

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

PLASENTA-KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK/STROMAL HÜCRELERİN
İZOLASYONU, ÇOĞALTILMASI VE BİYOKOMPOZİTLER ÜZERİNDEKİ
DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ

Melisa Baştuğ

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. A. Eser Elçin

Ocak

2022

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Melisa Başıtuğ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Plasenta-Kaynaklı Mezenkimal Kök/Stromal Hücrelerin İzolasyonu, Çoğaltılması ve Biyokompozitler Üzerindeki Davranışlarının İncelenmesi

Melisa Baştuğ

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. A. Eser Elçin

Bu çalışmanın amacı plasenta kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin hücreleştirilmiş kemik hidrojelinde, osteojenik ve standart vasatlarda kültürlendiğinde osteojenik farklılaşma potansiyellerinin incelenmesidir. Öncelikle steril koşullarda temin edilen plasentanın amniyotik zarından enzimatik ve fiziksel sindirim yöntemleri kullanılarak mezenkimal kök hücre (MKH) izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu gerçekleştirilen ve çoğaltılan hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğu mikroskopik görüntüleme, CFU ve akım sitometri analizleri ile belirlenmiştir. Amniyotik zar (AZ)-MKH'lerinin karakterizasyonu yapıldıktan sonra hücre çoğalma verimliliğine bakılmıştır. AZ-MKH'lerin yüzeyinde çoğaltılacağı biyokompozit substratların hazırlanması için, sıgır femur kemiğinin hücreleştirilmesi sonucunda deselülerize kemik matriksi (DKM) hidrojelinde elde edilmiştir. Hücreleştirme verimliliğinin anlaşılması için, işlem gören dokulardaki DNA varlığı, kolajen içeriği ve GAG miktarı belirlenmiştir. Hücreleştirme verimliliği tespit edilen ve jelleştirilen substratların, SEM ve FTIR analizleri ile karakterizasyon çalışması yapılmıştır. Kan plazması temel alınarak hazırlanan sentetik vücut sıvısı (SVS), DKM jel yapıları ile 8 gün boyunca inkübe edilerek biyomineralizasyon sağlanmıştır. Tez çalışmasının son adımında ise hazırlanan substratlar üzerine AZ-MKH'leri ekilmiş ve hücrelerin 0., 7., 14., ve 21. günlerde SEM görüntüleri, canlılık analizi, ALP ve Ca^{2+} miktar tayinlerini içeren analizler gerçekleştirilmiştir. SEM bulguları biyokompozit substratlara AZ-MKH'lerin tutunabildiği substratlar olduğunu ortaya koymuştur. Metabolik aktiviteye dayalı hücre canlılığı, ALP ve Ca^{2+} analizlerinin sonuçları, DKM'lerdeki hücrelerin canlılık oranlarının SVS ile işlem gören DKM'lerdekine göre daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur.

2022, 105 sayfa

Anahtar kelimeler: Plasenta-kaynaklı mezenkimal kök hücreler, amniyotik zar, deselülerize kemik matriksi, rejeneratif tıp, doku mühendisliği.

ABSTRACT

M.Sc.Thesis

Isolation and Expansion of Placenta-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Evaluation of Their Properties on Biocomposites

Melisa BASTUG

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. A. Eser ELCIN

The aim of this study was to investigate the osteogenic differentiation potential of placenta-derived mesenchymal stem cells on biocomposite substrates based on decellularized bone when cultured under standard and osteogenic conditions. Firstly, mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated from the amniotic membrane (AM) of the placenta, which was taken under sterile conditions, using enzymatic and physical digestion methods. Microscopic imaging, CFU, and flow cytometry analyses demonstrated that the isolated and proliferating cells were mesenchymal stem cells. Substrates based on set hydrogels obtained as a result of decellularization of bovine femur bone were prepared for seeding of AM-MSCs. In order to understand the decellularization efficiency of the hydrogel, the presence of DNA, collagen content, and the amount of GAG were examined. The characterization of the set decellularized bone matrix (DBM) was determined by SEM and FTIR analyses. The biomineralization of DBM gels was carried out via processing in simulated body fluid (SBF; based on blood plasma) for 8 days. In the last step of the study, AM-MSCs were seeded on the sterilized substrates, and were evaluated using cell viability, SEM, ALP, and Ca^{2+} quantification analyses at designated time points (0, 7, 14, and 21 days). SEM findings revealed that the biocomposite constructs were suitable substrates for adherence of AM-MSCs. The results from the cell viability based on metabolic activity, ALP and Ca^{2+} analyses revealed that the cell viability rate on DBM was higher than that in SBF-treated DBM.

