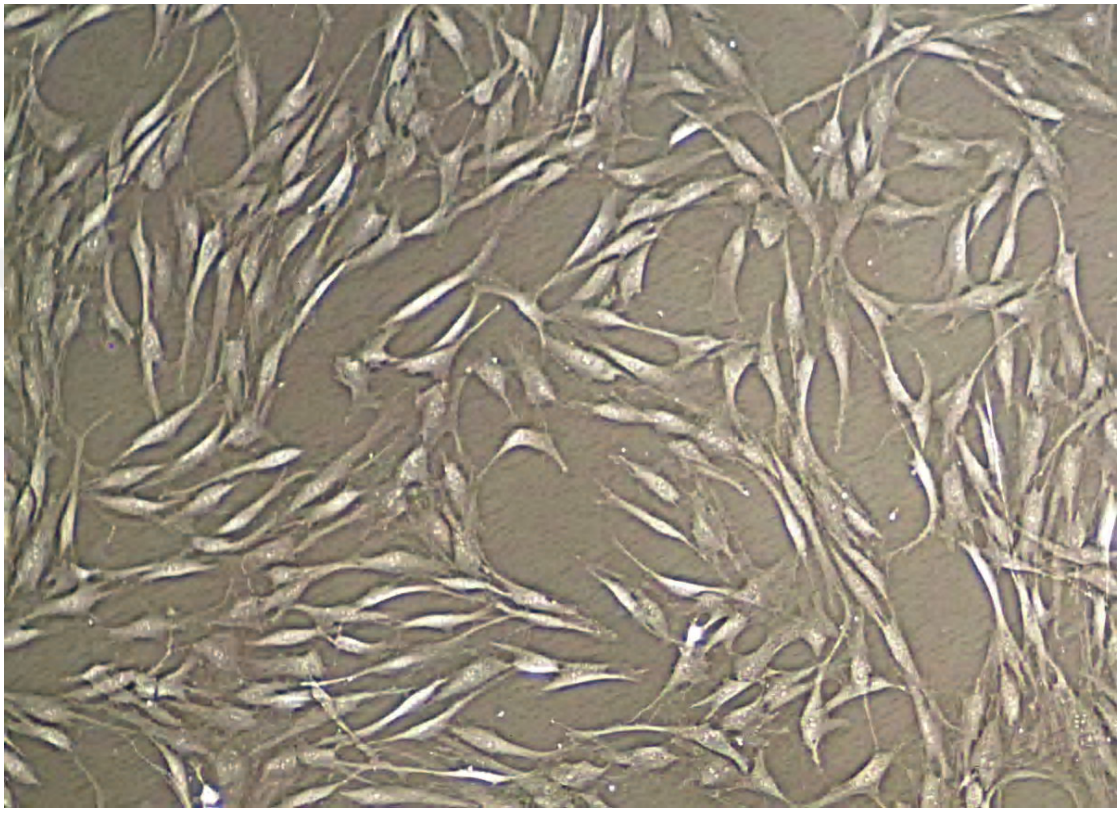
Yağ dokusu kökenli MKH araştırmaları için iyi bir alternatif olmasının sebepleri; kemik iliği gibi yağ dokusunun da mezenşimal kaynaklı olması, kolay elde edilebilirliği gibi durumlardır (Li ve ark., 2014). Hatta yağ kökenli hücrelerin kemik iliği kökenli mezekimal kök hücrelerle karşılaştırıldığında daha proliferatif özellikte oldukları; mitoz, inflamasyon ve stres durumlarına cevap olarak daha yüksek düzeyde ifade edildikleri; yüksek düzeyde büyüme faktörü ve sitokin salgıladıkları ortaya konması iyi bir avantaj olmuştur (Ergin, 2014).

MKH'ye dair elde edilen sonuçların farklılık gösteriyor olması farklı kökenlerden geliyor olmasından kaynaklanabilir (Colter ve ark., 2000).

2.1.3.2.Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Özellikleri

Mezenkimal kök hücreler morfolojileri mikroskop ile izlendiğinde fusiform şekilli, iğ şeklinde ve fibroblasta benzer hücreler olarak görülürler (Şekil 2.2.). Fibroblastlardan

ayrılan farkları ise; nükleus yerleşiminin fibroblastlarda asimetrik görülürken mezenkimal kök hücrelerde simetrik olmasıdır (Pravin ve ark., 2008). Yine de, bu hücrelerin heterojen bir grup olmasından dolayı tutarlı bir şekilde morfolojik olarak tanımlaması veya bunları spesifik yüzey belirleyici özelliklerle ilişkilendirmek mümkün değildir (Haasters ve ark., 2009).



Şekil 2.2. Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin mikroskopik görünümü.

2.1.3.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklanma Kümeleri

(CD:Clusters of differentiation)

CD (Yüzey farklılaşma antijenleri) adlandırmaları lökosit yüzey molekülleri ve bunlara karşılık antikorların karakterizasyonu ve incelenmesi için benzer reaksiyon gösteren yapıları gruplandırılarak tek bir numara ile ifade edilmesi esasına dayanır. CD terminolojisi tüm dünyada kabul gören bir yöntemdir ve yüzey CD1'den CD350'ye kadar numaralandırılmış olan bu antikorlar günümüzde birçok bilimsel araştırmada kullanılmaktadır (Zola ve ark., 2007). Mezenkimal kök hücrelerin tespit edilmesinde birden fazla yüzey reseptör belirteci kombinasyon oluşturularak kullanılmaktadır (Mete,

2009). Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (ISCT) tarafınca literatürde kabul edilen kriterlere göre insan orjinli MKH'lerin CD73, CD90 ve CD105 yüzey reseptörleri bakımından pozitif; CD45, CD34, CD14, CD19 ve HLA-DR yüzey reseptörleri bakımından negatif oldukları gösterilmiştir (Tablo2.2.) (Çetin ve ark., 2010).

Tablo 2.1. Mezenkimal kök hücreler yüzeylerinde taşınan adezyon moleküller (Yılmaz, 2008).

Adezyon molekülü	**CD numarası**	**Ekspresyon**
ALCAM	CD166	Pozitif
ICAM-1	CD54	Pozitif
ICAM-2	CD102	Pozitif
E-Selektin	CD62E	Negatif
P-Selektin	CD62P	Negatif
L-Selektin	CD62L	Pozitif
VCAM	CD106	Pozitif
Hyaluronate Reseptör	CD44	Pozitif
NCAM	CD56	Pozitif
LFA-3	CD58	Pozitif
LFA-1 α	CD11a	Negatif
LFA-1 β	CD18	Negatif
Cadherin 5	CD144	Negatif
PECAM-1	CD31	Negatif
VLA- α 1	CD49a	Pozitif
VLA- α 2	CD49b	Pozitif
VLA- α 3	CD49c	Pozitif
VLA- α 4	CD49d	Negatif
VLA- β	CD29	Pozitif
Beta 4 integrin	CD104	Pozitif

ALCAM : Aktif lökosit hücre yapışma molekülü
ICAM : Hücreler arası yapışma molekülü
VCAM : Vasküler hücre yapışma molekülü
VLA : Geç antijen
LFA : Lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen-1
PECAM : Trombosit endotel hücre yapışma molekülü
NCAM : Sinir hücresi yapışma molekülü

2.1.3.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşabilme Kapasitesi

MKH'ler uygun ortam sağlandığı takdirde çeşitli yönde farklılaşabilme özelliğine sahiptirler. Bu özelliği ortaya çıkarabilmek için çeşitli histolojik ve immunolojik yöntemlerle kullanılmaktadır (Eroğlu, 2014). *In vitro* çalışmalarda hücre hattının pasajlanma sayısı ve pasajlarda ki hücrelerin yoğunluğu da MKH'nin gelişimi ve farklılaşma kapasitelerinin muhafaza edilebilmesi açısından oldukça önemlidir (Ovalı, 2008). MKH elde edilen donörlerin yaş, cinsiyet gibi bireysel farklılıkları, laboratuvarlarda kullanılan kültür tekniklerinin birbirinden farklı olması ve doku kültürü çalışmaları için kullanılan medyum içeriğinin birbiriyle aynı olmaması sebebiyle MKH için standart bir belirteç kombinasyonu belirlenememiştir (Çetin ve ark., 2010).

MKH'lerin osteojenik farklılaşması; deksametazon, β-gliserol fosfat ve askorbatın etkisi altında ve %1 FBS varlığında karakterize edilirken (Pittenger ve ark., 1999), kondrojenik farklılaşma kapasitesi, *in vitro* şartlarda tip II kollajeni ifade eden parlak hücre kümelerinin oluşumu ile kanıtlanır. MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasında, büyüme faktörü β1, askorbat-2-fosfat ve deksametazon gibi transforme edici faktörlerin kullanıldığı bazı çalışmalar tarafından rapor edilmiştir (Hass ve ark., 2011; Awad ve ark., 2011). Farklılaşma protokolleri Tablo 2.3.'de gösterilmiştir.

MKH farklılaşırken kullanılan kültür ortamları kaynağına göre en ideal şekilde seçilmesi gerekir. Bir hücre grubu için uygun olan ortam başka dokulardan köken alan hücre grubu için uygun hücre kültürünü oluşturmayabilir. Yapılan bir çalışmada farklılaşma için kulllanılan deksametazonun insan kaynaklı MKH'yi osteoblasta dönüştürüken fare kaynaklı MKH'yi adiposite dönüştürdüğünü göstemiştir (Meirelles Lda ve Nardi, 2003).

Kemik iliği kaynaklı MKH'lere kıyasla daha yüksek proliferasyon kapasiteleri olan göbek kordonu kaynaklı MKH'ler düz kas hücrelerini üretmek için kullanılmaktadır (Gu ve ark., 2018).

Tablo 2.2. MKH'lerin karakterizasyonunda kullanılan farklılaşma protokollerinden bazıları (Coşkun, 2015).

Adipojenik	DMEM	FBS (%10)	0,5 mM IBMX 1 mikroM deksametazon 10 mikroM indometazin 200 mikroM indometazin %1 antibiyotik/antimikotik
Oseteojenik	DMEM	FBS (%10)	0,1 mikroM deksametaon 50 mikroM askorbat-2-fosfat 10 mM B-gliserofosfat %1 antibiyotik/antimikotik
Kondrojenik	DMEM	FBS (%10)	6,25 mikrog/ml insülin 10 ng/ml TGFB1 50 nM askorbat-2-fosfat %1 antbiyotik/antimikotik
Miyojenik	DMEM	FBS (%10) HS (%5)	50 mikroM hidrokortizon %1 antibiyotik/antimikotik
Nörojenik	DMEM	Yok	5-10 mM β-merkaptoetanol

Tablo 2.3. MKH 'lerin *in vitro* farklılaşma potansiyeli **(**Ullah ve ark., 2015**).**

MKH'lerin Kaynağı	***İn vitro* Farklılaşma Potansiyeli**
Kemik iliği kaynaklı MKH	Osteositler, kondrositler, adipositler
	Karaciğer hücreleri
	Kardiyomiyositler
	Pankreas hücreleri
	Nöronal hücreler
Adipoz doku kaynaklı MKH	Osteositler, kondrositler, adipositler
	Karaciğer hücreleri
	Kardiyomiyositler
	Pankreas
	Nöronal hücreler
Diş pulpası kaynaklı MKH	Osteositler, kondrositler, adipositler
	Pankreas hücreleri
	Melanosit
	Nöronal hücreler
Göbek kordonu kaynaklı MKH	Osteositler, kondrositler, adipositler
	Karaciğer hücreleri
	Pankreas hücreleri
	Nöronal hücreler
Limb Bud kaynaklı MKH	Osteositler, adipositler
	Karaciğer hücreleri
	Nöronal hücreler
Wharton'ın jöle kaynaklı MKH'ler	Osteositler, kondrositler, adipositler
	Karaciğer hücreleri
	Nöronal hücreler
Deri ve sünnet derisi kaynaklı MKH'ler	Osteositler, kondrositler, adipositler
	Miyositler

2.1.3.5. Mezenkimal Kök Hücre Kullanımının Dezavantajı

Şu ana kadar birçok avantajı olduğunu ifade ettiğimiz bu hücrelerin kullanımında bazı dezavantajlarda vardır. Dezavantajların başında gelebilecek en önemli durum ise sayılarının çok seyrek olması sebebiyle *in vitro* ortamda haftalarca sürmesi gereken kültürlerde sayılarının artırılmasının gerekliliğidir. Bu durumunda da üst düzey bir teknoloji, alt yapı, tecrübeye ihtiyaç duymakla birlikte maliyetinin yüksek olmasından dolayı da dünyada az sayıda merkezde *in vivo* olarak kullanılabilecek mezenkimal kök

hücre üretimi gerçekleştirilmektedir (Akgün, 2016). Yine kök hücre tedavisinin insanlar üzerindeki denemelerinin henüz yetersiz olması hatta hayvanlar üzerinde başarı görmüş bazı tedavilerin, insanlar üzerinde hiç denenmemiş olmasıda mezenkimal kök hücre kullanımını oldukça sınırlayan durumlardandır. Kök hücre nakilleri sonrası dokularda onkogenik durumla karşılaşılma riski yada doku reddi yaşanması, kök hücre tedavisini sınırlayan önemli etmenlerdendir (Daştan ve ark., 2009).

Kök hücre uygulamalarında yaş faktörüde oldukça etken bir durumdur (Akgün, 2016). MKH sayısı dokularda yaşla birlikte hızla azalma gösterir. Yenidoğanın kemik iliğinde 10.000 çekirdekli hücreden biri MKH iken, erginlik döneminde 100.000'de bir, 30 yaşlarında 250.000'de bir, 50 yaşlarında 400.000'de bir ve 80'li yaşlarda ise 2.000.000'da bire düşmektedir (Caplan, 1994; Akgün, 2017).

2.2. İnsanda Kas Dokusu

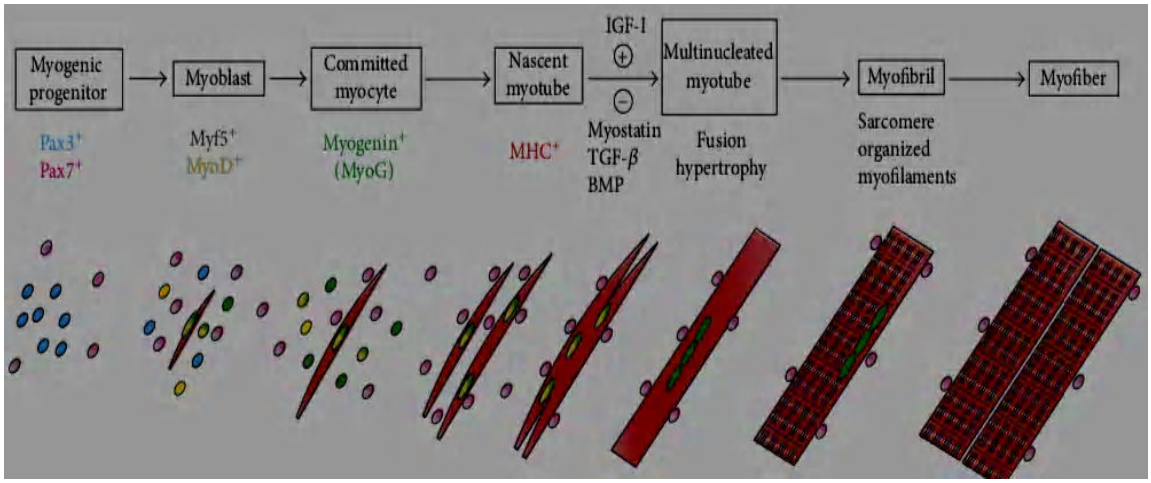
Canlı hayvanın uyarıya cevap verebilmesinin temelinde 4 olay vardır. İrritabilite (reseptör fonksiyonu), conductivite (nöron fonksiyonu), correlation (sinir merkezleri fonksiynu) ve reaction (reaksiyon) yani uyarıya cevap veren effektör organların fonksiyonudur. Bu olayla ilgili yapıların ilk üçü sinir sistemi kısımlarıyken reaksiyon olayı sinir sisteminden ayrı iyice özelleşmiş bir yapıdır. Çok hücreli hayvanlarda effektör organ ya bir kas ya da bir bez hücresidir (Noyan, 1996).

Kas dokusu, embriyodaki somit olarak adlandırılan yapıların miyotomlarından gelişir. (Picard ve ark., 2002). İskelet kasında miyoblastın farklılaşması doğuma yakın zamanda tamamlanır ve bu farklılaşmış lifler doğumdan yetişkinliğe kadar boyut olarak büyümeye devam eder. Ancak doğumdan sonra miyoblastlardan yeni lifler oluşmaz. İskelet kas hücreleri embriyo döneminde postmitotik, çok çekirdekli kas liflerini oluşturan miyoblastların füzyonuyla meydana gelir. Tek bir kasın hücresel ünitesine kas lifi denir (Widmaier ve ark., 2010). Her bir kas lifi kasın bir ucundan diğer ucuna uzanan çok çekirdekli bir kasılma ünitesidir. Kas lifleri, 10-100µm çapında ve 80cm'ye kadar uzayabilen kas hücreleridir (Akpulat, 2015). Kas lifleri miyofibrilden, miyofibrillerde kas kasılmasından sorumlu miyozin ve aktin ipliklerinden oluşur. Kas lifinin etrafı sarkolemma denilen membran ile sarılıdır. Sarkolemma ile bazal membran (endomisyum) arasına yerleşmiş yeni kas hücrelerinin oluşumunundan sorumlu olan satellit (uydu) hücreler yer almaktadır (Korkmaz, 2010). Eğer iskelet kası lifleri bir yaralanma veya zedelenme sonucu hasar görürse, sağlam kalan kas lifleri bölünerek,

hasarlanan liflerin yerini alamaz (Widmaier ve ark., 2010). Miyoblastların embriyodaki haline benzeyen satelit hücreleri bölünerek sınırlı bir seviyede yeni kas hücreleri oluşturabilirler (Noyan, 1996). Bir yeni kas lifi oluşturabilme kapasitesine rağmen, eğer kas, ağır hasar görmüş ise tam gücüne ulaşamaz. Kas dokusunun kaybında gerçekleşen onarıcı mekanizma genel olarak kalan liflerin çaplarının büyümesi (hipertrofi) ile gerçekleşir (Widmaier ve ark., 2010).

Kaslar yapı ve işlevine göre 3 grup da incelenir; kalbin yapısında bulunan kalp kasları (kardiyak kaslar), içi boş organların duvarında bulunan düz kaslar (beyaz kaslar) ve iskelete tendonlar yardımıyla bağlanabilen iskelet (kırmızı veya çizgili) kaslarıdır (Serbest ve ark., 2014). İnsan vücudunda 450 kadar iskelet kası bulunmaktadır ve bu kaslar yetişkin bir insan vücudunun ağırlığının %40-45 kadarını oluşturur. Bundan dolayı kas dokusu insan vücudunun en büyük organıdır. Bu yapların her biri farklı türde yaralanmalara maruz kalabileceğinden, normal kas anatomisinin ve fizyolojisinin anlaşılması uygun tedavi planlarının oluşturulması için çok önemlidir (Karahan ve Erol, 2004). İskelet kasının farklı yetenekleri mevcuttur. Örneğin iskeletle sağladığı bağlantı sayesinde istemli ve koordineli vücut hareketlerinin gerçekleştirilmesi, vücut postürünün korunması, dolaşım ve solunum gibi sistemlerin hayatsal aktivitelerinin gerçekleşmesi gibi olaylarda önemli rolleri vardır (Akpulat, 2014).

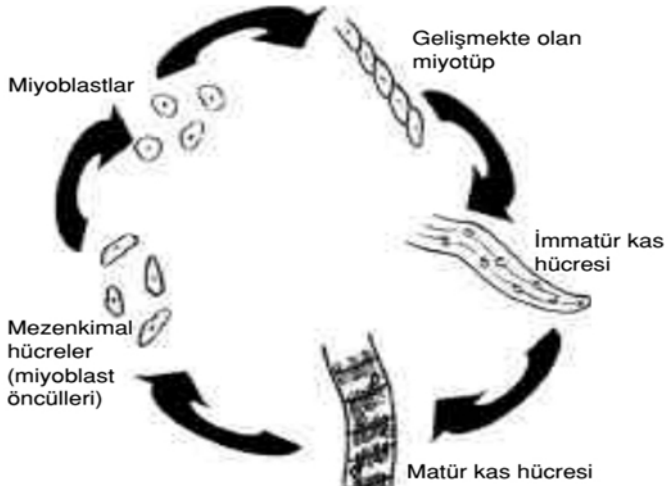
İskelet kası hücrelerinin farklılaşması, iki ana hücre içi sinyal yolu, yani fosfatidilinositol 3-kinaz kaskadı ve hücre dışı sinyal regüle edilmiş kinaz 1/2 kaskadı tarafından düzenlenir (95). *In vitro* iskelet kas farklılaşması sırasında (Şekil 2.3.), terminal farklılaşma, Pax3+ ve/veya Pax7+ progenitörleri Myf5 veya MyoD'yi taahhütlü miyoblastlar olarak ifade etmeye başladığında başlar. Bu miyoblastlar yavaş yavaş miyogenin (MyoG) ifade eder ve miyozin ağır zinciri ile tek çekirdekli oluşmuş miyotüpler oluşturur. İnsülin benzeri büyüme faktörü1 (IGF1), TGF- p1(transforme edici büyüme faktörü) inhibitörü ve miyostatin inhibitörleri çok çekirdekli miyotüpler oluşturmak üzere miyotüp füzyonu uyarmasını sağlarlar (Şekil 2.4.). Aktin, miyosin ve elastik miyofilamentler, miyotüpler içerisinde organize sarkomerler oluşturmak üzere düzenlenir. Organize sarkomer yapılar, miyotüplerde çizgili bir patern ortaya çıkarır ve kasların fonksiyonel büzülme birimini temsil eder (Jiwlawat ve ark., 2018).



Şekil 2.3. *İn vitro* olarak iskelet kası farklılaşması (Jiwlawat ve ark., 2018).

2.2.1.İskelet Kaslarında Bulunan Kök Hücreler

Uydu (satellit) hücreler iskelet kasına özgü kök hücrelerdir. Normal koşullarda iskelet kasının rutin büyümesi ile tamir ve yenilenme işlemleri için gerekli çekirdeği sağlamakla görevli olan bu hücreler, yaralanan kasta gözlenen verimli ve hızlı rejenerasyonun temel sorumlusudur (Akın ve Demirel, 2017). İskelet kasının embriyo dönemindeki gelişimine katılan kök hücrelerle yetişkinlik de önemli bir zarar aldıklarında, kasın rejenere olmasında görevli satellit hücreler benzer şekilde çevreden aldıkları sinyallerle aktifleşirler (Akpulat, 2014) ve uydu hücreler aktif hale geçip çoğalarak kas öncül hücreleri olan miyoblastları oluşturur. Miyoblastlar ise önce çoğalma, sonra farklılaşma ve füzyon yolu ile miyotüpleri oluşturur. Böylece oluşan miyotüpler yeni lif oluşumunu ya da mevcut kas lifleri ile birleşerek lifin büyümesini sağlarlar (Şekil 2.4.) (Akın ve Demirel, 2017). Bu yeni yapılanma ile kaybedilen dokuların yerininin doldurulamadığı takdirde dejenerasyon-rejenerasyon dengesi fonksiyonel kayıp doğrultusunda bozulur. Bozulan doku yapısı içinde adipogenez ve fibrozis doğrultusunda bir artış olurken kasın fonksiyonel bütünlüğünün korunması ise mümkün olmamaktadır (Yüzbaşıoğlu, 2008).



Şekil 2.4. Kas lifinin gelişimi (Yüzbaşıoğlu, 2008).

2.2.2. Kas Dokusu ve Kök hücre

Yağ dokusunun, miyojenik faktör 5 (Myf5+) işaretleyicisinin ortak olarak taşınması dayanak gösterilerek kahverengi yağ dokusu ile kas hücrelerinin benzerlik gösterdiği söylenmiştir (Mermer ve ark., 2017). Yapılan bir çalışmada musküler distrofi sebebiyle meydana gelen kas kaybını telafi etmek amacıyla indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin Fibroblast Büyüme Faktörü 2 (FGF2) ve Neurobasal medyum ile zenginleştirilmiş medyum kullanılarak iskelet kası hücreleri farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Musküler distrofil farelere bu hücreler intramusküler olarak transplante edildikten sonraki 24 hafta süresince miyojenik hücrelerin tahribata uğramış bölgede olduğu görülmüştür (Shelton ve ark., 2014). Başka bir çalışmada ise yine indüklenmiş pluripotent kök hücrelerde FGF2, Insülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) and Hepatosit Büyüme Faktörü kullanılarak miyojenik progenitör hücrelere ve olgun kas hücrelerine farklılaştığı rapor edilmiştir (Chal ve ark., 2014).

2.2.3. Kas Düzenleyici Faktörler

Kök hücrelerin kas dokusuna farklılaşması miyojenik regülatör faktörler (MRF) tarafından düzenlenmektedir. Bu faktörler Myf5, MyoD, miyogenin ve MRF4'ü içermektedir. Bunlardan MyoD gen ailesi miyojenik sürecin belirlenmesinde önemli bir role sahiptir (Bhuiyan ve ark., 2009). MyoD ve Myf5 iskelet kas hatlarının belirlenmesi için gereklidir. Myogenin ve MRF4'ün ise hücre füzyonunu düzenlediği bilinmektedir. Satellit hücreler MRF ailesinin transkripsiyon faktörlerini ifade edemezler ancak aktive

edildiklerinde Myf5, MyoD ve daha az ölçüde miyogenin faktörleri için pil görevine geçerler (Gang ve ark., 2004). Myf5 ve MyoD (myf3) tek hücreli miyoblast aşamsında ifade edilirken, miyotüp oluşumu süresinde giderek düşer ve miyogenin (myf4) ve MRF4 (myf6) düzeyi yükselmeye başlar (Sabourin ve Rudnicki, 2000; Can, 2014).

Doğum sonrası yaşamda kas lifi sarkolemma ve bazal lamina arasına yerleşmiş olan satellit hücreler hareketsiz miyoblastlardır. Ancak bir defa aktive edildiklerinde devamlı farklılaşmayı sağlayabilirler. Bu satellit hücreler iskelet yenilenmesi ve onarımında kaynak olarak görev yapmaktadırlar. Ancak hasarlı kasda az oldukları ve iyileşme sürecinde ise hızlı bir şekilde tükendikleri belirtilmiştir (Gang ve ark., 2004).

MyoD ailesi proteinlerinin tanımlanması iskelet kas farklılaşma mekanizmasının anlaşılmasına önemli bir katkı sağlamıştır. Miyositlerin terminal farklılaşması, miyosinin ifadesi ile doğrulanabilir. MKH'lerin iskelet kas hücresine farklılaşması immünhistokimyasal tetkiklerde iskelet kasına karşı oluşan antikorlarla (MyoD gibi) boyanarak tanımlanabilirler (Mizuni ve ark., 2001).

2.3. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri, sitokin ailesi içinde yer alan, vücut tarafından doğal olarak üretilebilen maddelerdir. Sitokin ailesi, hücrelerin aktivitesinin düzenlenmesinde özellikle hücre bölünmesi, farklılaşmasında ve programlanmış hücre ölümlerinde görevli proteinlerdir. Sitokinler fonksiyonel benzerlik ve etki mekanizmalarına göre 6 gruba ayrılır. Bunlar (Güneş, 1999):

1. Büyüme faktörleri (EGF, IGF, NGF, FGF, HGF v.b.),

2. Transforme edici büyüme faktörleri (TGF-α, TGF-ù),

3. Koloni uyarıcı faktörler (GM-CSF, EPO, LIF),

4. Tümör nekroz faktörleri (TNF- α, TNF- ù),

5. İnterlökinler (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4 v.b.),

6. İnterferonlar (IFN- α, IFN- ù, IFN-Û).

Sitokin ailesine ait olan polipeptit yapıdaki büyüme faktörleri hücrelerin bölünmesini aktif ya da inaktif hale getirebildiği gibi, özelleşmiş hücrelerin farklılaşmasını başlatabilir (Öztopalan ve ark., 2017). Hücrelerin yaşaması, çoğalması, büyümesi, apoptoz ve hücre göçününün başlamasında da görevlidirler (Yarım ve Kazak, 2016).

Yani büyüme faktörleri, çeşitli hücresel işlemlerin düzenlenmesinde görev alır ve tipik olarak hücreler arasında sinyal molekülleri ödevi görür (Tada ve ark., 2012) . Ağırlıkları 4000-60000 dalton arasında farklılık gösteren, az miktarda dahi hücresel mekanizmaları etkileyebilen büyüme faktörünün bir hücreyi etkileyebilmesi için, o hücrenin söz konusu büyüme faktörünün spesifik reseptörüne sahip olması gerekmektedir. Büyüme faktörü etkileyeceği hücredeki özgül reseptöre bağlandığı zaman, hücre içerisinde bir dizi sinyal aktivite meydana gelmektedir (Kaltalıoğlu, 2012).

2.3.1. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Büyüme faktörlerinin geniş bir bölümünü oluşturan Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGF'ler), nematodlardan insanlara kadar birçok farklı organizma grubundaki tek zincirli polipeptitlerdir (Ornitz ve Itoh, 2001). FGF'ler mitojenik faktör ailesi olup biyolojik etkilerini çeşitli mezenkimal, nöroektodermal ve epitelyal hücrelerin üzerinde gösterir (Ural ve ark., 2002). FGF'ler embriyonal ve fetüs gelişiminde, damarlanma, yara iyileşmesi, doku oluşumu, yangı, sinirsel koruma, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, hücre göçü, tümör gelişim, apoptosis (Ülger ve ark., 2011), iskeletsel kaslarının gelişmesinde, hematopoeziste kemik iliği stroması gelişimi ve kan hücrelerinin spesifik akışı gibi birçok önemli biyolojik mekanizmanın düzenlenmesinde görev alır (Gültekin ve ark., 2011). Büyüme faktörlerinden, üzerinde en çok çalışılan FGF ailesinin 2 prototipi ve toplam 22 üyesi bulunur (Powers ve ark., 2000).

2.3.1.1. Fibroblast Büyüme Faktörü1 (FGF1)

Prototiplerden biri olan FGF1, başka bir deyişle asidik FGF (aFGF) olarak nitelendirilir. Geniş görev alanından dolayı FGF ailesinin en önemli üyesidir (Ornitz ve Itoh, 2001). FGF1, preadipositler, endotel hücreleri, fibroblastlar veya nöroepitelyal hücreler gibi birçok hücreyi etkiler. Mitojenik ve anjiyojenik aktiviteleri nedeniyle, FGF'ler farmasötik endüstrisinin büyük ilgisini çekmektedir. Yer aldığı terapotik uygulamalardan bazıları FGF aracılı anjiyogenez, yara ve kemik kırığı iyileşmesi ve nöroproteksiyondur (Walpurgis ve ark., 2011).

2.3.1.2. Fibroblast Büyüme Faktörü2 (FGF2)

Protiplerden diğeri olan FGF2 başka bir deyişle bazik FGF (bFGF), 1974 yılında literatüre kazandırılmış olup (Delrieu, 2000) hücrede etkisini fibroblast büyüme faktörü

reseptörlerine (FGF-RI) bağlanarak gösterir. Büyüme faktörünün reseptöre bağlandıktan sonra reseptörde otofosforilasyon olayı ile aktivasyon gerçekleşerek transkripsiyonu düzenleyici proteinler uyarılır (Berberoğlu, 2007). Scata ve ark. yaptığı çalışmada FGF1'in ifadesi ile fonksiyonel FGF reseptöründe bir azalma olduğu takdirde, miyositlerin çoğalmasını ve farklılaşmasının azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum FGF reseptörü kullanılabilirliğinin iskelet miyojenezinde kritik bir düzenleyici rol oynadığını göstermektedir (Scata ve ark., 1999).

FGF'ler, miyojenik progenitörlerin ve miyojenez sırasında miyoblastların çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol eden kritik faktörlerdir (Jiwlawat ve ark., 2018). Satellit hücrelerinde bulunan FGF2, miyofibriller, uydu hücreleri ve fibroblastlar tarafından üretilir. FGF2, çoğu zaman bir uydu hücresi mitojeni olarak bildirilmesine rağmen, miyogenezi baskılayarak uydu hücresi proliferasyonuna izin verir. Kas rejenerasyonu sırasında FGF2 ifadesi artar (Pawlikowski ve ark., 2017).

MKH kültürü hazırlanırken en yaygın büyüme takviyesi olan bFGF kullanımı proliferasyon oranını büyük ölçüde arttırır. Ayrıca, bFGF'nin eklenmesi, MKH farklılaşma kapasitesini etkilediği, osteojenik farklılaşmayı desteklerken nörojenik potansiyeli sınırlandırdığı bildirilmiştir (Sotiropoulou ve ark., 2009). FGF2'nin, miyojenik progenitörlerin miyotüplere farklılaşmasını engellediği bilinmektedir bu da FGF2'nin progenitörleri olgunlaşmamış bir aşamada tutmak için kullanılabileceğini ima eder. İlginç bir şekilde, murin miyoblast C2C12 hücrelerinde, FGF'nin aşağısındaki mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağının inhibisyonu, MyoD, miyogenin ve MKH'nin ifadesini artırdığı ve daha fazla miyoblast füzyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Jiwlawat ve ark., 2018).

2.3.2.İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)

İnsülin Benzeri Büyüme faktörleri (IGF) genelde lokal olarak etki gösterebilen ve spesifik hücrelerde büyümeyi indükleyen, primer aminoasid dizilimleri birbirlerine ve insan proinsüline benzeyen küçük peptidlerdir. Hem yapısal hemde fonksiyonel olarak büyüme faktör ailesinin bir üyesidir (Çolak, 2017). İnsülinle karşılaştırıldığında, IGF'lerin hepatositler veya adipositler üzerinde ihmal edilebilir metabolik etkileri vardır. Bununla birlikte, kasta IGF1 reseptörünün varlığı, glikoz alımı ve glikojen sentezi üzerindeki fizyolojik etkilerinden sorumlu olduğunu göstermektedir (Binoux, 1995). IGF1 ve IGF2 olmak üzere iki önemli formu vardır. IGF1 daha çok postnatal

büyüme üzerinde etkilidir. Kemik ve kas hücre gelişimi üzerindeki metabolik etkilerini parakrin ve otokrin mekanizmalarla gerçekleştirirler (Harbili, 2008). IGF'ler tarafından kas farklılaşma uyarılmasının incelenmesi çalışmaları sonucunda IGF1 ve IGF2'nin hücresel proliferasyon ve farklılaşmayı uyardığını belirtilmiştir (Tollefsen ve ark., 1987).