2022, 105 pages

Keywords: Placenta-derived mesenchymal stem cells, amniotic membrane, decellularized bone matrix, regenerative medicine, tissue engineering.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sürecinde benden desteğini esirgemeyen ve her konuda yönlendiren danışman hocam Prof. Dr. A. Eser ELÇİN'e,

Bilgi ve tecrübesi ile yol göstericim çok değerli bilim insanı Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e,

Çalışmalarındaki katkılarından dolayı Dr. Murat Taner VURAT'a,

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Elçin Laboratuvarı'nın tüm üyelerine,

Tez çalışmam konusunda yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Dilara ARAL'a

Eğitim hayatım boyunca beni destekleyen ve ilerlememi sağlayan annem Hayriye BAŞTUĞ, kardeşim Manolya BAŞTUĞ ve babam Mustafa BAŞTUĞ 'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TESEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. KÖK HÜCRELER VE KÖK HÜCRE TİPLERİ.....	3
2.1.1. EMBRİYONİK KÖK HÜCRE	3
2.1.2. İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK (İPS) HÜCRE	4
2.1.3. HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRE	4
2.1.4. YETİŞKİN KÖK HÜCRE	4
2.1.5. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE KAYNAKLARI	5
2.1.5.1. Placenta Mezenkimal Kök Hücreleri.....	5
2.2. PLASENTANIN GELİŞİMİ.....	6
2.3. PLASENTANIN KISIMLARI.....	7
2.3.1. FETAL YÜZEY	8
2.3.1.1. Amniyotik Zar (AZ) Kök Hücreleri	9
2.3.1.2. Amniyotik Epitel Hücreleri (AEH)	9
2.3.2. İNSAN KORYONİK MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİ (KMKH).....	10
2.3.3. İNSAN KORYONİK TROFOBlastİK HÜCRELER (KTKH).....	11
2.3.3.1. Amniyotik Sıvı (AS) Kök Hücreleri	11

2.3.4.	PLASENTANIN MATERNAL YÜZEYİ.....	13
2.3.4.1.	Desidual Bazalis Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler	13
2.3.5.	GÖBEK KORDONU (GK).....	15
2.4.	REJENERATİF TIP VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ.....	15
2.4.1.	REJENERATİF TIP TARİHİ.....	16
2.5.	REJENERATİF TIP (YENİLEYİCİ TIP) UYGULAMALARI	16
2.5.1.	REJENERATİF TIPTA (YENİLEYİCİ TIPTA) KÖK HÜCRELERİN KULLANIMI	16
2.6.	DOKU MÜHENDİSLİĞİ.....	17
2.6.1.	BİYOLOJİK KAYNAKLI BİYOMALZEMELER	17
2.6.2.	KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ	18
2.6.3.	KEMİK YAPISI	18
2.6.4.	KEMİK EKSTRASELÜLER MATRİKSİ (ECM)	19
2.6.5.	HİDROJELLER	20
2.6.6.	VÜCUT SIVILARI	21
2.6.7.	SENTETİK VÜCUT SIVILARI	21
2.6.8.	BİYOMALZEMELERİN ÖZELLİKLERİ	22
2.6.8.1.	Biyouyumluluk.....	22
2.6.8.2.	Biyobozunurluk.....	22
2.6.8.3.	Mekanik Özellikler.....	22
2.6.8.4.	İskele Tasarımı	23
3.	<u>GEREKÇE ve AMAC.....</u>	24
4.	<u>MATERYAL ve YÖNTEM.....</u>	25
4.1.	PLASENTANIN TEMİN EDİLMESİ	25
4.2.	PLASENTADAN KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE ÇOĞALTILMASI ...	25
4.2.1.	MATERNAL DOKUNUN DİSEKSİYONU (MD).....	25