IGF1'in %90'ından fazlası karaciğerde üretilerek dolaşıma katılır (Conchillo ve ark., 2007). IGF1 70 aminoasit dizisi IGF2 ise 67 aminoasit dizisi içerir. Bu iki faktör arasında %62 oranında benzerlik bulunur. Molekül ağırlığı 7647 dalton olan küçük bir peptittir (Pavelic ve ark., 2007). IGF1, growth hormonun büyümeyi uyarmada güçlü bir etkisi vardır. İnsan yaşamı boyunca fizyolojik konsantrasyonlarda hayli anlamlı seviyelerde bulunur ve büyüme, gelişmede oldukça etkilidir. İnsülinle aynı dozlarda glukoregülatör ve mitojenik özellik gösterir (Çolak, 2007).

IGF1 kemik, akciğer, böbrek, iskelet kası, kalp, dalak, ovaryum, testis gibi periferal dokularda otokrin/parakrin yollarıyla sentezlenip; büyüme hormonu ve dokuların çevresindeki hücrelerde sentezlenen faktörler tarafından da denetlenirler. İskelet kaslarındaki GH'un etki mekanizması tam olarak ifade edilmemesine rağmen IGF1'in dolaşım sistemindeki seviyesinin artırması önemli bir mekanizma olarak görülmüştür. İskelet kas biçimlenmesi için büyüme faktörlerinin etkili olduğu olduğu kanıtlanmış bir bilgidir. Diğer büyüme faktörleri içinde sadece IGF kas için gerekli olan özel proteinleri vardır. IGF1'in hücresel etkileri IGF1 reseptörü (IGF-IR) tarafından kontrol edilir. IRS-I sinyali IGF'lerin miyojenik aktivasyonu için gereklidir. IRS-1 (insülin reseptör substratı 1) ve IGF1 geninin çıkarılarak fareler üzerinde yapılmış çalışmada normal organ (kalp ve böbrek) gelişimi sürdürüldüğü tespit edilmiştir. IGF-IR kas üzerinde iki farklı etki mekanizması vardır; birincisi mitojen aktiviteli protein kinaz (MAPK) ikincisi ise ise fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K) aktivasyonudur. MAPK aktivasyonu özellikle mitojenez için çok önemlidir. MAPK aktivasyonu bloke edilerek yürütülmüş çalışmalarda IGF1 ve IGF2 cevap olarak miyoblast proliferasyonunun yapmadığı gözlenmiştir. PI3K aktivasyonu IGF1'in iskelet kaslarında miyoblastların miyotübüllere füzyonu, programlanmış hücre ölümüne karşı direnç etkilerine sebep olur (Harbili, 2008).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma sırasında hücreler üzerinde gerçekleştirilen işlemlerin Klinik Araştırmalar Etiğine uygunluğu, Erciyes Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 15.09.2017 tarih ve 418 numaralı kararı ile onaylanarak (Ek 1) Betül- Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde (GENKÖK) gerçekleştirildi.

3.1. İnsan Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyon Yöntemi

Çalışmamız için gerekli olan adipoz doku; Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK), Kök Hücre Araştırma ve Geliştirme Laboratuarında 18 yaş üzeri, kadın, sağlıklı, gönüllü bireylerden temin edilmiştir. Mezenkimal kök hücre izolasyonuda bu laboratuvarın insan yağ dokusu kaynaklı MKH elde etme prosedürü kullanılarak gerçekleştirilmişdir. Prosedür, laminar-air flow içerisinde aşağıda verilen basamaklar halinde gerçekleştirilmiştir.

1. Yağ dokusu kültür tüpüne alındı.
2. 5 ml PBS (%1 Penicillin/Streptomisin içeren) ile iyice yıkandı.
3. Dokuların yıkanmasının ardından başka bir petri kabına alınıp buradada 5 ml PBS (%1 Penisilin/Streptomisin içeren) ile ikinci defa yine yıkandı.
4. Dokuların parçalanması için %0,075'lik kollajenaz tip I 50 ml PBS içerisinde çözülerek 10 dakika süresince 37ºC çalkalamalı su banyosunda tutularak aktivasyon yapıldı.
5. Yağ dokusunun petri kabında makas ve bisturi kullanılarak bağ dokusundan ayrılarılması için küçük parçalar elde edildi.
6. Küçük parçaların üzerine 10 ml kollajenaz tip I eklenerek kıyılma işlemine devam edildi.
7. Daha küçük parçalar haline getirilmiş olan yağ dokusu 50 ml'lik tüp içerisine alınarak üzerine 15 ml daha kollajenaz ilave edildi ve 1 dakika boyunca çalkalandı.

8. Ardından, 37ºC'de çalkalamalı su banyosunda 90-120 dk boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sırasında her 15 dakikada bir örnekler vortekslendi.
9. İnkübasyon süresinin sonunda heterojen bir hücre popülasyonu süspansiyon halinde olan hücreler üzerine 15 ml PBS (%1 Penisillin/Streptomisin içeren) eklenerek 600g'de 10 dk boyunca santrifüjlendi.
10. Santrifüj sonunda tüpün üst kısmında biriken yağ tabakası atıldı ve tekrar üzerine 15 ml PBS (%1 Penisillin/Streptomisin içeren) eklendi ve 600g'de 10 dk tekrar santrifüjlendi.
11. Santrifüj sonunda supernatant çekilerek atıldı ve üzerine tekrar 15 ml PBS (%1 Penisillin/Streptomisin içeren) eklenerek 600g'de 10 dk santrifüjlendi.
12. Supernatant tekrar atıldı ve kök hücrelerin bulunduğu pellet, 15ml %15 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin + 2 mM L-Glutamin içeren DMEM low besiyeri (normal yetişme mediumu) içerisinde çözdürüldü.
13. Süpernatant uzaklaştırılmış, hücreler 5 mL ortam ile dağıtılarak 25 cm^2 'lik flasklara aktarıldı.
14. Kültürasyona 37ºC'de %5 CO_2 etüvde devam edildi.
15. Hücreler çoğalıp yeterli sayıya ulaştığında araştırmacıların kullanması için hücreler -196 ºC'de dondurularak saklandı.

3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Dondurulmuş halde saklanan hücreler; %15 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin + 2 mM L-Glutamin içeren DMEM kompleks medium içerisinde süspanse hale getirilerek tekrar kültüre alındı ve yeterli sayıya gelinceye kadar 3 güne bir medyum değiştirildi. Tüm bu işlemler laminar air flowda yapıldı.

8. günün sonunda incelenen flasklarda hücrelerin yoğunluğunun %80-90 oranında olduğu tespit edildi. Hücreler tripsin ile kaldırıldı, sonra bu hücreler toplanarak akım sitometride ölçüm için hazır hale getirildi.

3.2.1. Tripsinizasyon İşlemi Basamakları

1. Pasajlama için önce flasklardaki medyum çekildi ve atıldı. DPBS ile yıkandı.
2. Flasklara 3 ml Tripsin EDTA konuldu 37°C %5 CO_2'lik inkübatörde 5-7 dk bekletildi.
3. Hafifçe yanlarına elle vurularak hücrelerin hareketlenmesi sağlandı.

4. İnverted mikroskopta bakıldı ve hücrelerin tabandan ayrılarak kalkmış olduğu gözlendi.
5. Tripsini inaktive etmek için her flaska tripsin miktarının iki katı kadar DPBS ilave edildi.
6. Hücre süspansiyonu 50 ml'lik falkon tüpe alındı ve 1000 rpm de 5 dk santrifüj edildi.
7. Süpernatant atıldı ve hücre pelletinin bir kısmı farklılaşma (diferasiasyon) işleminin yapılması için %15 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin + 2 mM L-Glutamin içeren DMEM kompleks medyum içerisinde süspanse hale getirip, tekrar kültüre alınarak 37°C %5 CO_2'lik inkübatöre kaldırıldı. Diğer kısmı ise morfolojik karakterizasyon için ayrıldı.

3.2.2. Karakterizasyon İşlemi Basamakları

1. Morfolojik karakterizasyon için ayrılan hücreler 5ml stain buffer (%10 FBS içeren yıkama solüsyonu) içerisinde 1200 RPM'de 5 dk.santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Bu işlem iki defa olarak yapıldı.
2. Üzerine 450 µl stain buffer ilave edildi.
3. 4 tüp hazırlandı. Tüp isimleri yazıldı.
4. I.tüpe 20 µl izotip kontrol pozitif, 20 µl izotip kontrol negatif, 5 µl mouse Ig G2b ve 100 µl hücre süspansiyonundan kondu.
5. II.tüpe CD90/CD44/CD105/CD73 markerlarının her birinden 5µl ve 100 µl hücre süspansiyonundan kondu.
6. III. Tüpe 20 µl negatif kokteyl ve 100 µl hücre süspansiyonundan kondu.
7. IV.tüpe 20 µl pozitif kokteyl ve 100 µl hücre süspansiyonundan kondu.
8. 30 dk inkübasyona kaldırıldı.
9. İnkübasyon sonrası 500 µl stain buffer ilave edildi.
10. 1200 RPM'de 5 dk.santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
11. Üzerine 500 µl stain buffer ilave edildi.
12. 1200 RPM'de 5 dk.santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
13. Üzerine 400 µl stain buffer ilave edildi.
14. Hazır olan hücrlerin hemen akım sitometrede okuması gerçekleştirildi.

3.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin İskelet Kas Hücrelerine Diferansiyasyonu

Optimal miyojenik diferansiyasyonu için üretilen mezenkimal kök hücreler 35 mm plate içerisinde 3 ml yetişme mediumu içerisinde $1x10^4$ hücre olacak şekilde 4 gruba ayrılarak ekimi yapıldı. Hücreler plate tabanını kaplayıncaya kadar normal yetişme mediumu içerisinde inkübe edildi. Yeterli kaplama sağlandıktan sonra miyojenik medium ile 4 hafta boyunca 3 güne bir medium değişimi yapıldı.

3.3.1. Grupların Özellikleri

Grup 1: Kontrol grubu olup, hücreler miyojenik medium içinde inkübe edildi.

Grup 2: FGF2 grubu olup miyojenik medium içinde 100 ng/ml FGF2 ilave edilerek inkübe edildi.

Grup 3: IGF1 grubu olup miyojenik medium içinde 20 ng/ml IGF1 ilave edilerek inkübe edildi.

Grup 4: FGF2 +IGF1 grubu olup miyojenik medium içinde 100 ng/ml FGF2 ve 20 ng/ml IGF1 ilave edilerek inkübe edildi.

3.3.2. Miyojenik Mediumunun Hazırlanması

Miyojenik medium, tamamlayıcı olarak DMEM low kullanılarak, totalde 20 ml olacak şekilde 50 µM hidrokortizon, 0.1 µM deksametazon, %5 fetal bovine serum ile hazırlandı. Tüm bu işlemler steril şartlarda laminar-air flowda yapıdı.

Hidrokortizon: 20 ml miyojenik medium içerisinde 50 µM hidrokortizon için; 0,001 mg tartıldı. 1 ml steril EtOH içerisinde çözüldü. 1:20 oranında seyreltilerek miyojenik medium içerisine 1µl eklendi.

Fetal Bovine Serum (FBS): 20 ml miyojenik medium içerisinde %5 fetal bovine serum için; 1 ml FBS miyojenik medium içerisine eklendi.

Deksametazon: 20 ml miyojenik medium içerisinde 0.1 µM deksametazon için; stok konsantrasyondan direk 2 µl alınarak miyojenik medium içerisine eklendi.

IGF1: 50 µg toz formunda olan maddemiz olan stok maddemizi, çözülmesi için asetik asit kullanıldı. 50 µg stok maddemiz 1 ml steril asetik asit içerisinde çözüldü. Bu stok konsantrasyondan 1,2 µl alınarak miyojenik medium içerisine eklendi.

FGF2: 25 µg toz formunda olan maddemiz olan stok maddemizi, çözülmesi için %0,01 BSA içeren 1 ml PBS tamponu içerisinde çözüldü. Bu stok konsantrasyondan 12 µl alınarak miyojenik medium içerisine eklendi.

3.4. İskelet Kas Diferansiyasyonunun Akım Sitometri ile Okunması

Miyojenik diferansiyasyon akım sitometrisi analizi ile belirlenmeye çalışıldı.

3.4.1. Intraselüler Boyama (ICC) ve Flow Sitometri Analizi İşlemi Basamakları

1. Plate içerisinde kültüre edilen her gruba ait olan hücrelerimiz, tripsine kaldırıldı.
2. Tripsinizasyon sonrası hücreler 96 well platelere alındı.
3. Sonra, hücreler 100 µl içerisinde %2'lik formaldehit ile 10 dakika fikse edildi.
4. Fikse edilen hücreler, birincil antikor olan anti MyoD1 antikor ve ardından goat poliklonal sekonder antikor ile 45 dakika boyunca boyandı.
5. MyoD1 kullanılmadan önce 1:500 oranında %3 BSA (bovine serum albumin) içeren PBS ile seyreltilerek kullanıldı.
6. Bu boyama sonrası hücreler 30 dk boyunca karanlık ortamda bekletildi.
7. Karanlık ortam inkübasyonundan sonra, 400 g'de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
8. Üzerine bu boyama metodu için hazır olarak üretilmiş fiksatif solüsyonundan 100 µl eklendi 15 dk buz üzerinde karanlıkta bekletildi.
9. Karanlıkta bekleyen hücreler 400 g'de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
10. Supernatant atıldıktan sonra hücrelere 200 µl 10 X Perm solüsyonu ve 1800 µl distile su karıştırılarak 25 µl her kuyucuğa eklendi ve 20 dk +4 ° C'de karanlıkta bekletildi.
11. Karanlıkta bekleyen hücreler daha sonra, 400 g'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Bu işlem 2 defa tekrar edildi.
12. Her kuyucuğa 200 µl PBS tamponu eklendi, çalkalama işlemi yapılarak Flow sitometri cihazında okuma yapıldı.

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

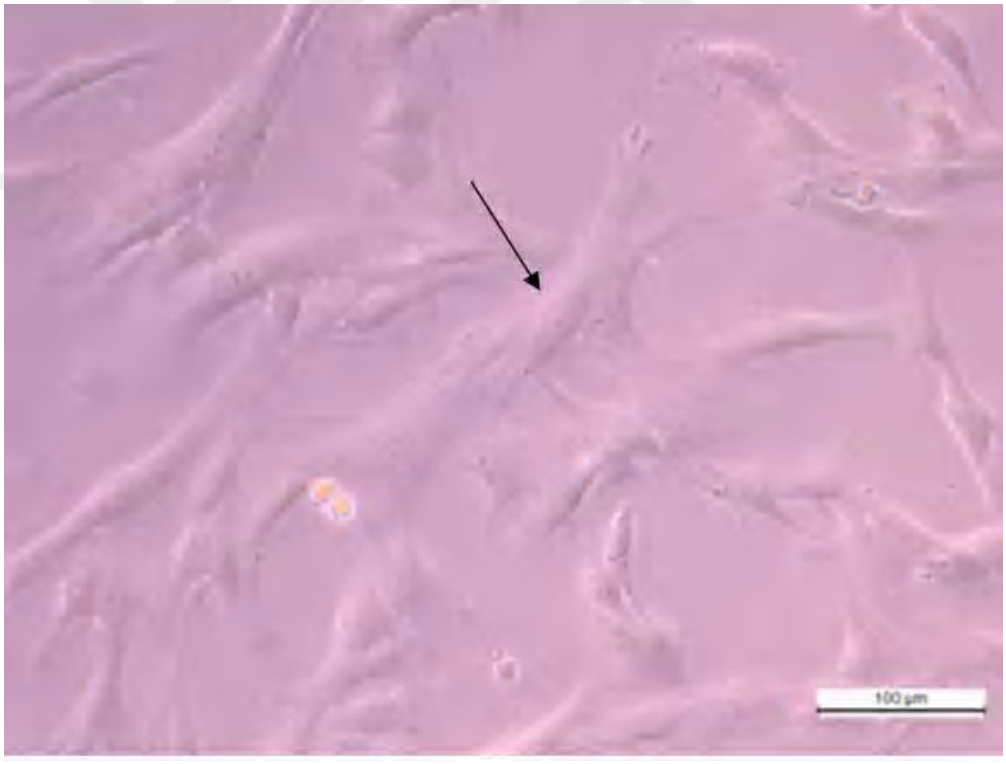
Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile varyans homojenliği Levene testi ile değerlendirilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis H testleri ile değerlendirilmiştir.