4.2.2.	KORYONİK TABAKANIN (KT) DİSEKSİYONU	26
4.2.3.	KORYONİK VİLLUS (KV) DİSEKSİYONU	27
4.2.4.	AMNİYOTİK ZAR (AZ) DİSEKSİYONU	27
4.3.	MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İZOLASYONU	27
4.3.1.	P-MKH'LERİN ALT KÜLTÜR YAPILMASI	28
4.3.2.	PBS (FOSFAT TAMPONLU TUZ SOLÜSYONU) ÇÖZELTİSİ	28
4.3.3.	TRİPSİN-EDTA SOLÜSYONU VE FETAL SIĞIR SERUMU (FBS)	28
4.3.4.	TRİPAN MAVİSİ (TM)	28
4.3.5.	HÜCRELERİN DONDURULMASI	28
4.3.6.	MEM-A (MİNİMUM ESSENTİAL MEDIUM EAGLE) TAM VASAT BESİYERİNİN HAZIRLANMASI	29
4.3.7.	OSTEOJENİK FARKLILAŞTIRMA BESİYERİNİN HAZIRLANMASI..	29
4.3.8.	ADİPOJENİK FARKLILAŞTIRMA BESİYERİNİN HAZIRLANMASI ..	29
4.3.9.	KARDİYOJENİK FARKLILAŞTIRMA BESİYERİNİN HAZIRLANMASI.....	29
4.4.	PLASENTA MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KARAKTERİZASYONU	29
4.4.1.	MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLEME	29
4.4.2.	AZ-MKH'LERİN ÜÇLÜ-SOYA FARKLILAŞTIRMA ÇALIŞMALARI..	30
4.4.2.2.	Adipojenik Farklılaşma	30
4.4.3.	AZ-MKH'LERİNİN KOLONİ OLUŞTURABİLEN BİRİM ÇALIŞMASI	31
4.4.4.	AZ-MKH AKIM SİTOMETRİ-İMMÜN FENOTİPLEME ÇALIŞMALARI.....	31
4.4.5.	AZ-MKH'LERİNİN Katlanma SüresiNİN belirlenmesi	32
4.4.6.	HİSTOKİMYASAL BOYALAR.....	32
4.4.6.1.	Kristal Viyole Boyaması	32
4.4.6.2.	Alizarin Kırmızısı Boyaması.....	33
4.4.6.3.	Sudan Siyahı Boyaması.....	33

4.4.6.4.	Von Kossa Boyaması	33
4.4.6.5.	Hematoksilen Eozin Boyaması	34
4.5.	BİYOKOMPOZİTLERİN HAZIRLANMASI	34
4.5.1.	SİĞİR FEMUR KEMİĞİNDEN DOKU ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI.....	34
4.5.2.	KEMİK DOKUNUN DESELÜLERİZASYON VE DEMİNERALİZASYON İŞLEMİ	35
4.5.3.	DKM’NİN JELLEŞTİRİLMESİ	36
4.5.4.	DKM’NİN JELLEŞTİRİLMESİ VE LİYOFİLİZE EDİLMESİ	36
4.6.	SVS (SENTETİK VÜCUT SIVISI) HAZIRLANMASI	36
4.7.	DKM’NİN SVS İLE BİYOMİNERALİZASYONUNUN ARTTIRILMASI	38
4.8.	BİYOKOMPOZİT KARAKTERİZASYONU.....	38
4.8.1.	TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) GÖRÜNTÜLEME.....	38
4.8.2.	FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR)	38
4.8.3.	GAG (GLİKOZAMİNOGLİKAN) ANALİZİ.....	38
4.8.4.	DNA ANALİZİ	38
4.9.	HÜCRE- BİYOKOMPOZİT ETKİLEŞİMİ.....	39
4.9.1.	DENEY TASARIMI	39
4.9.2.	DKM İSKELESİNE AZ-MKH TOHUMLANMASI İÇİN YAPILAN HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARI.....	39
4.9.3.	DKM’NİN STERİLİZASYONU	40
4.9.4.	PLASENTA KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN DKM İSKELESİNE TOHUMLANMASI	40
4.9.5.	HÜCRE CANLILIĞI (ALAMAR MAVİSİ) ANALİZİ.....	40
4.9.6.	ALP MİKTARI TAYİNİ.....	41
4.9.7.	Ca ²⁺ MİKTARI TAYİNİ.....	42
5.	<u>ARASTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>44</u>