4.BULGULAR

4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

4.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Karakterizasyonu

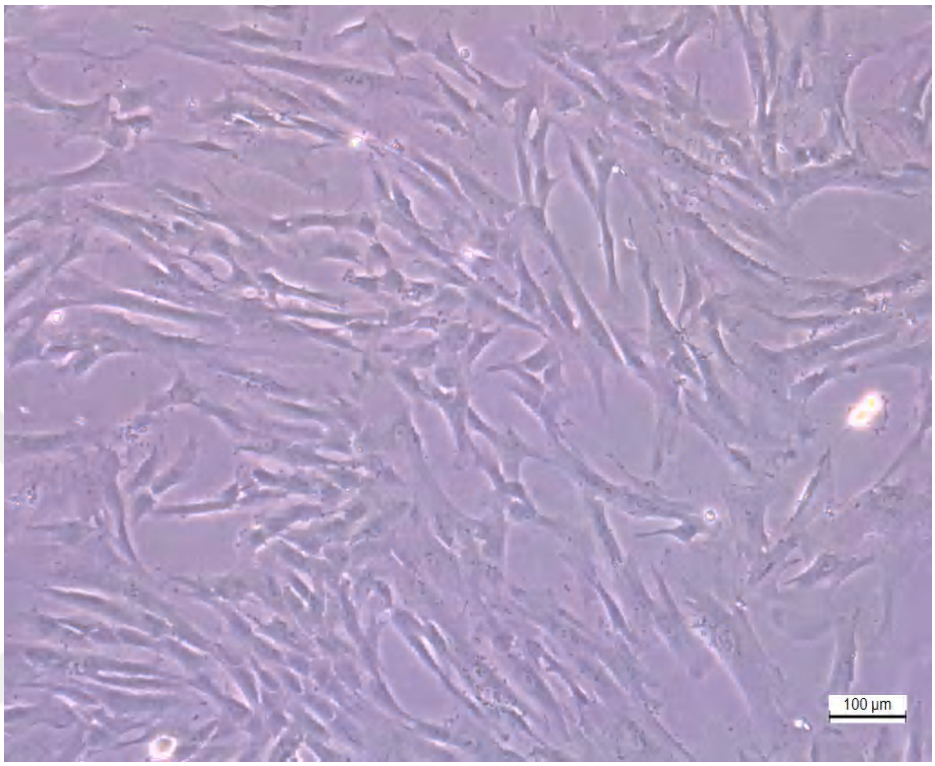
Hücrelerin bulunduğu flasklar, 4. günün sonunda kontrol edilerek hücrelerin çoğalıp çoğalmayacağı tespit edildi (Şekil 4.1.). Tabana yapışma gösteren hücreler için medyum yenilenip inkübasyona devam edildi.



Şekil 4.1. Hücre kültürünün 4. günü, fibroblast benzeri morfoloji gösteren kültür kabının (flask) tabanına tutunmuş hücreler.

8. günün sonunda yeniden incelenen flasklarda plate-taban hücre yoğunluğunun %80-90 oranında olduğu görüldü (Şekil 4.2.). Mikroskopla yapılan inceleme sonucu hücrelerin morfolojik olarak fusiform şekilli, iğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücre toplulukları

olarak görüldüğünden, kültürde çoğalan hücrelerimizin morfolojik olarak mezenkimal kök hücre karakterizasyonu taşıdığı görüldü.



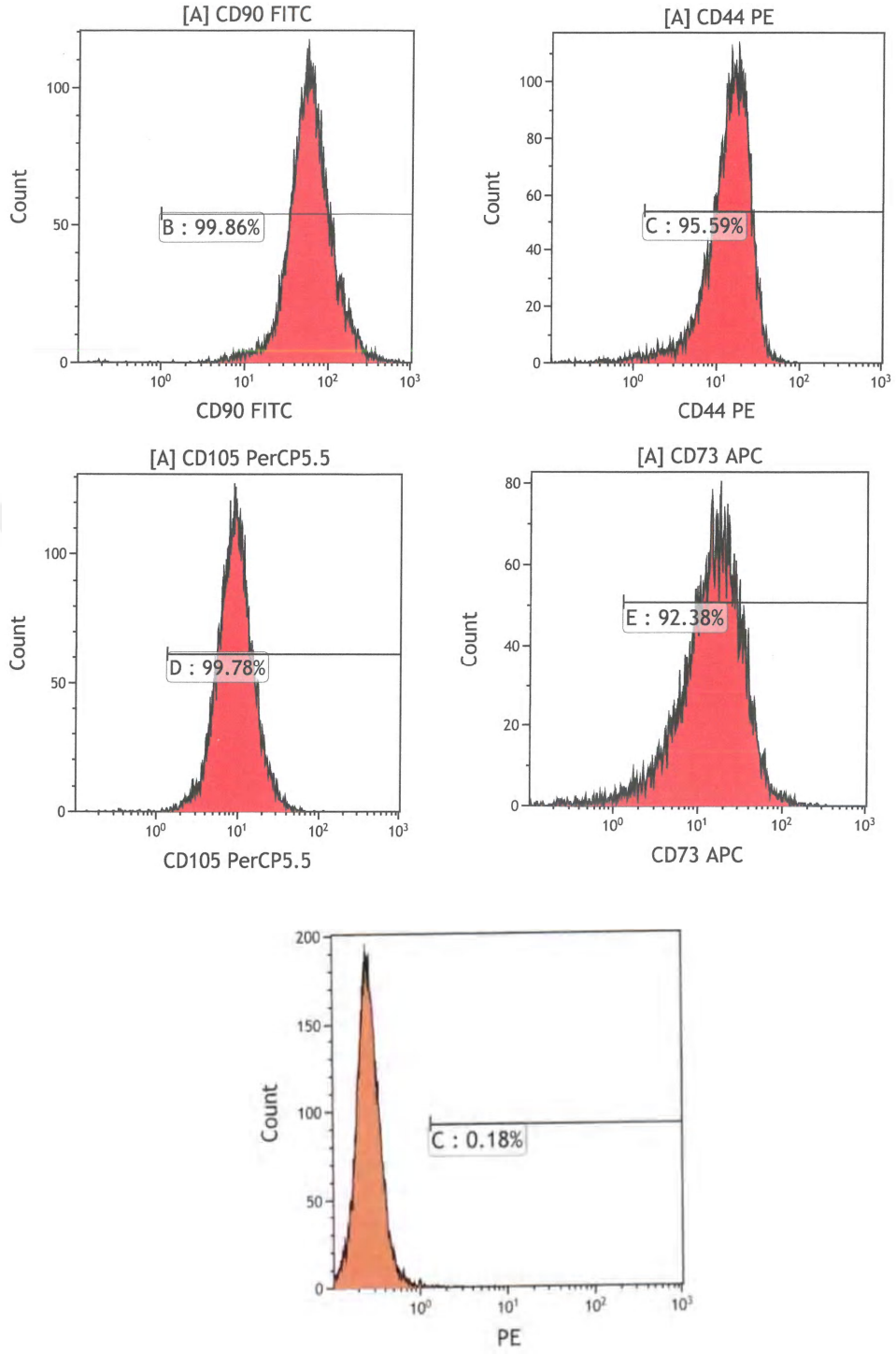
Şekil 4.2. İnsan adipoz kaynaklı MKH'lerin ekim işleminin 8. gününe ait mikroskobik görüntüsü.

4.1.2. Akım Sitometresi

Kültürde çoğaltığımız hücrelerin morfolojik kök hücre karakterizasyonuna sahip olduğu mikroskobik olarak gözlendikten sonra, bu hücrelerimizin mezenkimal kök hücre olup olmadığından emin olmak için akım sitometri analizi yapıldı.

Mezenkimal kök hücrelerin yüzey markerı ekspresyonları akım sitometri ile değerlendirildiğinde %95.59 CD44, %92.38 CD73, %99.86 CD90, %99.78 CD105 markerlerını pozitif bir şekilde eksprese ettiği (Şekil 4.3.), CD45, CD34, CD11b, CD19 ve HLA-DR negatif kokteyl markerlarını ise bulundurmadığı (Tablo 4.1.) tespit edildi.

Akım sitometri analizi sonucunda kültürde çoğalan hücrelerin MKH'ler olduğu tespit edildi.



Negatif Kokteyl CD45/ CD34/CD11/CD19 /HLA-DR

Şekil 4.3. İnsan adipoz kaynaklı kök hücrelerin akım sitometri ile immünfenotiplendirilmesi.

Tablo 4.1. Akış sitometrisi sonucu mezenkimal kök hücrelerin ekpresyonları

	Marker	**Ekspresyon %**	**Literatür**
Pozitif Marker	CD44	%95.59	>90
	CD73	%92.38	
	CD90	%99.78	>90
	CD105	%99.78	
Negatif Marker (Negatif kokteyl)	CD45	%0.18	<2
	CD34	%0.18	<2
	CD11	%0.18	<2
	CD19	%0.18	<2
	HLA-DR	%0.18	<2

4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin İskelet Kas Hücrelerine Diferansiyasyonu

Miyojenik medyum içerisinde çoğaltılan hücrelerde, sadece miyojenik medyum içeren kontrol grubu hücrelerinde, kültürün 5-6. günlerinde yapılan mikroskobik incelemede fibroblast benzeri MKH'lerin şekil değişimine uğrayarak iğ şekilli veya poligonal morfoloji sergilediği gözlendi. 1. hafta sonunda miyojenik medyum inkübe edilen kontrol grubu hücrelerinde değişimin başladığı görüldü. Mezenkimal kök hücrelerin iğsi yapılarının daha uzun ve daha belirgin hale geldiği görüldü. Ayrıca 1 hafta sonra plate-taban hücre yoğunluğunun azaldığı gözlenirken bu azalmanın miyojenik medium içerisinde bulunan hidrokortizon ve dexametazondan kaynaklandığı düşünüldü (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin koşullu (miyojenik) medium ile inkübe sonrası kontrol grubunun 1. hafta sonu mikroskop görüntüleri. İnce ok: iğsi şekle dönüşmüş form, kalın ok: apoptoza uğramış MKH'ler.

1. hafta sonunda IGF1 grubuna miyojenik medyum ve IGF1'in eklenmesiyle birlikte değişimin başladığı görüldü. Mezenkimal kök hücrelerin bir kısmının apoptoza uğradığı gözlemlendi. Birbirine yapışık olan hücrelerin şekilleri daha belirgin iğsi şekle döndü. Yine kontrol grubunda olduğu gibi IGF1 grubunun miyojenik medium ve IGF1 ile indüklenmesinin 1 hafta sonunda plate-hücre taban yoğunluğunun azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. IGF1 grubunun 1. hafta sonu mikroskop görüntüleri. İnce ok: iğsi şekle dönüşmüş formu, kalın ok: apoptaza uğramış MKH'ler.

1. hafta sonunda FGF2 grubunda miyojenik medyum ve FGF2'nin eklenmesiyle birlikte değişimin başladığı görüldü. Bu grupta IGF1 ve kontrol gruplarına göre plate-taban hücre yoğunluğunun daha az olduğu mikroskobik olarak gözlendi. Mezenkimal kök hücrelerin apoptaza uğraması bu grupta daha az gözlemlendi. Birbirine yapışık olan hücrelerin şekilleri daha belirgin iğsi şekle döndü (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. FGF2 grubunun 1. hafta sonu mikroskop görüntüleri. İnce ok: iğsi şekle dönüşmüş formu, kalın ok: apoptaza uğramış MKH'ler.

1. hafta sonunda FGF2+IGF1 grubunda miyojenik medyum ve FGF2+IGF1'in eklenmesiyle birlikte mezenkimal kök hücreler birbirinden ayrılarak tekli hale geldi. Diğer gruplarda gözlemlenen hücrelerin apoptoza uğraması bu grupta gözlemlenmedi. Hücrelerin, tekli halde, çekirdekleri belirgin şekilde birbirinden ayrıldıkları görüldü. Yine bu grupta da plate-taban hücre yoğunluğunun azaldığı mikroskobik olarak görüldü (Şekil 4.7.).

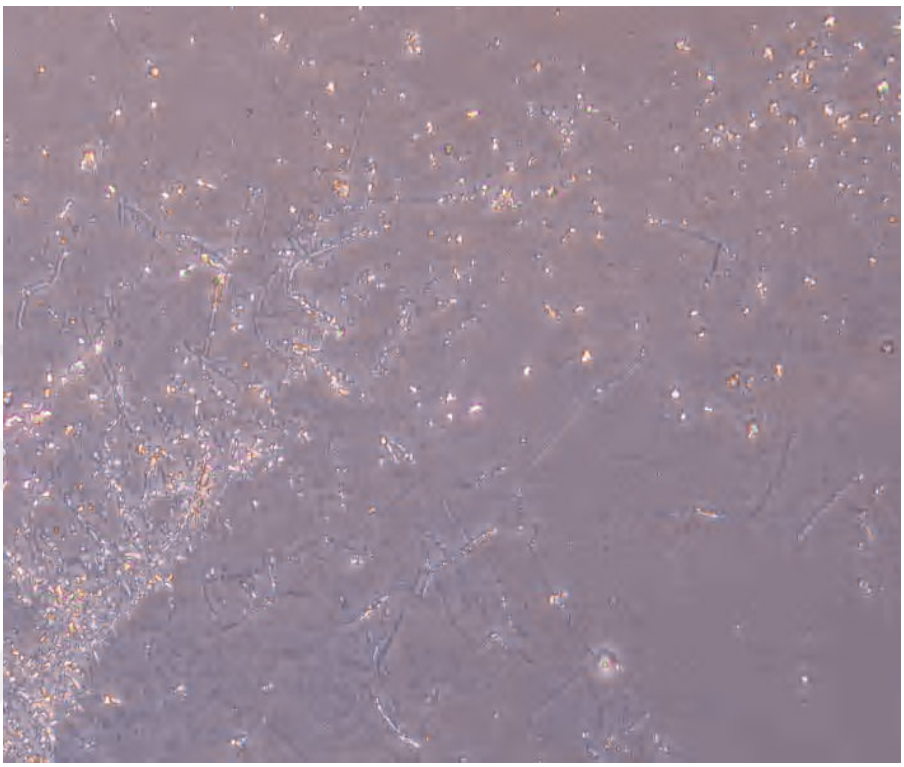


Şekil 4.7. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin koşullu (miyojenik) medium ile inkübe edilmiş IGF1+FGF2 grubunun 1. hafta sonu mikroskop görüntüleri. İnce ok iğsi şekle dönüşmüş formu, kalın ok: apoptoza uğramış MKH'ler

Hücre ekiminin 2. haftasında yapılan mikroskobik incelemede; ilk haftaya göre plate-taban hücre yoğunluğundaki azalma IGF1 ve FGF2 gruplarında daha belirgin oranda gözlendi. 1. hafta sonunda birbirinden ayrılmış ve apoptoza uğramış hücre topluluklarının çok daha az olduğu gözlemlendi. Bu gruplarda bulunan hücrelere mikroskobik olarak bakıldığında temel mezenkimal hücrelerin morfolojik şekillerinin hiçbirinin artık bulunmadığı ayrıca hücre çekirdeklerininde mikroskobik olarak görülmediği gözlendi. Belirli bir şekilde olmayan ancak doğrusal bir hizada, yapısal bir hat ortaya çıktığı gözlemlendi. Bu zaman diliminde bulunan IGF1 ve FGF2 grupları ayrı ayrı değerlendirildiğinde hepsinde hücrelerin doğrusal bir düzlem üzerinde uzamaya devam ettiği gözlemlendi.

2. hafta sonunda FGF2+IGF1 grubunda değişimin ilerlediği görüldü. 1. hafta sonunda azalan hücre sayısının 2. hafta sonunda arttığı gözlemlendi. Bu grupta hücrelerin FGF2 ve IGF1 grubuna göre ise plate-taban hücre yoğunluğu karşılaştırıldığında mikroskobik olarak hücre yoğunluğunun arttığı gözlemlendi (Şekil 4.8.). Büyüme faktörlerinin hücrelerdeki ifadesinin aynı hızda sergilenmemesinden kaynaklı olarak, farklılaşma

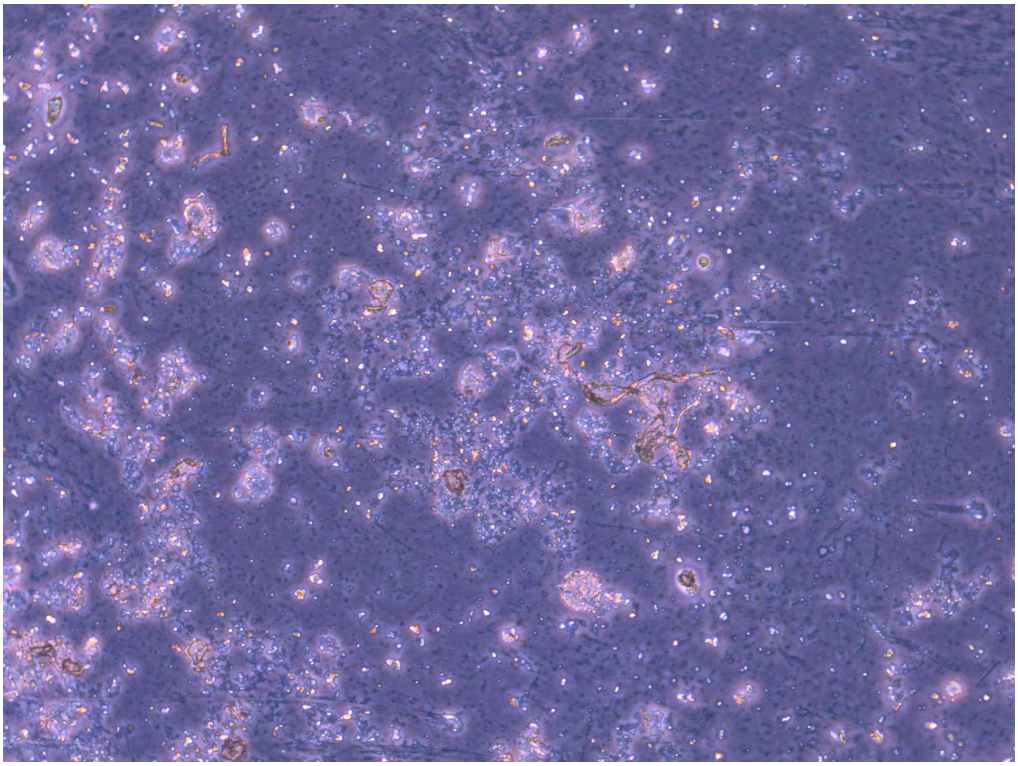
durumlarına göre birden fazla hattın ortaya çıktığı düşünülmektedir. Ancak hücrelerin yalnızca morfolojisine bakarak bu durumu tespit etmek mümkün değildir.



Şekil 4.8. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin koşullu (miyojenik) medium ile inkübe edilmiş FGF2+IGF1 grubunun 2. hafta sonu mikroskop görüntüleri (X20).

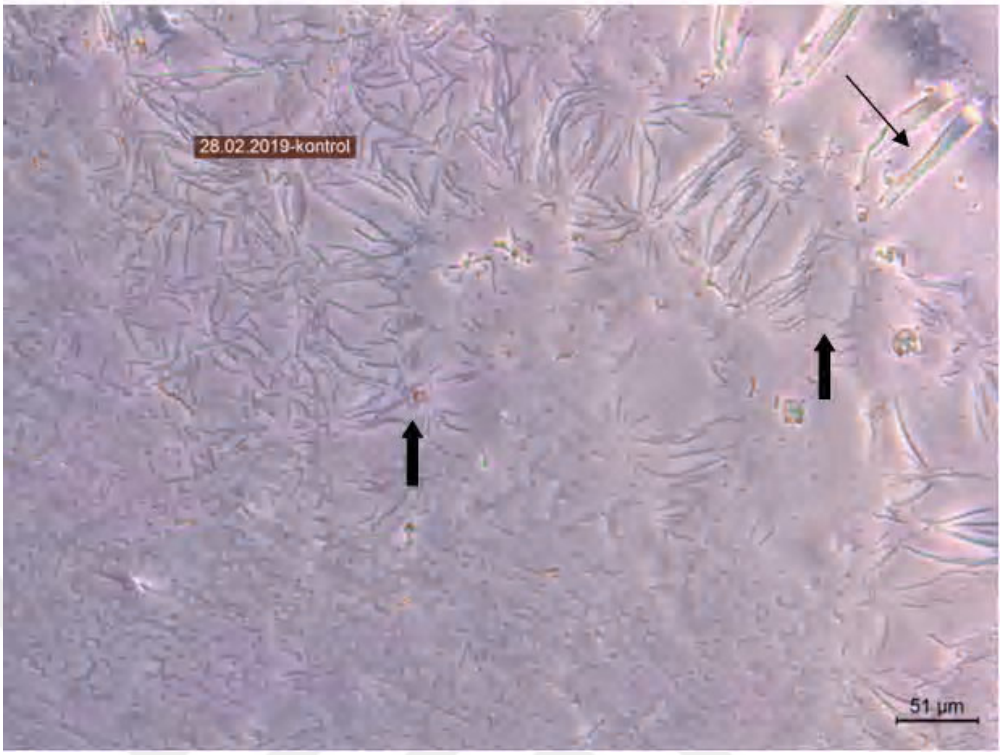
Ekimin 3. Haftasında IGF1 grubunda yapılan mikroskobik incelemede hücre kültüründe düzenli, özgün ve birbirleriyle tutarlı çizgilerin artışı gözlendi. İkinci haftaya göre plate-taban hücre yoğunluğuna bakıldığında hücrelerin füzyon yaptığı ve hücre yoğunluğunun artışı gözlendi. Doğrusal bir hizada bulunan yapısal hatların da hücre yoğunluğuna paralel olarak ciddi miktarda artttığı gözlemlendi. IGF1 grubunda hücrelerin doğrusal bir düzlem üzerinde uzamaya devam ettiği gibi yeni doğrusal yapıların oluştuğu da gözlemlendi. 3. hafta sonunda FGF2 grubunda da değişimin ilerlediği görüldü. 2. hafta sonunda gözlemlenen karmaşık yapıda çoğalmaların devam etttiği görüldü. Bu grupta plate-taban hücre yoğunluğuna bakıldığında hücre yoğunluğunun arttığı gözlemlendi. İç içe geçmiş olan miyoblastlara benzer hücre

grupların artışı gözlemlendi. 3. hafta sonunda IGF1+FGF2 grubunda değişimin ilerlediği görüldü. Hücreler plate tabanını daha da kaplamaya başladı ve mikroskobik olarak hücrelerin sitoplazma miktarını artırarak daha da belirginleştiği gözlendi (Şekil 4.9.).



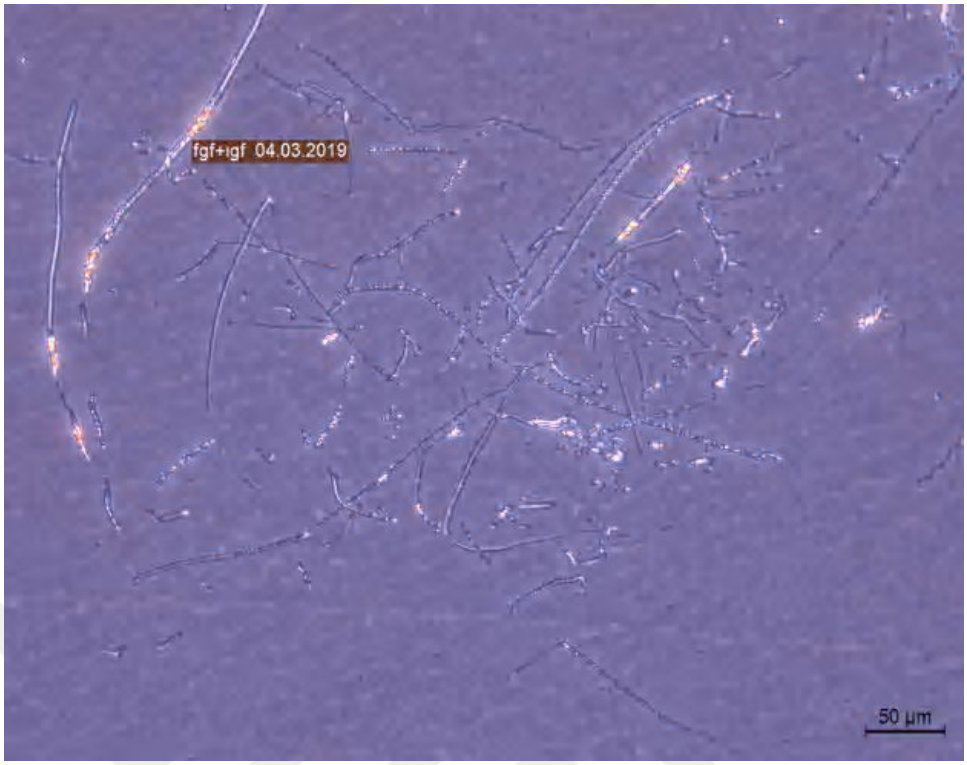
Şekil 4.9. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin koşullu (miyojenik) medium ile inkübe edilmiş FGF2+IGF1 grubunun 3.hafta sonu mikroskop görüntüleri (X20).

Üzerinde çalıştığımız 4 gruptada, miyojenik medyum eklenmesinin 4. haftasında yapılan mikroskobik incelemede; hücre kültüründe başlangıçta iğsi yapıda olan hücrelerin füzyon yaptığı ve tamamen miyoblast şekline doğru dönüşmeye başladığı görüldü. Hatta bir aşama ilerisi olan miyotüp oluşumununda başladığı azda olsa görülmektedir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin koşullu (miyojenik) medium ile inkübe edilmiş kontrol grubunun 4. hafta sonu mikroskop görüntüleri. Kalın ok: miyoblast oluşumunu, ince ok: miyotüp oluşumu.

4. hafta sonunda IGF1 gurubunda değişimin mikroskobik olarak daha yoğun olduğu ve bütün plate tabanını kapladığı görüldü. Hat oluşturmuş hücrelerin yapısal olarak daha ince olduğu gözlenmiştir. FGF2 grubunda da değişimin 3. haftadaki kontrol ve IGF1 grubu ile benzerlik gösterdiği görüldü ancak plate-taban hücre yoğunluğuna bakıldığında hücre yoğunluğunun IGF1 grubuna göre daha fazla olduğu gözlemlendi. Farklılaşmanın FGF2 grubunda daha hızlı gerçekleştiği düşünüldü. FGF2+IGF1 grubunda plate tabanındaki hücrelerin diğer gruplara göre artışı gözlendi (Şekil 4.11.).



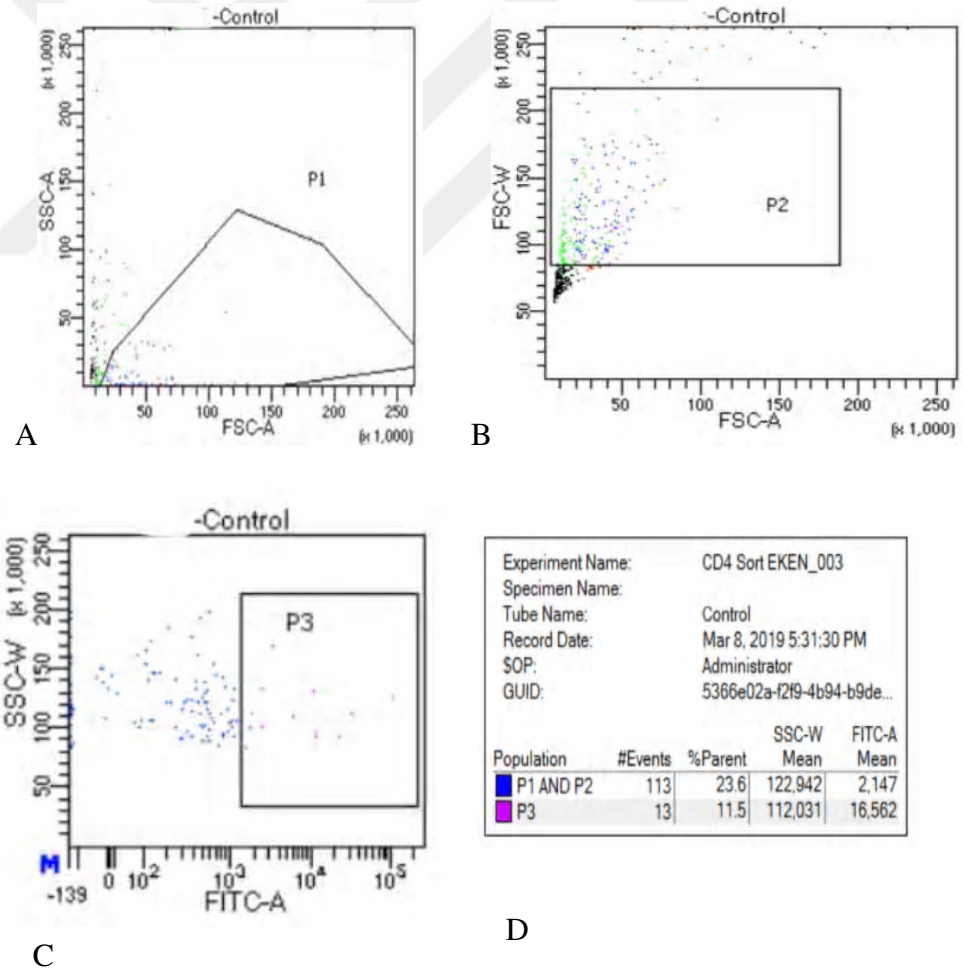
Şekil 4.11. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin koşullu (miyojenik) medium ile inkübe edilmiş FGF2+IGF1 grubunun 4. hafta sonu mikroskop görüntüleri.

Miyojenik yönlendirme yapılan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin invert mikroskopta gözlemlendiğinde, hücrelerin 2. haftadan itibaren artan düzeyde morfolojilerinin değiştiği ve hücre gruplarının başka bir forma dönüştüğü gözlendi. Gruplar arasında kıyaslama yapıldığında, FGF2+IGF1'nin kullanıldığı gruplarda ilk hafta ve son hafta zaman diliminde hücrelerin daha başarılı oranda farklılaştığı gözlemlendi. Hücre kültürü ortamında gözlemlenen morfolojik bulgular hücrelerin miyojenik besiyerine koyulmalarından dolayı iskelet kas hücresine farklılaşmasının başladığı düşüncesini oluşturdu. Bu durum literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında literatürde rapor edilen bilgilerde belirtilen benzer dönüşümün sağlandığı düşünülerek çalışmanın bir sonraki aşamasında; MyoD sentezlemeleri analiz edildi.

4.2.1. Flow Sitometri Analiz Veri Sonuçlarının Yorumlanması

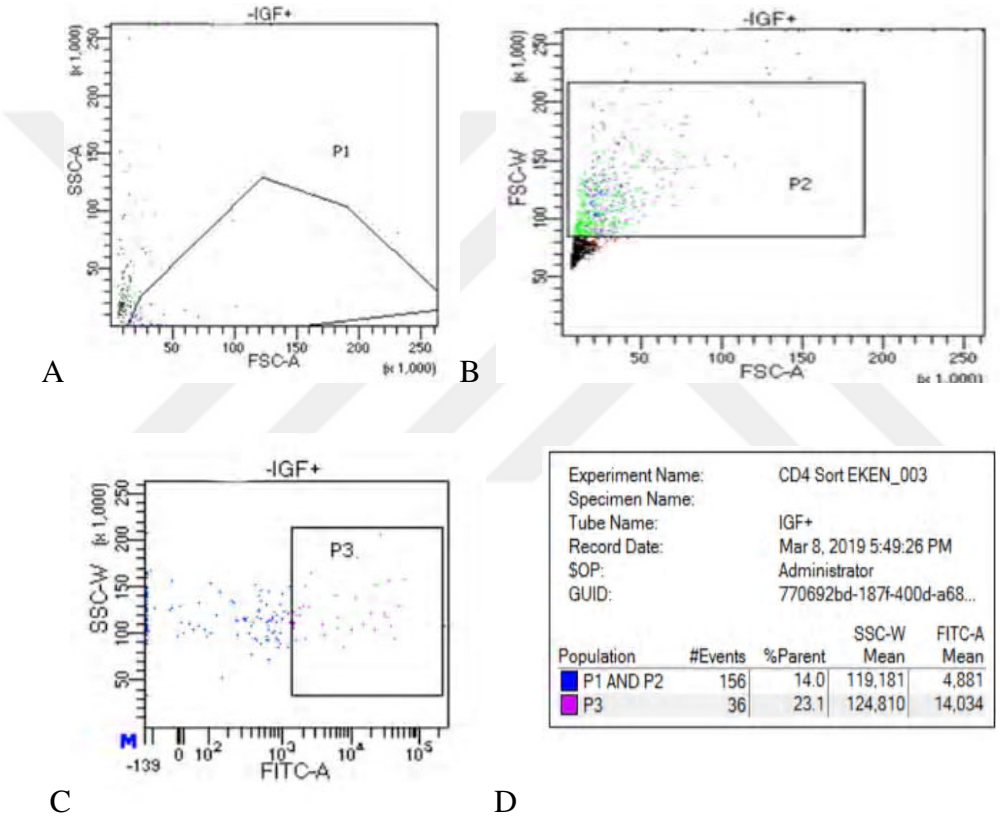
MKH'lerin indüklenerek iskelet kas hücresine farklılaşmasının tespiti miyojenik medyum ile inkübe edilmesinin 4. haftasında, MyoD1 ile intraselüler hücresel boyama yöntemi kullanılarak akım sitometri ile tespit edildi.

Kontrol grubunun flow sitometri değerlendirilme sonuçlarına göre; P1 kapısı içerisinde intraselüler olarak boyaması yapılmış olan canlı hücre popülasyonu (Şekil 4.12-A) gösterildi. P2 kapısında ise birbirine değmeyen, yapışık olmayan boyanmış ve boyanmamış tek düşen hücreler (Şekil 4.12-B) populasyonu gösterildi. P3 kapısında ise miyojenik farklılaşma gösteren canlı hücre (Şekil 4.12-C) popülasyonunu gösterildi. Toplam canlı hücre popülasyonunun %11,5 kadarının miyojenik farklılaşma gösterdiği (Şekil 4.12-D) görüldü.



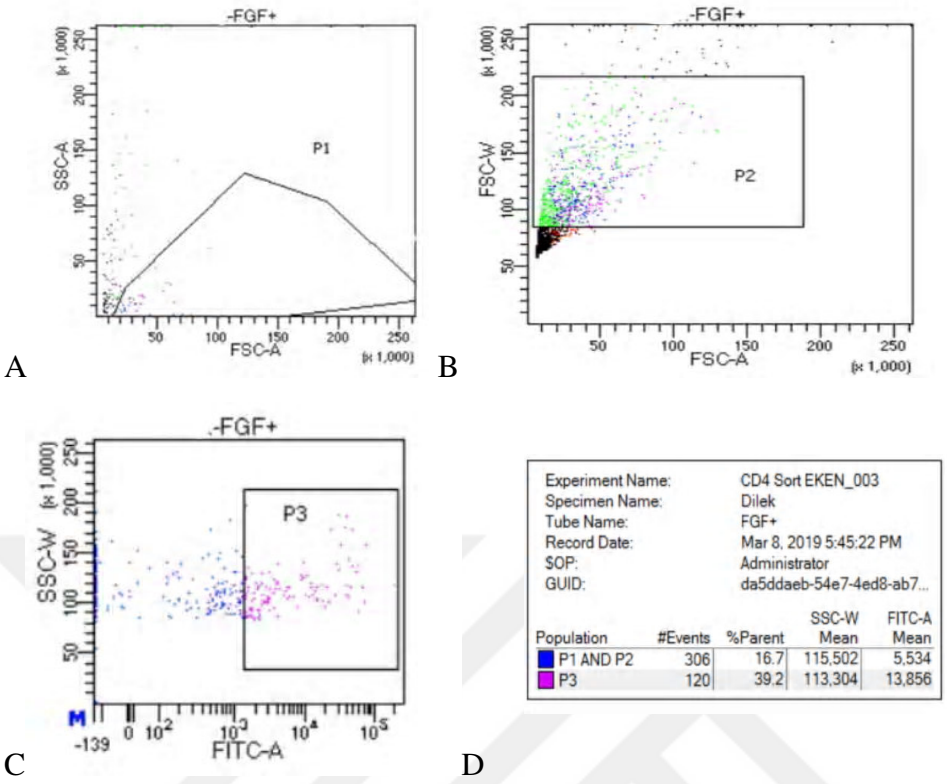
Şekil 4.12. Akım sitometri cihazı kullanılarak kontrol grubunun değerlendirilmesi. P1 kapısı canlı hücreler topluluğu (A); P2 kapısı, tek düşen hücreler (B); P3 kapısı, miyojenik farklılaşma gösteren hücreler (C); kontrol grubundaki değerlerin ifadesi (D).