5.1. PLASENTA MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KARAKTERİZASYONU	44
5.1.1. PLASENTANIN KISIMLARININ GENEL GÖRÜNTÜSÜ	44
5.1.2. AZ-MKH ÜÇLÜ-SOYA FARKLILAŞMA (OSTEOJENİK, ADİPOJENİK KARDİYOJENİK) HİSTOKİMYASAL BOYAMALARI.....	45
5.1.3. COLONY FORMİNG UNİT (CFU) OLUŞUM GÖRÜNTÜSÜ	47
5.1.4. AKIM SİTOMETRİ-İMMÜN FENOTİPLEME ÇALIŞMALARI.....	48
5.1.5. KATLANMA SÜRESİ SONUÇLARI.....	49
5.1.6. AMNİYOTİK ZAR MKH BÜYÜME EĞRİSİ SONUÇLARI.....	50
5.2. KEMİK DOKUNUN HÜCRESİZLEŞTİRİLME VERİMLİLİĞİ	51
5.2.1. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) GÖRÜNTÜLERİ.....	51
5.2.2. GAG (GLİKOZAMİNOGLİKAN), DNA, KOLAJEN İÇERİĞİ SONUÇLARI.....	53
5.2.3. FOURİER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR) SONUÇLARI.....	53
5.3. HÜCRE- BİYOKOMPOZİT ETKİLEŞİMİ.....	54
5.3.1. HÜCRE CANLILIĞI (ALAMAR MAVİSİ) ANALİZİ SONUÇLARI	54
5.3.2. AZ-MKH'LERİNİN DKM ÜZERİNDEKİ SEM GÖRÜNTÜLEMELERİ (0G, 7G, 14G).....	55
5.3.3. ALP MİKTARI TAYİNİ.....	59
5.3.4. Ca ²⁺ MİKTARI TAYİNİ	60
<u>6. TARTISMA VE SONUC.....</u>	<u>61</u>
<u>EKLER.....</u>	<u>84</u>
<u>ÖZGEÇMİS.....</u>	<u>85</u>
<u>TEZDEN CIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>86</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Plasenta şematik gösterimi(48)	7
Şekil 2.2. Kök hücre farklılaşması, pluripotent kök hücreden başlar ve unipotent progenitör kök hücreye kadar devam eder. Fetal kök hücrelerin embriyonik kök hücreler ile yetişkin kök hücreler arasında yeni bir sınıf olduğu düşünülmektedir (50).....	8
Şekil 2.3. Rejeneratif tıp yaklaşımları, çözünebilir moleküllerin kullanımını, gen terapisini, kök hücre terapisini ve biyokompozitlerin kullanımını içerebilir (103).....	15
Şekil 2.4. Kemiğin yapısı(118).....	19
Şekil 4.1. Plasentanın maternal yüzeyinden doku parçalarının çıkarılması	26
Şekil 4.2. Plasentanın fetal yüzeyinin görünümü	26
Şekil 4.3. (A) Amniyotik zarın görünümü. (B) Amniyotik zarın çıkarılması	27
Şekil 4.4. Kristal viyole ile boyanan hücrelerin makroskopik görüntüsü	33
Şekil 4.5. Sığır femur kemiği.....	34
Şekil 4.6. Sığır femur kemiğinden ECM hidrojel elde edilmesi. (A)Süngerimsi kemik dokunun lipid ve minerallerinden arındırması için enzim ile inkübasyonu (B) Elde edilen DKM'nin liyofilizatörde kurutulması.....	35
Şekil 4.7. (A) Kurutulan kemik ECM'nin 12 kuyucuklu kültür kapları içerisindeki görüntüsü (B)ECM'nin yandan görünümü (C) ECM'nin üstten görünümü	36
Şekil 4.8. SVS hazırlanırken ısının muhafaza edilmesi için kurulan düzenek	37
Şekil 4.9. Hücre tohumlandıktan sonra DKM iskelesinin görüntüsü	40
Şekil 4.10. (A) Alamar ile inkübe edilen deney grubu (B) Alamar ile inkübasyondan sonra toplanan besiyeri.....	41
Şekil 4.11. ALP analizinin görüntüsü.....	41
Şekil 4.12. Ca ²⁺ miktar tayini görüntüsü	43
Şekil 5.1. AZ-MKH farklılaşması ışık mikroskobu görüntüleri.....	44
Şekil 5.2. AZ-MKH'lerin osteojenik farklılaşmasının Von Kossa boyaması ile gösterimi.45	
Şekil 5.3. AZ-MKH osteojenik farklılaşmasının Alizerin kırmızısı boyaması ile gösterimi.	45