IGF1 grubunun flow sitometri değerlendirilme sonuçlarına göre; P1 kapısı içerisinde intraselüler olarak boyaması yapılmış olan canlı hücre popülasyonu (Şekil 4.13-A), P2 kapısında ise birbirine değmeyen, yapışık olmayan boyanmış ve boyanmamış tek düşen hücrelerin populasyonu (Şekil 4.13-B) ve P3 kapısında ise miyojenik farklılaşma gösteren canlı hücre popülasyonunu (Şekil 4.13-C) gösterildi. Toplam canlı hücre popülasyonunun %23,1'inin miyojenik farklılaşma gösterdiği (Şekil 4.13-D) görüldü.



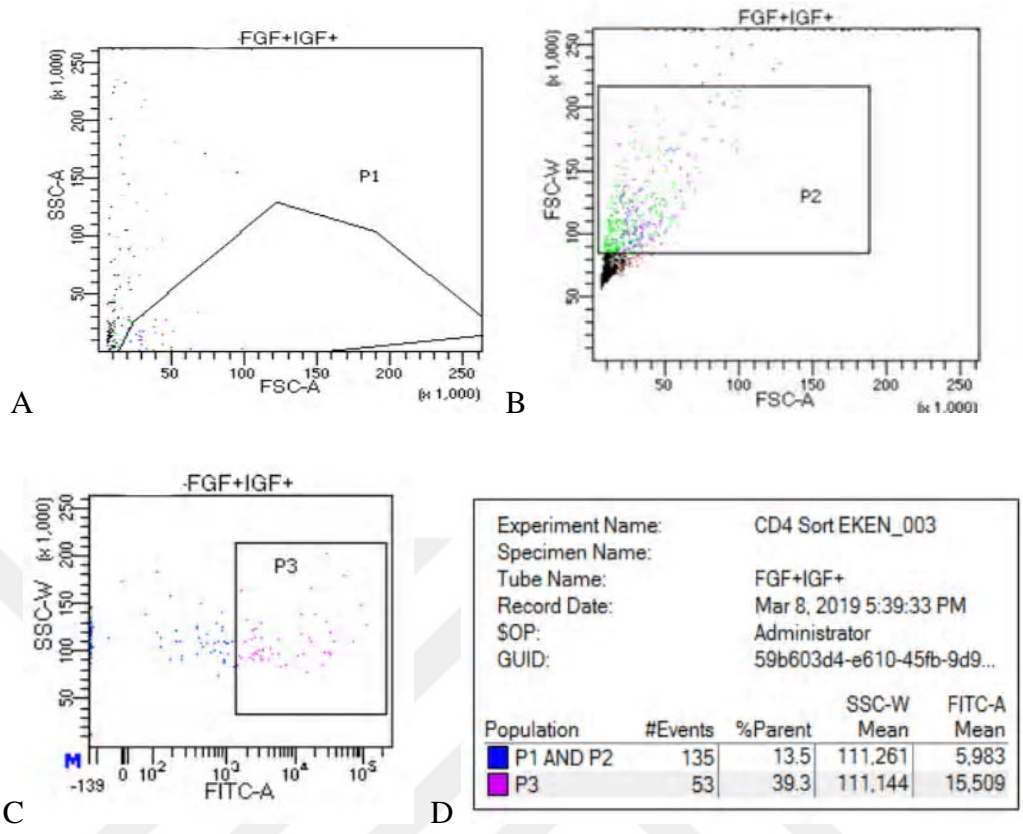
Şekil 4.13. Akım sitometri cihazı kullanılarak IGF1 grubunun değerlendirilmesi. P1 kapısı canlı hücreler topluluğu (A); P2 kapısı, tek düşen hücreler (B); P3 kapısı, miyojenik farklılaşma gösteren hücreler (C); IGF1 grubundaki değerlerin ifadesi (D).

FGF2 grubunun flow sitometri değerlendirilme sonuçlarına göre, P1 kapısı içerisinde intraselüler olarak boyaması yapılmış olan canlı hücre popülasyonu (Şekil 4.14-A), P2 kapısında ise birbirine değmeyen, yapışık olmayan boyanmış ve boyanmamış tek düşen hücrelerin populasyonu (Şekil 4.14-B) ve P3 kapısında ise miyojenik farklılaşma gösteren canlı hücre popülasyonunu (Şekil 4.14-C) gösterildi. Toplam canlı hücre popülasyonunun %39,2'sinin miyojenik farklılaşma gösterdiği (Şekil 4.14-D) görüldü.



Şekil 4.14. Akım sitometri cihazı kullanılarak FGF2 grubunun değerlendirilmesi. P1 kapısı canlı hücreler topluluğu (A); P2 kapısı, tek düşen hücreler (B); P3 kapısı, miyojenik farklılaşma gösteren hücreler (C); FGF2 grubundaki değerlerin ifadesi (D).

IGF1+FGF2 grubunun flow sitometri değerlendirilme sonuçlarına göre; P1 kapısı içerisinde intraselüler olarak boyaması yapılmış olan canlı hücre popülasyonu (Şekil 4.15-A), P2 kapısında birbirine değmeyen, yapışık olmayan boyanmış ve boyanmamış tek düşen hücreler (Şekil 4.15-B) ve P3 kapısında ise miyojenik farklılaşma gösteren canlı hücre popülasyonunu (Şekil 4.15-C) gösterildi. IGF1+FGF2 grubunda toplam canlı hücre popülasyonunun %39,3'ünün miyojenik farklılaşma (Şekil 4.15-D) gösterdiği tespit edildi.



Şekil 4.15. Akım sitometri cihazı kullanılarak IGF1+FGF2 grubunun değerlendirilmesi. P1 kapısı canlı hücreler topluluğu (A); P2 kapısı, tek düşen hücreler (B); P3 kapısı, miyojenik farklılaşma gösteren hücreler (C); IGF1+FGF2 grubundaki değerlerin ifadesi (D).

Üzerinde çalışma yapılan 4 grubun akım sitometri verileri kıyaslandığında (Tablo 4.2.) kontrol grubundaki canlı hücre popülasyonunun %11,5'inin miyojenik farklılaşma gösterdiği, IGF1 grubundaki canlı hücre popülasyonunun %23,1'inin miyojenik farklılaşma gösterdiği, FGF2 grubunda canlı hücre popülasyonunun %39,2'sinin miyojenik farklılaşma gösterdiği, IGF1+FGF2 grubunda %39,3'ünün miyojenik farklılaşma gösterdiği tespit edildi.

Tablo 4.2. Grupların akım sitometri verilerinin kıyaslanması.

AKIM SİTOMETRİSİ	1.GRUP KONTROL GRUBU	2.GRUP IGF1 GRUBU	3.GRUP FGF 2GRUBU	4.GRUP FGF2+ IGF1GRUBU
P3(Farklılaşma gösteren hücre yüzdesi)	%11.5	%23.1	%39.2	%39.3

Miyojenik medium uygulanan gruplarda P3 kapısında okunan ekspresyonlar kontrol grubuna göre artış gösterdi. IGF1 uygulanan grupta farklılaşma 2. ve 4. gruba kıyasla daha az olup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında arasındaki farklılık anlamlı olarak bulundu *($p < 0,05$).* FGF2 grubunda diğer gruplara nazaran farklılaşma yüzdesi daha yüksek oranda görüldü. Ancak istatistiksel olarak FGF2 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında arasındaki farklılık anlamlı olarak bulunmadı *($p > 0,05$).*

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Tartışma ve Sonuç

Kök hücreler, vücut ihtiyaçlarına bağlı olarak organize bir şekilde daha özel hücre tipleri üretme yeteneklerinden dolayı doku homeostazı mekanizmasının vazgeçilmez konumundadır. Kök hücre farklılaşması üzerindeki hassas kontrol doku homeostazı için önemlidir. Kök hücre davranışını modüle etmede nişin önemi gösterilmiştir. Yakın geçmişte modern son teknoloji teknikleri kullanarak kök hücre nişlerinin tanımlanması ve karakterizasyonunda olağanüstü ilerleme kaydedilmiştir. Bu gelişme, kök hücrelerin bulunduğu mikro ortamdaki ana hücresel bileşenlerin ve kök hücre davranışının kontrol edildiği moleküler mekanizmaların tanımlanmasına yol açarak kök hücre düzenlemesinde yer alan temel niş sinyallerini ortaya çıkarmaktadır (Birbrair, 2017). Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (ISCT) tarafından tanımlanan kriterlere göre bir hücre populasyonunun insan kökenli MKH olarak nitelendirilebilmesi; kültür ortamında plastik yüzeye tutunmaları, yüzey markerları açısından CD44, CD73, CD90 ve CD105 ekspresyonu pozitif; CD45, CD34, CD14, CD19 ve HLA-DR molekül ekspresyonunun negatif olmaları ve hücrelerin farklılaşma potansiyellerine sahip olması gerektiği gösterilmiştir (Dominici ve ark., 2006; Jones ve ark., 2008; Hass ve ark., 2001). MKH birçok kaynaktan izole edilebilir (Alvarado, 2019). Bu kaynaklara; adipoz doku, periferik kan, akciğer, kalp (Hass ve ark., 2001), kemik, kas dokusu, diş pulpası ve maksillofasial dokular, karaciğer, lipoaspirasyon materyalleri, kordon stroması, plasenta, amniyon sıvısı, sinovial sıvıdan örnek verilebilir (Gözen ve ark., 2015). Adipoz dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin çok daha kolay elde edilebilir ve diğer dokulara nazaran daha fazla kök hücre içerdiği tespit edilmiştir (Kuhbier ve ark., 2010). Kök hücrelerin farklı dokulara dönüşebilmesi için ise büyüme faktörleri bu süreçte önemli rol almaktadır. Büyüme faktörleri hücrenin yaşaması esnasında ihtiyacına göre gerekli büyüme, bölünme veya farklılaşma ile ilgili

proteinlerin tıpkı bir kılavuz gibi nereye gidip gitmeyeceğine karar verir. Yaşamımız boyunca ihtiyaç halinde vücudumuzda doğal olarak üretilebilir. Örneğin; hücrenin ihtiyacı onarım ise halihazırda bulunan yeterli sayıda protein varsa bunlara yön vererek onarımı sağlar. Eğer halihazırda protein yok ise onarımı mümkün olmayan doku kayıplarını gidermek imkansız hale gelmektedir ki işte bu noktada çağımızın yeni umudu olan kök hücreden faydalanmak mümkündür.

Gutiérrez ve Brandan'ın yaptığı bir çalışmada iskelet kası oluşumu ve yenilenmesi, FGF2 gibi büyüme faktörlerinin ortama katılımıyla kas düzenleyici transkripsiyon faktörlerinin spesifik kombinasyonların oluşturulabildiği belirtilmiştir (Gutiérrez ve Brandan, 2010). Distrofik kasın yenilenmesinde gözlenen yüksek FGF2 seviyeleri ile tutarlı eksojen FGF2, distrofik farelerde kas rejenerasyonunu arttırdığı gözlenmiştir. FGF2 bloke edici ajanlar verildiğinde kas yaralanmalarının ardından kas yenilenmesini engellediği fareler üzerine yapılan çalışmada gözlenmiştir (Cessna ve ark., 2001). Presta ve arkadaşlarının koroner hastaları üzerinde yaptığı çalışmada miyokarda implante edilen FGF2 kapsülleri iskemik bölgenin büyüklüğünde önemli bir azalmayı sağladığını rapor etmişlerdir (Presta ve ark., 2005).

İskelet kası dokusundan alınan hücreler üzerinde yapılan çalışmada; IGF1'in, miyoblastların hem çoğalmasını hem de farklılaşmasını uyardığını, fibroblast büyüme faktörü-2 ise çoğalmayı uyardığını ancak farklılaşmayı inhibe ettiğini göstermişledir (Crown ve ark., 2000). Satellit hücre proliferasyonunu teşvik edebilen parakrin FGF'lerin bazıları transkriptte ve yetişkin iskelet kasındaki protein seviyelerinde tespit edilmiştir. Özellikle, FGF2 satellit hücrelerle ilgili yapılan birçok çalışmada yaygın bir şekilde kullanılmıştır. FGF2'nin direkt olarak miyoblast farklılaşmasını bastırması, böylece proliferatif havuzun genişlemesini desteklediği yaplan çalışmalarla görülmüştür (Reuveni ve ark., 1999).

FGF2 ile birlikte IGF1 ve dönüştürücü büyüme faktörü gibi büyüme faktörleride satellit hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasını düzenlenmede rol aldığı belirtilmiştir (Tortorella ve ark., 2001). Ito ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada FGF2'nin osteojenik ve kondrojenik farklılaşma üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve insan kaynaklı MKH'leri 15 gün boyunca FGF2 içeren veya içermeyen kültür ortamında tutuktan sonra osteojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyelini ölçmüştür. Sonuçlar

FGF2'nin, MKH'lerin osteojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyellerini 2 kat arttırdığını göstermiştir (Ito ve ark., 2008).

Büyüme faktörlerinden bir diğeri olan IGF1'in, kas gelişimi proliferasyonunda önemli bir rol oynadığı, iskelet kaslarının dejenerasyonunda yer aldığını ve miyogenezi inhibe eden miyostatinin kas gelişimi üzerindeki etkisini azaltıcı etki oluşturarak bazı kas yıkımı hastalıklarının iyileştirebileceğini araştırmacılar bildirmişlerdir. IGF1'in, miyostatin ile tedavi edilen miyoblastların çoğalmasını ve yaşayabilirliğini arttırdığını ve buna paralel olarak, iskelet kasları üzerindeki hipertrofik etkileri, IGF1 aşırı eksprese eden fare için *in vivo* olarak göstermişlerdir (Gehmert ve ark., 2014). Reseptör tirozin kinaz familyasına ait IGF1 reseptörü, IGF'lere cevap olarak PI3K-AKT sinyal kaskadı aktive ederek, böylece iskelet kası hücrelerinin farklılaşmasını desteklediği bildirilmiştir (Ogata ve ark., 2011).

Supeno ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptığı deneysel çalışmada; proliferasyon aşamasında büyüme faktörü içermeyen medyumun verileceği bir kontrol grubu, birde büyüme faktörü kombinasyonlu çalışma grupları (2. Grup :EGF / bFGF, 3. grup: EGF / bFGF / LIF, 4. grup: EGF / bFGF / IGF1 ve 5. grubu: EGF / bFGF / LIF / IGF1) oluşturulmuştur. Nöral kök hücreler 1x10 yoğunluğunda 96 kuyucuklu plate de 5 tekrar ile büyütülmüştür. Hücre proliferasyonundaki artışı için 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde spektrofotometre ile değerlendirilerek veriler kayıt altına alınmıştır. IGF1 + EGF + FGF gibi büyüme faktörlerini içeren optimal bir mikro-çevre nişinin, *in vitro* embriyonik nöral kök hücrelerin uzun süreli bakımında ve büyümesinde önemli olabileceği düşünülmüştür. Çalışmada IGF1'in EGF / FGF'ye cevap veren nöral kök hücreler için *in vitro* olarak önemli bir kılavuz olabileceği ve nöral kök hücrelerin uzun süreli çoğalmasında ve korunmasında önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır (Supeno ve ark., 2013).

Dezfouli ve arkadaşları fare embriyonik kök hücre türevli hücrelerinin epitelyal tip II hücrelerine karşı yeterliliğini araştırmayı amaçlamayan deneysel çalışmada, iki aşamalı bir farklılaşma protokolü uygulanmış olup; serumsuz farklılaşma ortamında ilk 6 gün bekleyen hücreler ve sonraki 9 gün 100 ng / ml FGF2, 0.5 μg / ml hidrokortizon ilave edilmiş yeni farklılaşma ortamında muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; hidrokortizonun, tanımlayıcı endodermin küçük molekül indükleyicisinin indüklediği embriyonik kök hücre türevli endoderm hücrelerinin alveoler farklılaşmasında

destekleyici bir faktör olabileceğini düşündürdüğünü bildirmişlerdir (Dezfouli ve ark., 2019).

Shipunova ve arkadaşları 2013 yılındaki çalışmalarında doğal glukokortikosteroid hidrokortizonun toplam hücre üretimi, klonlama etkinliği ve mezenkimal stromal hücrelerin fonksiyonu için önemli olan genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisini incelemişler; Hidrokortizonun kültür ortamına eklenmesi, toplam hücre verimini 2 kat azalttığı ancak klonlama verimini 2-3 kat arttıdığını gözlemlemişlerdir. Üstelik bu etkinin dişi donörlerden elde edilen multipotent mezenkimal stromal hücrelerde daha belirgin oduğunu gözlemlemişlerdir. Hidrokortizonun kemik farklılaşma markerlarının ekspresyonunu inhibe ettiği, kültürün başlangıcında erken adiposit farklılaşma markerının ekspresyonunu arttırdığı ve kültürleşme dönemi boyunca geç adiposit farklılaşma markerının ekspresyonunu dramatik şekilde uyardığını ifade etmişlerdir (Shipunova ve ark., 2013).