Şekil 5.4. AZ-MKH'lerin adipojenik farklılaşma potansiyelinin sudan siyahı boyası ile gösterimi. Lipidler siyah renk iken çekirdekler kırmızı renk olarak görülmektedir.	46
Şekil 5.5. AZ-MKH'lerinin kardiyojenik farklılaşma potansiyeli hemotoksilen eozin boyası ile gösterildi. Kardiyomiyosit benzeri hücre formasyonları pembe renk olarak görülmekte.	46
Şekil 5.6. CFU oluşumunun mikroskopik görünümü.....	47
Şekil 5.7. AZ-MKH'lerin 100, 1000 ve 10000 hücre/cm ² yoğunlukta oluşturabildiği koloni sayısı	48
Şekil 5.8. AZ-MKH'lerin akım sitometri sonuçlarının toplu gösterimi.....	49
Şekil 5.9. AZ-MKH'lerin katlanma sürelerini gösteren grafik.	50
Şekil 5.10. AZ-MKH miktarının saatlik artışı.....	51
Şekil 5.11. Deselülerize ve demineralize kemik matriksinin SEM görüntüsü	52
Şekil 5.12. SVS ile inkübe edilmiş DKM'nin SEM görüntüsü	52
Şekil 5.13. DNA, GAG ve kolajen içeriğinin yüzde olarak grafiği.....	53
Şekil 5.14. DKM hidrojelinin FTIR spektrumu.	53
Şekil 5.15. Hücre tohumlanan deney grupları sol baştan sırasıyla, deselülerize kemik matriksi standart vasatta, SVS ile muamele edilmiş DKM standart vasatta, DKM osteojenik vasat ve SVS ile muamele edilmiş DKM osteojenik vasatta 0, 7, 14 ve 21. günlerde analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilir; (n=3)	54
Şekil 5.16. AZ-MKH tohumlanan DKM'nin standart vasat 1. gün SEM görüntüsü.....	55
Şekil 5.17. AZ-MKH tohumlanan DKM'nin standart vasat 7. günde SEM görüntüsü	55
Şekil 5.18. AZ-MKH tohumlanan DKM'nin osteojenik vasat 7. günde SEM görüntüsü ...	56
Şekil 5.19. AZ-MKH tohumlanan DKM'nin osteojenik vasat 14. günde SEM görüntüsü .	56
Şekil 5.20. AZ-MKH tohumlanan SVS-DKM'nin standart vasat 1. günde SEM görüntüsü	57
Şekil 5.21. AZ-MKH tohumlanan SVS-DKM'nin standart vasat 7. günde SEM görüntüsü	57

Şekil 5.22. AZ-MKH tohumlanan SVS-DKM'nin osteojenik vasat 7. günde SEM görüntüsü	58
Şekil 5.23. AZ-MKH tohumlanan SVS-DKM'nin osteojenik vasat 14. günde SEM görüntüsü	58
Şekil 5.24. Zamana bağlı ALP miktarı değişimi.	59
Şekil 5.25. Zamana bağlı Ca^{2+} miktarı değişimi.	60



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Plasentanın Bölümleri	7
Çizelge 2.2. Hidrojellerin sınıflandırılması	20
Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilecek örneklerin belirlenmesi.....	25
Çizelge 4.2. Akım sitometri analizi için seçilen mezenkimal ve hematopoetik kök hücre yüzey belirteçleri listelenmiştir	31
Çizelge 4.3. SVS ve insan kan plazmasındaki iyon konsantrasyonu (mM)	37
Çizelge 4.4. SVS içerisine kimyasalların eklenme sırası	37
Çizelge 4.5. Hücre tohumlanan DKM iskelesinin standart vasat ve osteojenik vasat ile incelenmesi	39
Çizelge 4.6. ALP miktar tayini kitinin içeriği	42
Çizelge 4.7. Standartların seyreltme oranları	42
Çizelge 5.1. AZ-MKH'lerinin oluşturdukları koloni sayıları	47
Çizelge 5.2. AZ-MKH akım sitometri çalışmasının sonuçları	48
Çizelge 5.3. Pasaj sayısına göre AZ-MKH'lerinin katlanma süresi.....	49
Çizelge 5.4. Saatlik olarak AZ-MKH'lerinin artış miktarı.....	50
Çizelge 5.5. Dört deney grubu için hücre canlılığı sonuçları	54
Çizelge 5.6. Deney gruplarının 0, 7, 14 ve 21. Günlerdeki ALP miktarı.....	59
Çizelge 5.7. Belirlenen zaman noktalarında Ca^{2+} miktarları	60

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
°C	Santigrat derece
AE-MKH	Amniyotik Epitel Mezenkimal Kök Hücre
AMKH	Amniyotik Mezenkimal Kök Hücre
AS	Amniyotik Sıvı
ASKH	Amniyotik Sıvı Kök Hücreler
AZ-MKH	Amniyotik Zar Mezenkimal Kök Hücreler
CD	Yüzey Farklılaşma Antijenleri (Cluster of Differentiation)
c-Met	Tirozin-protein Kinaz (Tyrosine-protein Kinase)
DKM	Deselülerize Kemik Matriksi
DMKH	Desidual Mezenkimal Kök Hücre
ECM	Ekstraselüler Matriks (Extracellular Matrix)
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
EVST	Ekstravillöz Sitotrofoblastlar
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor)
GAG	Glikoz Amino Glikan