Wang ve arkadaşları DMEM, at serumu, FGF ve deksametazondan da oluşan miyojenik farklışlama mediumunu kullanmışlardır. Miyojenez için 10 uM 5-azasitidin ilave edilerek MKH kültür ortamında 6 gün boyunca indüklemişlerdir. Deney sonucunda immünofloresan boyama ile MKH'lerin miyojenik farklılaşmasının 2 hafta sonunda tüm yüzeyde olduğunu ifade etmişlerdir. Hücrelerin şekillerinin F-aktin dizilimi uzun çıkıntılar ile miyosin ağır zinciri hücrelerin etrafına dağılmış olarak görüldüğünü (Wang ve ark., 2012). Okumura ve arkadaşları kemik iliğinden kaynaklı MKH'lerin miyojenik farklılaşma potansiyelini incelemek amaçlı kontrol grupları aynı olan farklı protokoller uygulamışlardır. Bu protokollerden biri olan ve hücre kültürü ortamında EGF, fetuin, FBS, deksametazon ve insülin bulunan medyumda 21. gününde miyojenik farklılaşmanın olduğunu bildirmişlerdir (Okumura ve ark., 2017).

Sabourin ve arkadaşları satellit hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde MyoD'nin rolünü belirleme amacıyla primer miyoblast kültürleri oluşturmuşlardır. Kültürlenmiş miyofiberler üzerindeki tek hücrelerin RT-PCR analizi c-met ifade eden sakin uydu hücrelerinin c-met eksprese ettiğini ancak saptanabilir MRF olmadığını ortaya koymuşlardır. Aktive edilmiş uydu hücreleri, hem Myf-5 hem de MyoD'yi birlikte eksprese etmeden önce ilk olarak Myf-5 veya MyoD'yi eksprese ederek ve terminal gelişimine yol açan normal gelişim programları boyunca ilerlemişlerdir. MyoD'nin yokluğunda, uydu hücrelerinin farklılaşma programı boyunca ilerleme yerine, kendini

yenileme eğilimi gösterdiği görülmüştür. Bu nedenle, Myf-5'in ifadesi tek başına, sessizliğe geri dönmeden veya MyoD'yi yukarı doğru düzenlemeden ve proliferatif miyojenik öncü hücrelerin oluşmasından önce uydu hücrelerinin kendi kendini yenilemesine izin verebileceğini düşünmüşlerdir. Sadece MyoD ifade eden hücrelerin potansiyel ve replikatif kapasitesi bilinmemektedir; Bununla birlikte bu hücrelerin muhtemelen miyojenik program boyunca geri dönüşü olmayan bir şekilde ilerler. Birlikte ele alındığında, bu verileri yorumlayarak, MyoD miyojenik hücrelerin, miyojenik kök hücre ile bir miyojenik öncü hücre arasındaki ara aşamayı temsil ettiğini öne sürmüşlerdir (Sabourin ve ark., 1999).

Çalışmamızın sonucuna göre adipoz doku kaynaklı MKH'lerin miyojenik farklılaşmasında FGF2'nin koşullu besiyerine eklenmesi ile miyojenik farklılaşma sürecinde IGF büyüme faktörüne kıyasla hem daha kısa süre de morfolojik olarak farklılaşmanın olduğu hem de MyoD1 ile intraselüler hücresel boyama sonucunda da farklılaşmış hücre popülasyonunun daha fazla olduğu görüldü. Farklılaşma çalışmalarında ortak olarak kullanılan sentetik glukokortikoid biyomolekül olan deksametazon ve hidrokortizonun olduğu kontrol grubunda miyojenik farklılaşma yüzdesinin, FGF2 ve IGF1 büyüme faktörlerinin olduğu gruba göre daha az miyojenik farklılaşma olduğu görüldü. FGF2 büyüme faktörünün hücre çoğalması, farklılaşması, hayatta kalma ve hareket kabiliyeti dahil olmak üzere çok sayıda fonksiyon gösteren kilit aktörlerden bir olduğunu belirten çalışmalara ek olarak (Kahiwakura ve ark., 2005) bizim çalışmamızda da FGF2'nin farklılaşmayı olumlu etkilediği sonucu gösterilmiştir.

Bu çalışmamızın sonuçları kök hücrelerin rejenerasyon kapasitesi ve farklılaşma özelliğinin büyüme faktörleri ile desteklenmesi pek çok spesifik hastalıkların tedavi edilmesine önemli ölçüde katkıda bulunacağını göstermektedir.

6.KAYNAKLAR

Akgün I, Kas İskelet Sistemi Hastalıklarında Kök Hücre Uygulamaları, İstanbul Totbit Dergisi 2017;16:266–275.

Akgün I, Mezenkimal Kök Hücre, FNG&Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi 2016;1(1):29-32.

Akın Ş, Demirel H. İskelet Kası Uydu Hücreleri ve Kas Rejenerasyonundaki Yeri, Türkiye Klinikleri, J Sports Med-Special Topics 2017;3(3):227-32.

Akkoç A, Toplu N, Kanser Kök Hücresi, Animal Health Prod and Hyg, 2016; 5(1):416 – 422.

Akpulat U. Fare Miyoblast Hücre Hattında KLF5 Geninin Farklılaşma Sürecine Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlik Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2014;3-10.

Alvarado L, Rodriguez L, Mohammadipoor A, Cancio LC, Antebi B. İdentification of the Ideal Mesenchymal Stem Cell Candidate to Treat Infection Induced Acute Respiratory Distress Syndrome In Vitro, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2019;199-123.

Ateş U, Kök Hücreyi Tanıyalım, FNG&Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi 2016;1(1):19-28.

Awad HA, Halvorsen YD, Gimble JM, Guilak F. Effects of Transforming Growth Factor Beta and Dexamethasone on the Growth and Chondrogenic Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cells, Tissue Eng. 2003;9:1301–1312.

Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic Stem Cells Adopt Mature Haematopoietic Fates in İschaemic Myocardium, Nature, 2004;428(6983):668-73.

Berberoğlu A. Periodontal Dokuların İyileşmesinde Büyüme Faktörlerinin Rolü. Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi, 2007; 31(3);114-121.

Berebichez R, Fridman, Pablo R, Olvera M, Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları ve Klinik Uygulamaları, Sultan Qaboos Üniversitesi Med J. 2018;18(3):264-277.

Bhattacharya N, Stubblefield P. Regenerative Medicine Using Non-Fetal Sources of Stem Cells, 2014.

Bhuiyan M, Kim N, Cho Y, Yoon D, Kim KS, Jeon J, Lee J. Identification of SNPs in MYOD Gene Family and Their Associations with Carcass Traits in Cattle, Livest Sci, 2009;126;292-297.

Bianco P, Robey P, and Simmons P. Mesenchymal Stem Cells, Revisiting History, 10 2008;13-319.

Binoux M. The IGF System in Metabolism Regulation, Diabete Metab. 1995;21(5):330-337.

Birbrair A, Stem Cell Microenvironments and Beyond Stem Cell Microenvironments and Beyond, Adv Exp Med Biol. 2017;1041:1-3.

Can A, Kök hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları, Akademisyen tıp kitapevi, Ankara, 2014;720.

Caplan A, Mesencymal Stem Cell, Journal of Orthopaedic Research, Journal of Orthopaedic Research, 1991;9:641-650.

Cessna J, Zhou H, Perkins SL, Tripp SR, Layfield L, Daines C, Coffin CMaime Gutiérrez, Enrique Brandan, Are Myogenin and MyoD1 Expression Specific for Rhabdomyosarcoma? A study of 150 Cases, with Emphasis on Spindle Cell Mimics, Am J Surg Pathol, 2001;25(9):1150-7.

Chal J, Oginuma M, Al Tanoury Z, Gobert B, Sumara O, Hick A, Bousson F, Zidouni Y, Mursch C, Moncuquet P, Tassy O, Vincent S, Miyanari A, Bera A, Garnier JM, Guevara G, Hestin M, Kennedy L, Hayashi S, Drayton B, Cherrier T, Gayraud-Morel B, Gussoni E, Relaix F, Tajbakhsh S, Pourquié. Differentiation of Pluripotent Stem Cells to Muscle Fiber to Model Duchenne Muscular Dystrophy, Nat Biotechnol ,2014;33,962-969.

Chen ZX, Chang M, Peng YL, Zhao L, Zhan YR, Wang LJ, Wang R. Osteogenic Growth Peptide C-terminal Pentapeptide Acts on Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Promote Differentiation to Osteoblasts and To İnhibit Differentiation to Adipocytes, Regul Pept; 2007;142:16-23.

Colter DC, Class R, Digiromala, Proscop, Rapidexpansion of Recyclingstem Cell in Culteres of Plastic Adherent Cell From Human Bone Morrow, Proc Natl Acad Sci, 97;2000; 3213-3218.

Conchillo M, Prieto J, Quiroga J. Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) and Liver Cirrhosis, Revısta Española de Enfermedades Dıgestıvas, 2007;156-161.

Cornelison DD, Filla MS, Stanley HM, Rapraeger AC, Olwin, BB. Syndecan-3 and Syndecan-4 Specifically Mark Skeletal Muscle Satellite Cells and are İmplicated in Satellite Cell Maintenance and Muscle Regeneration, Dev. Biol, 2001; 79–94.

Corselli M, Chen CW, Crisan M, Lazzari L, PeaultB, Perivascular Ancestors of Adult Multipotent Stem Cell. Arteroscler Thomb Vasc Biol 2010;30:1104-1109.

Coşkun E. Adipoz Doku Kökenli Kök Hücre Naklinin Abdominoplasti Sonrası Transvers Rektus Abdominas Kas-Deri (Tram) Flebi Yaralanabilirliği Üzerine Etkileri:Deneysel Çalışma, Uzmanlık Tezi, Başkent Üniversitesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara 2015.

Crown A, He X, Holly J, Lightman S, Stewart C, Characterisation of the IGF System in a Primary Adult Human Skeletal Muscle Cell model and Comparison of the Effects of İnsulin and IGF-I on Protein Metabolism, Journal of Endocrinology, 2000;16:403–415.

Çetin EA, Ar CM, Yanıkkaya G, Demirel G, Bilgiç S, Salman F, Deniz G. İnsan Mezenkimal Kök Hücre Fenotipik Karakterizasyonu; Yağ ve Kemik Hücrelerine Yönlendirilmesi; Turk J Immunol, 2011;16:1.

Çolak R. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Proteinler, Türkiye Klinikleri, 2007;3:10-17.

Daştan A, Günal G, İldoğan L, Somuncu G (2009), Kök Hücre Teknolojisi; http://kisi.deu.edu.tr/bulent.cavas/ders/bok2.pdf.

Daynac M, Petritsch C, Regulation of Asymmetric Cell Division in Mammalian Neural Stem and Cancer Precursor Cells, Results Probl Cell Differ, 2017;61:375-399.

Deasy Z, Peterson Q, Greenberger JS, Huard J. Mechanisms of Muscle Stem Cell Expansion with Cytokines, Stem Cells, 2002;50-60.

Delrieu I, The High Molecular Weight İsoforms of Basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2): an İnsight İnto an İntacrine Mechanism, FEBS Letters, 2000;6-10.

Demirdöver C, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi AD, Türkiye Klinikleri, 2015;4(1).

Dezfouli MR, Chaleshtori S, Moradmand A, Basiri M, Baharvand H, Tahamtani Y, Hydrocortisone Promotes Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Definitive Endoderm Toward Lung Alveolar Epithelial Cells, 2019,20(4):469-476.

Domenico D'Amario, Mauricio Cabral-Da-Silva, Hanqiao Zheng, Claudia Fiorini, Polina Goichberg, Elisabeth Steadman, João Ferreira-Martins, Fumihiro Sanada, Marco Piccoli, Donato Cappetta, David A. D'Alessandro, Robert E. Michler, Toru Hosoda, Luigi Anastasia, Marcello Rota, Annarosa Leri, Piero Anversa, and Jan Kajstura. The IGF-1 Receptor Identifies a Pool of Human Cardiac Stem Cells with Superior Therapeutic Potential for Myocardial Regeneration, Circ Res, 2011; 108(12):1467–1481.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement, Cytotherapy, 2006;8(4):315-7.

Emin N. Yapay Niş Mikroçevrede Doku Gelişim Modeli Oluşturulması, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2012.

Erden S, Kök hücreler ve Klinikte Kullanımları, Journal of New Results in Engineering and Natural Science, 2014;3;1-8.

Erden S, Kök hücreler ve Klinikte Kullanımları, Journal of New Results in Engineering and Natural Science, 2014;3:1-8.

Ergin E. Vasküler Endotheliyal Büyüme Faktörü Ve MKH Uygulamasının Sıçan Sırt Flebi Modelinde Kapiller Yoğunluğa Etkisinin CD 31 İle İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2014.

Eroğlu F. Adipoz Doku Kökenli Erişkin Kök Hücre Uygulamasının D-Galaktoz İle Yaşlanma Modeli Oluşturulmuş Deride Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkilerinin Moleküler Düzeyde Gösterilmesi, Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2014;45-52.

Eyüboğlu A. Kronik Böbrek Hastaliği Olan Siçanlarda Adipöz Kökenli Stromal Vasküler Fraksiyonun ve Trombositten Zengin Plazmanin Kemik İyileşmesi Üzerine Etkileri, Uzmanlik Tezi, Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2017.

Ferrari G1, Cusella De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle Regeneration By Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors, Science, 1988; 279:1528–1530.

Fındıklı N, Embriyonik Kök Hücre Biyolojisi, Türkiye Klinikleri, 2006;2(43):16-20.

Noyan A. Fizyoloji, 9.Baskı, 1996.

Fuchs E, Tumbar T, Guasch G. Socializing With the Neighbors: Stem cells and their niche, 2004;116:769- 778.

Gang EJ, Jeong JA, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H. Skeletal Myogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Isolated From Human Umbilical Cord Blood, Stem Cells, 2004;617-624.

Gehmert S ,Wenzel C, Loibl M, Brockhoff G, Huber M, Krutsch W, Nerlich M, Gosau M, Klein S, Schreml S, Prantl L, ve Gehmert S. Adipose Tissue-Derived Stem Cell Secreted IGF-1 Protects Myoblasts From the Negative Effect of Myostatin. BioMed Research International, 2014: 9.

Gerontol J. Embryonic Stem Cells: New Possible Therapy For Egenerative Diseases That Affect lderly People, A Biol Sci Med Sci, 2003;58:279-287.

Gözen A, Ünsal S, Gökalp M, Ortopedide Mezenkimal Kök Hücre Uygulamaları, Van Tıp Dergisi:2015;22(2): 131-137.

Gu W, Hong X, Le Bras A, Nowak WN, Issa Bhaloo S, Deng J, Xie Y, Hu Y, Ruan XZ, Xu Q, Smooth Muscle Cells Differentiated From Mesenchymal Stem Cells are Regulated by MicroRNAs and Suitable For Vascular Tissue Grafts, J Biol Chem. 2018;293(21):8089-8102.

Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. Dystrophin Expression in the Mdx Mouse Restored By Stem Cell Transplantation, Nature, 1999;401:390–394.

Gutiérrez J, Brandan E. A Novel Mechanism of Sequestering Fibroblast Growth Factor2 by Glypican in Lipid Rafts, Allowing Skeletal Muscle Differentiation, 2010;30(7):1634-49.

Gültekin S, Tokman B, Mollaoğlu N, Epidermal Büyüme Faktörü ve Fibroblast Büyüme Faktörünün Folliküler Kist ve Ameloblastomadaki Varlığının immünhistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi: 2002;4(1):12–16.

Gündeşlioğlu A, Altuntaş Z, İnce B, Dadacı M, Aktan M, Duman S. Yağ Doku Kökenli Kök Hücreler ve Plastik Cerrahide Uygulama Alanları, Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi, 21(3), 2013.

Güneş A. Kök Hücre Plastisitesi ve Tıptaki Kullanım Alanları, Güncel Pediatri, 2005;36-42.

Güneş H. Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri, Tr J of Biology, 1999;283-292.

Haasters F, Prall W, Bourquin D, Pautke C, Endres S, Mutschler W, Docheva D, Schieker M. Anatomical Society of Great Britain and Ireland, Morphological and İmmunocytochemical Characteristics İndicate the Yield of Early Progenitors and Represent a Quality Control for Human Mesenchymal Stem Cell Culturing, J Anat, 2009: 214(5):759-67.

Harbili S. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF): Egzersiz Metabolizması ve Kas Dokusu Üzerine Etkileri, Genel Tıp Derg, 2008; (4)18.

Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different Populations and Sources of Human Mesenchymal Stem Cells (MSC): A Comparison of Adult and Neonatal Tissue-Derived MSC Cell Commun Signal, 2011;9:12.

Hocking A. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cutaneous Wounds, Wound Healing Society, 2011;166–171.

Huang Y, Qıu R, Maı W, Kuang J , Ca X , Dong Y, Hu Y , Song Y, Cai A , Jiang Z. Effects of İnsulin-Like Growth Factor-1 On The Properties of Mesenchymal Stem Cells İn Vitro, J Zhejiang Univ Sci B, 2012;13(1):20–28.

Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Tsuchiya T. FGF-2 İncreases Osteogenic and Chondrogenic Differentiation Potentials of Human Mesenchymal Stem Cells by İnactivation of TGF-Beta Signaling**;** Cytotechnology, 2008; 56(1): 1–7.