GK	Göbek Kordonu
GKK	Göbek Kordon Kanı
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü (Hepatocyte Growth Factor)
HLA	İnsan Lökosit Antijenleri (Human Leukocyte Antigen)
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (Insulin-like Growth Factor)
IGFBP	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein
KMKH	Koryonik Mezenkimal Kök Hücre
Kİ-MKH	Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreleri
KV-MKH	Koryonik Villus Mezenkimal Kök Hücre
KVKH	Koryonik Villus Kök Hücreler
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi (Major Histocompatibility Complex)
MKH	Mezenkimal Kök Hücreler
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
MIF	Makrofaj Migrasyon İnhibe Faktör
P-MKH	Plasenta Mezenkimal Kök Hücre
S-DKM	SVS ile İnkübe Edilmiş Deselülerize Kemik Matrisi

1. GİRİŞ

Memeli canlıların organ veya dokularında meydana gelen herhangi bir hastalıkta; fonksiyon kaybında ya da travmatik durumlarda kendisini yenileyebilme potansiyelleri sınırlıdır. Son yıllarda doku veya organ hasarlarının tedavi edilebilmesi için rejeneratif tıp, doku mühendisliği ve kök hücre gibi yeni alanlar birleştirilerek çalışmalara başlanmıştır. Bilindiği gibi kök hücreler kendisini yenileyebilme potansiyeline sahip olan ve özel koşullarda spesifik hücre tiplerine farklılaşabilen hücrelerdir. Tedavi amaçlı çalışılacak kök hücreler yetişkin kök hücreler olarak karşımıza çıkmaktadır. Yetişkin kök hücre tanımında olan mezenkimal kök hücreler (MKH) hasarlı dokulara göç edebilmekte, kendisini yenileyebilmekte ve doğal iyileşme sürecini tetikleyebilmektedir.

Mezenkimal kök hücreler adipoz doku, kemik iliği, plasenta, amniyotik zar, amniyotik sıvı gibi birçok farklı kaynaktan izole edilebilmektedir. Tedavi amaçlı kök hücre kaynağı olarak uzun yıllar kemik iliği mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır. Kİ-MKH'lerin kullanımından kaynaklanan dezavantajlar, farklı dokulardan elde edilen kök hücrelere yönelinerek giderilmeye çalışılmıştır. Tabii ki elde edilme kaynağına bağlı olarak mezenkimal kök hücre özelliklerinde bazı küçük farklılıklar olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda plasentadan elde edilen MKH'ler karşımıza çıkmaktadır. Plasenta, anne ile fetüs arasında besin, gaz ve atık alışverişini düzenleyen bir yüzü anneye dönük (maternal) bir yüzü fetüse dönük (fetal) olan geçici bir organdır. Doğum sırasında vücuttan atılan plasenta ile ilgili çalışmalarda canlılara zarar verilmediği için gerekli izinler alınmak suretiyle etik problemlerle karşılaşılmemaktadır. Plasenta başlıca iki bölüme ayrılmaktadır. Birinci bölüm endometriyuma gömülü olan maternal yüzey ve ikinci bölüm ise fetüs ile plasentayı bağlayan ve göbek kordonunun da bulunduğu fetal yüzeydir. Son yıllarda, plasenta hücrelerinden elde edilen MKH'ler doku mühendisliği ve rejeneratif tıp kapsamında artan düzeyde ilgi görmeye başlamıştır.

Doku mühendisliği, kaybedilen ya da hasarlı doku ya da organların görevlerini üstlenecek yeni doku veya organ benzeri yapıların oluşturulması temeline dayanır. Kemik, kırık, deri gibi dokuların yenilenmesini ya da hasarlarının onarılmasını hedeflemektedir. Kemik belirli sınırlar içinde kendisini yenileyebilen dinamik bir dokudur. Vücutta öne çıkan ilk görevi mekanik destek sağlamaktır. Ancak komplikasyonlar büyük boyutlara ulaştığında kemiğin kendisini yenileyebilme potansiyeli yetersiz kalmaktadır. Kemik doku mühendisliği ise bu aşamada devreye girmektedir. Kemikte meydana gelebilecek herhangi bir bozuklukta

kullanılmak üzere çok çeşitli sentetik veya doğal biyomalzemeler geliştirilmektedir. Bu çalışmada, biyolojik dokuların hücrelerinden arındırılması temeline dayalı deselülerizasyon yöntemi ile biyoaktif bileşimi korunmuş deselülerize kemik matriksine dayalı biyokompozit substratlar hazırlanmış ve plasenta kökenli amniyotik zar MKH'leri ile etkileşimleri ele alınmıştır. Kemik hasar veya kayıplarında kullanım potansiyeli bulunan bu tür yeni hücre-substrat etkileşimlerinin incelenmesi rejeneratif tıp açısından önem taşımaktadır.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. KÖK HÜCRELER VE KÖK HÜCRE TİPLERİ

Kök hücreler, kendisini yenileyebilen ve çeşitli özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen hücrelerdir. Kök hücrelerin bir kısmı özelleşmiş belirli bir hücre tipine farklılaşırken bir kısmı da başlangıçta sergiledikleri karakteristik özelliklerini sürdürürler. Kökenlerine göre kök hücreler genel olarak Yetişkin kök hücre ve Embriyonik kök hücre olarak iki tipe ayrılır.

Kök hücreler, çeşitli yaralanma veya hastalıktan sonra yenileyici tıp ve doku rejenerasyonu için potansiyel kaynak olarak kabul edilirler. Bu kapasitenin yanı sıra kök hücreler, insan hastalıklarını tedavi etmek için terapötik potansiyele de sahiptirler.

Kök hücreler, adipoz doku, plasenta, göbek kordonu, kemik iliği gibi birçok doku ya da organda bulunmaktadır (1–5). Kök hücreler yeni doku ve hücreleri oluşturabilme potansiyelleri açısından totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır (6–9). Farklılaşma potansiyeli açısından, EKH'ler pluripotent ve yetişkin kök hücreler multipotent karakterlidir. Bu özelliklerinden rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinde faydalanılmaktadır.

2.1.1. EMBRİYONİK KÖK HÜCRE

Organizmayı meydana getiren tüm hücreler zigotun sahip olduğu embriyonik kök hücrelerden kaynaklanmaktadır (10,11). Embriyonik kök hücreler, totipotent karakter sergileyen ve embriyonik gelişmeler aşamalarından gastrulasyon sırasında oluşan blastosistin iç hücre kitlesinden meydana gelmektedir. Embriyonik kök hücrelerin aldığı bölünme sinyalleri hücrelerel farklılaşmanın başlamasıyla birlikte azalmaktadır. Kendisini sınırsız yenileyebilme potansiyelleri hücre farklılaşması sırasında kaybolmaktadır. Bölünme ve farklılaşma sinyalleri hücrelere genler tarafından iletilmektedir. Bu sinyaller sayesinde EKH'ler yeni dokuların oluşturabilmekte ve üç embriyonik germ katmanına (ektoderm, endoderm ve mezoderm) farklılaşabilmektedir (6). EKH'ler, embriyonik (iç hücre kitlesi) ve ekstra-embriyonik dokuların (amniyon kesesi ve plasenta) oluşturulmasından da sorumludur (12).

Farklılaşan ve özelleşmiş hücre haline gelen EKH'ler ise, yetişkinlikte vücudun çeşitli bölgelerine dağılmaktadır. Bu hücreler genellikle aktif rol oynamamalarına karşın ihtiyaç duyulması halinde hem farklılaşabilmekte hem de kendisini yenileyebilmektedir (13–15).

2.1.2. İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK (İPS) HÜCRE

Son yıllarda adını EKH'lerinin alternatifi olarak duyuran indüklenmiş pluripotent kök hücre (İPS) hücreleri, farklılaşması gerçekleşmiş yani yetişkin hücrelerin tekrar embriyonik kök hücrelere farklılaşması için programlanmasına dayanmaktadır (16). Hücrelerin yeniden programlanmasının tüm mekanizmaları hala tamamen aydınlatılamamıştır (17). Ancak Oct3/4, Sox2, c-Myc ve Klf4 gibi embriyonik kök hücre transkripsiyon faktörlerinin programlamada etkisi olduğu Takahashi ve ekibi tarafından gösterilmiştir. İPS olarak isimlendirilen bu hücrelerin embriyonik kök hücre belirteçlerini ifade ettiği aynı zamanda da benzer davranışlar sergilediği görülmüştür. Son yıllarda, araştırmacılar tarafından bu farklılaşma faktörleri ile ilgili yapılan çalışmalarda Takahashi faktörleri yerine başka faktörlerde kullanılmaktadır (18,19).