İskender B, Canatan H, İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler ve Hücre Tedavisi, Journal of Clinical and Experimental Investigations; 2013;4(4):550-561.

Jackson KA1, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of İschemic Cardiac Muscle and Vascular Endothelium by Adult Stemcells, J. Clin. Invest, 2001;1395–1402.

Jiwlawat N, Lynch E, Jeffrey J, Dyke J, Suzuki M, Current Progress and Challenges for Skeletal Muscle Differentiation From Human Pluripotent Stem Cells Using

Transgene-Free Approaches, Hindawi Stem Cells International Volume, 2018;18.

Jones DL, Wagers AJ. No Place Like Home: Anatomy and Function of the Stem Cell Niche, Nature Review Mol Cell Biol, 2008;9(1):11-21.

Kaliman P, Vinals F, Testar X, Palacin M, Zorzano A, Phosphatidylinositol 3-Kinase İnhibitors Block Differentiation of Skeletal Muscle Cells. J Biol Chem 1996;271:19146-19151.

Kaltalıoğlu K. Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü'nün Yara Dokusu Oksidatif Olayları Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2012;28-35.

Kang SB , Lee HN , Lee JY , Park JS , Lee HS , Lee JY. Sphincter Contractility After Muscle-Derived Stem Cells Autograft into The Cryoinjured Anal Sphincters of Rats, International Urogynecology Journal, 2008;51(9):1367-1373.

Karaduman H. İlaç Keşfi ve Geliştirilmesinde Kök Hücrenin Yeri, Bitirme Ödevi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, Mayıs 2012.

Karahan M, Erol B, Muscle and Tendon İnjuries in Children and Adolescents, Acta Orthop Traumatol Turc 2004;1:37-46.

Kashiwakura I, Takahashi TA. Fibroblast Growth Factor and Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Progenitor Cells, Leuk Lymphoma, 2005;46(3):329-33.

Kıvanç M, Ş. Öztürk, S. Gökalp, İ.Özdemir, İ. Tuğlu. Adipoz Kaynaklı Kök Hücreler ve Uygulama Alanları, Cukurova Medical Journal, 2015;40(3):399-408.

Korkmaz S. Sporcularda Uzun Süreli Yorgunluğun Kas Hasarıyla İlişkisi, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2010.

Kuhbier JW, Weyand B, Radtke C, Vogt PM, Kasper C, Rimers K. Isolation, Characterization, Differentiation, and Application of Adipose-Derived Stem Cells. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2010;123:55–105.

Li A, Hokugo A, Jarrahy R, Zuk P. Human Adipose Tissue as a Source of Multipotent Stem Cells Stem Cells in Aesthetic Procedures, Stem Cells in Aesthetic Procedures, 2014; 67-83.

M. Kıvanç, Ş. Öztürk, S. Gökalp, İ.Özdemir, İ. Tuğlu. Adipoz Kaynaklı Kök Hücreler ve Uygulama Alanları, Cukurova Medical Journal, 2015;40(3):399-408.

Matur İ, Solmaz S. Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar, Arşiv, 2011;20:168.

Meran E, Oskay Ü, Gebelik Dönemi ve Kök Hücre Mucizesi, F.N. Hem. Derg, 2016; 24(3): 181-190.

Mermer M, Acar N. Adipoz Doku ve Enerji Metabolizması Üzerine Etkileri, Tek Sdü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 8(3): 2017.

Mete G. Sıçanlarda Kronik Travmatik Diz Osteoartriti Modelinde MKH Tedavisi, Uzmanlık Tezi, Atatürk Eğitim ve Araştirma Hastanesi 2.Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, İzmir, Uzmanlık Tezi, 2009.

Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedric MH. İnsan Adipoz Dokusundan Çok Hücreli Hücreler: Hücre Bazlı Tedaviler İçin Uygulamalar 2001;7: 211-228.

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V,Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic Stem Cells do not Transdifferentiate into Cardiac Myocytes in Myocardial, Nature, 2004;428:664-668.

Ogata T, Teshima T, Inaoka M, Minami K, Tsuchiya T, Isono M, Furusawa Nariaki Y, Matsuura, Carbon Ion. Irradiation Suppresses Metastatic Potential of Human Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells Through the Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt Signaling Pathway, Ournal of Radiation Research, 2011, 374–379.

Okamura L, Cordero P, Palomino J, Hugo V, Torres C, Alejandro O, Peralta, Myogenic Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells Derived From Fetal Bovine Bone Marrow, 2018;29.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone Marrow Cells Regenerate İnfarcted Myocardium, Nature, 2001;701–705.

Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast Growth Factors, Genome Biol,2001;1-12.

Ovalı E. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları ve Üretimi, Mezankimal Kök Hücre (MKH)kursu; 2008; http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/MKH_2008_kurs.pdf.

Özmen S, Fındıkçıoğlu F, Siemionow M. Kök Hücreler, Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi, 2006;14(3),187-196.

Öztel N. İnsan Göbek Kordon Kanı ve Periferik Kan Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin *in vitro* Kültür Ortamına Adaptasyonuna Etki Eden Faktörlerin

İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2010.

Öztopalan F, Işık R, Durmuş A. Yara İyileşmesinde Büyüme Faktörleri ve Sitokinlerin Rolü, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2017;10(1):83-88.

Pansky A. Roitzheim B. Tobiasch E. Differentiation Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells, Clin Lab, 2007;53:81-4.

Pavelic J, Matijevic T, KnezevicJ, Boškovic R, Physiological Aspects of Action of İnsulin-Like Growth Factor Peptide Family, Division of Molecular Medicine, Indian J Med Res, 2005;125:511-522.

Pawlikowski B, Vogler TO, Gadek K, Olwin BB. Dev Dyn. Regulation of Skeletal Muscle Stem Cells by Fibroblast Growth Factors. 2017;246(5):359-367.

Picard B, Lefaucheur L, Berri C.Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. Reprod Nutr Dev 42:2002: 415-431.

Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, Moorman M, Simonetti D, Craig S, Marshak D. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells Science. 284;541: 1999:143-147.

Powers C J, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast Growth Factors, Their Receptors and Signaling. Endocrine-Related Cancer 2000;7:165-97.

Pravin J, Mishra, Prasun J. Mishra, Rita Humeniuk, Daniel J. Medina, Gabriela Alexe, Jill P. Mesirov, Sridhar Ganesan, John W. Glod, Debabrata Banerjee, Carcinoma-Associated. Fibroblast–Like Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells, 68:11: 2008.

Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M, Fibroblast Growth Factor/Fibroblast Growth Factor Receptor System in Angiogenesis, Cytokine Growth Factor Rev, 2005;16(2):159-78.

Prockop Dj, Dominici M, Blanc, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, 2006;8(4):315-7.

Reuveni Y, Seger Z, Rivera R, Fibroblast Growth Factor Promotes Recruitment of Skeletal Muscle Satellite Cells in Young and Old Rats. J Histochem Cytochem, 1999;47: 23– 42.

Reyes M, Verfailli CM. Characterization of Multipotent Adult Progenitor Cells, Subpopulation of Mesenchymal Stem Cell, Ann N Y Acad Sci,2001;938; 231-233.

Sabourin L, Girgis-Gabardo A, Seale P, Asakura A, ve Rudnicki M, Reduced Differentiation Potential of Primary *MyoD−/−* Myogenic Cells Derived From Adult Skeletal Muscle, J Cell Biol. 1999; 144(4): 631–643.

Sağsöz H, Ketani M. Kök Hücreler, Dicle Üniv Vet Fak Derg 2008;1(2): 29 – 33.

Scata KA, Bernard DW, Fox J, Swain JL. FGF Receptor Availability Regulates Skeletal Myogenesis. Experimental Cell Research. 1999;250(1):10–21.

Schipani E, Kronenberg HM, Adult Mesenchymal Stem Cells, Source Stem Book, Harvard Stem Cell Institute; 2009.

Serbest K, Eldoğan O. İskelet Kaslarının Yapısı ve Biyomekaniği, APJES II-III, 2014;41-51.

Sevim H, Gürpınar Ö. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler ve Uygulamaları, Marmara Medical Journal, 2011;5-9.

Sevimli M, Semerci T. Embriyonik Kök Hücrelerde Wnt Sinyal Yolağı, DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 2016;30(1);45-54.

Shelton M, Metz J, Liu J, Carpenedo RL, Demers SP, Stanford WL, and Skerjanc I, Derivation and Expansion of PAX7-Positive Muscle Progenitors From Human and Mouse Embryonic Stem Cells, Stem Cell Reports, 3;2014:516–529.

Shipunova N, Petinati N, Drize N, Shipunova. Effect of Hydrocortisone on Multipotent Human Mesenchymal Stromal Cells, 2013;155(1):159-163.

Sir G, Tekeli S, Kürekçi, Ş, Naghavi E, Çavuşoğlu T, Uyanıkgil Y. Kordon Kanı Kök Hücreleri ve Klinik Kullanımı, FNG&Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi, 2016;1(2):53- 58.

Sotiropoulou S, Panagiota A, Perez A, Salagianni M, Constantin N, Baxevanis, Papamichail M. Characterization of the Optimal Culture Conditions for Clinical Scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells. Ph.D, 2009.

Supeno NE, Pati S, Hadi R, Rahman A, Ghani I, Mustafa Z, Abdullah J, Idris FM, Han X and Hasnan Jaafar. GF-1 Acts as Controlling Switch for Long-term Proliferation and Maintenance of EGF/FGF-responsive Striatal Neural Stem Cells, Int J Med Sci, 2013;10(5):522–531.

Şahin F, Saydam G, Omay SB. Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi, Türk Hemalotoji-Onkoloji Dergisi, 2005;1(15):48-56.

Şimşek Ö. Yetişkin Kök Hücrelerin Dünü ve Bugünü, Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. 2012;7(3):231-236.

Tada S, Kitajima T, Ito Y. Design and Synthesis of Binding Growth Factors, International Journal of Molecular Sciences, 2012; 6053-6072.

Taşolar H, Pekdemir H. İskelet Kası Kök Hücrelerinin Kardiyak Kullanımı, Türkiye Klinikleri, 2015;8(5):31-7.

Tekinarslan İ, Unur E, Ülger H, Ekinci N, Ertekin T, Hacıalioğulları M, Arslan S. FGF-9'un In Vitro Embriyonik Gelişim Üzerine Etkileri, Balkan Med J, 2011; 28: 18-22.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic Stem Cell Lines Derived From Human Blastocysts, Science. 1998;6:282(5391):1145-7.

Tollefsen SE, Thompson K, Petersen DJ. Separation of the High Affinity İnsulin-Like Growth Factor I Receptor From Low Affinity Binding Sites by Affinity Chromatography, J. Biol. Chem. 1987;262:16461-1646.

Toparslan E, Mercan L, Kuran M. Kalıtımın Epigenetik Boyutunda DNA Metilasyon Desenleri, Hayvansal Üretim, 2015;56(2): 38-42.

Tortorella LL, Milasincic D, Pilch PF. Critical Proliferation-İndependent Window for Basic Fibroblast Growth Factor Repression of Myogenesis via the p42/p44 MAPK Signaling Pathway. The Journal of Biological Chemistry, 2001;276(17):13709–13717.

Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y, Retention of Multilineage Differentiation Potential of Mesenchymal Cells During Proliferation in Response to FGF; Biochem Biophys Res Commu, 2001;413-419.

Ullah I, Subbarao R, Rho G, Human Mesenchymal Stem Cells Current Trends and Future Prospective Biosci Rep, 35(2);2015.

Ural A. Embriyonel ve Mezodermal Kök Hücreler, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Hematoloji Bilim Dalı, 2017. http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/29_04_2006_ali_ugur_ural_10-30_11-00.pdf.

Ural E, Yararcan M, Küçükgül S, Öziz E. Büyüme Faktörleri ve Retinopatiler, t. Oft.Gaz, 2002;552-560.

Ünsal G, Özmekik Ö, Ulukapı I. Dental Kök Hücreler ve Süt Dişlerinin Kök Hücre Çalışmalarındaki Önemi, Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg, 2014; 98-106.

Walpurgis K, Thomas A, Laussmann T, Horta L, Metzger S, Schänzer W, Thevis M. Identification of Fibroblast Growth Factor 1 (FGF-1) in A Black Market Product. Drug Test Anal. 2011;3(11-12):791-7.

Wang P, Li W, Yu J, Tsai W. Modulation of Osteogenic, Adipogenic and Myogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Submicron Grooved Topography, Journal of Materials Science, Materials in Medicine, 2012;(23)12: 3015–3028.

Widmaier EP, Raff H, Strang TS. Vander Human Physiology Medicine Book, Güven Kitabevi,2010;598-599.

Yanbakan S. Hücresel Tedavi Ürünlerinin Klinik Kullanım Alanları, Journal of Clinical and Experimental Investigations, 2015;202-208.

Yarım F, Kazak F, Epidermal Büyüme Faktörü, Kocatepe Veterinary Journal Kocatepe Vet J, 2016;9(3):215-225.

Yaşar D. Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerden Kondrosit Farklılaşması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2014.

Yılmaz A. Otolog Periferik Kök Hücre Toplanmasında Bakteri Kontaminasyon Riski ve Aşamasının Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstütüsü, Ankara, 2009.

Yılmaz M. Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanması ve Fenotipik Özellikleri, Mezenkimal Kök Hücre Kursu. Çeşme, 2008;11-3.

Yılmaz O, Uçar M, Kök Hücre Çalışmaları ve Terapötik Klonlama, Hayvancılık Araştırma Dergisi, 2006;16,1: 26–31.

Yörükoğlu A. Sıçan Modelinde Oluşturulan Kemik Defektlerinde Hücre Kültürü Ortamında Mezenkimal Kök Hücrelerden Elde Edilen Membranın Kırık Kaynaması Üzerine Etkisi, Uzmanlık Tezi, Pamukkale Ünivesitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Denizli, 2012.

Yüzbaşıoğlu A. Dejenerasyon Sürecindeki Kas Dokusunda Housekeeping Genlerin Ekspresyon Düzeyinde İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 2008.

Zola H, Swart B, Banham A. CD Molecules 2006-Human Cell Differentiation Molecules. Journal of Immunological Methods, 2007;319(1-2):1-5.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAEK-80)

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücresinin büyüme faktörlerinin etkisiyle iskelet kas hücresine indüklenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI		Açıklama
	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER	☐	

AŞLI GİBİDİR
T.C. ERCİYES ÜNİVERSİTESİ 1923 TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Funda [illegible]
Etik Kurul Sekreteri

KARAR BİLGİLERİ		
	Karar No : 2017/418	Tarih : 15.09.2017
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiş	

KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Klavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti		Araştırma İle İlişki		Katılım (*)		İmza
Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL	Çocuk. Sağ ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐	K X	E ☐	H X	E x	H ☐	
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Prof. Dr. Ahmet ÖZTÜRK	Halk Sağlığı.	E.Ü. Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H X	E ☐	H x	
Prof. Dr. Kemal DENİZ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H X	E x	H ☐	
Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ	Çocuk Sağ. ve Hast.i	E.Ü. Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H x	E ☐	H x	
Doç.Dr. Aydın ÜNAL	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H x	E x	H ☐	
Doç. Dr. Güven KAHRİMAN	Radyoloji	E.Ü.Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H x	E x	H ☐	
Doç. Dr. Kemal ÖZYURT	Dermatolojii	Kayseri Eğitim Hast.	E X	K ☐	E ☐	H x	E x	H ☐	
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi	E.Ü. Diş Hek.Fak.	E X	K ☐	E ☐	H x	E x	H ☐	
Doç. Dr. Cihangir BİÇER	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.,	E X	K ☐	E ☐	H X	E ☐	H x	
Yard. Doç. Dr. Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H X	E x	H ☐	
Yard.Doç.Dr. Gökmen ZARARSIZ	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H X	E x	H ☐	
Av. Serhat ÜSTÜNEL	Avukat	Hukuk Müşaviri	E X	K ☐	E ☐	H X	E x	H ☐	
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E ☐	K X	E ☐	H X	E x	H ☐	
Sevtap Koçer	Sivil Üye	Serbest	E ☐	K X	E ☐	H X	E x	H ☐	

*: Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Ünvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır

YAĞ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN BÜYÜME FAKTÖRLERİ ETKİSİYLE İSKELET KAS HÜCRESİNE İNDÜKLENMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%6	%6	%2	%
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	%2
2	www.thd.org.tr İnternet Kaynağı	%1
3	prezi.com İnternet Kaynağı	%1
4	www.geneltip.com İnternet Kaynağı	<%1
5	vantipdergisi.yyu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
7	dergipark.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	www.turkiyeklinikleri.com	<%1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Büşra DOĞAN

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 25 Temmuz 1988, Kayseri

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 05061052818

email: 38busraaslan@gmail.com

EĞİTİM	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Atatürk Üniversitesi KKEF	
	Biyoloji Öğretmenliği	2013
Lise	Behice Yazgan Yabancı Dil Ağırlıklı Kız Lisesi	2007

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2014-2015	Batı Koleji	Öğretmen

YAYINLAR

Ercan K, Sezek F, Akman Z, Erbil B, Aslan B. ve Keleş Ö, Üniversite Öğrencilerinin Öğrenim Gördükleri Alanlara Göre Organ Nakli ve Bağışı İle İlgili Görüşleri, EKEV Akademi Dergisi, 2015;62:471-486.

Ercan K, Sezek F, Akman Z, Erbil B, Aslan B. ve Keleş Ö, Üniversite Öğrencilerinin Cinsiyetinin Organ Nakli ve Bağışı Hakkında Görüşlerine Etkisi, EKEV Akademi Dergisi, 2015;62:307-320.

YABANCI DİL

İngilizce