2.1.3. HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRE

Hematopoietik kök hücreler (HKH), vücutta yeni kan hücrelerinin oluşumundan sorumlu olan hücre gruplarıdır. Kırmızı kan hücreleri, pıhtılaşma faktörleri, megakaryositler, bağışıklık sistemi hücreleri HKH'lerden türevlenmektedir. Embriyodaki hematopoez, aort-gonad-mezonefroz bölgesinde oluşmaya başlayarak daha sonrasında fetal karaciğere geçmektedir. Hematopoez fetal karaciğerden sonra, organizmanın kemik iliğinde meydana gelmektedir (20).

2.1.4. YETİŞKİN KÖK HÜCRE

Yetişkin kök hücreleri de kendisini yenileyebilme ve sınırlı da olsa farklılaşma potansiyeline sahiptir. Ancak bazı çalışmalar yetişkin kök hücrelerinin de farklı hücre tiplerine farklılaşabildiğini göstermiştir. Örneğin, nöral kök hücreler kan ve kas dokusu oluşturabilmektedir. Deri kök hücrelerinin de nöron, glia, düz kas ve adipositlere farklılaşabildiği görülmektedir (21,22).

En çok çalışan kök hücreler, mezenkimal özellik gösterebilen hücrelerdir. Hem izolasyonlarının kolay olması hem de kültür koşullarında birçok farklı soya farklılaşabilmeleri bu hücreleri klinik çalışmalarda kullanışlı hale getirmiştir (23–25).

2.1.5. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE KAYNAKLARI

MKH'ler “Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (International Society for Cellular Therapy)” tarafından önerilen, standart olarak 3 özellik ile karakterizedir (26). Bunlar;

1. Adipojenik, kondrojenik, osteojenik, nörojenik ve kardiyojenik farklılaşabilmesi (27)
2. CD73+, CD90+, CD105+, CD34-, CD11b-, CD45- yüzey belirteçlerine sahip olması
3. Hematopoietik kök hücrelerden farklı olarak plastik hücre kültür kaplarına tutunma ve koloni oluşturabilmesidir (28).

MKH'ler, kemik iliği, adipoz doku, kas doku ve periferik kan birçok farklı kaynak kullanılarak izole edilebilmektedir. Bu kaynakların bazılarında elde edilen MKH'lerin izolasyonu ve çoğaltılarak elde edilen miktarları klinik uygulamaları için yeterli gelmemektedir. Bu yüzden alternatif mezenkimal kök hücre kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Göbek kordonu kanı (GBK), göbek kordu (GK), plasenta, amniyotik sıvı (AS), amniyotik zar gibi kaynaklar araştırmacılar tarafından ilgi odağı olmuştur. Farklı kaynaklardan gelen MKH'ler spesifik in vitro koşullar altında kültürlendiğinde kemik, kıkırdak, yağ, kas, sinir ve karaciğerin de dahil olduğu farklı soylara farklılaşma potansiyellerini koruyabildikleri bulunmuştur (29–35). Böylece çeşitli kaynaklardan elde edilen MKH potansiyelleri araştırılmaktadır.

2.1.5.1. Plasenta Mezenkimal Kök Hücreleri

Plasenta dokusu günümüzde doğumdan sonra atık halini almaktadır ve bu kaynağın yıllardır değerlendirilmemesi bir kayıp olarak görülmektedir. Plasental dokulardan elde edilen birçok kök hücre vardır ve bunların çoğu mezodermal kökenlidir. Amniyon mezenkimal kök hücreler (AMKH), koryon mezenkimal kök hücreler (KMKH), koryonik villi mezenkimal kök hücreler (KV-MKH) ve desidua mezenkimal kök hücreler (DMKH) olarak sınıflandırılmaktadır (36). Plasenta mezenkimal kök hücreleri “Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (International Society for Cellular Therapy)” tarafından önerilen mezenkimal kök

hücrelerin sahip olması gereken 3 önemli özelliğe de sahiptir (37). Placenta mezenkimal kök hücreleri (P-MKH) mezenkimal kök hücre yüzey belirteçlerine sahiptir, kültür kabı yüzeyine yapışabilir, adipojenik, kondrojenik ve osteojenik dokulara farklılaşma potansiyeline de sahiptir (35). P-MKH, kemik, yağ, kıkırdak, kas ve endotele de farklılaşabilmektedir (38).

2.2. PLASANTANIN GELİŞİMİ

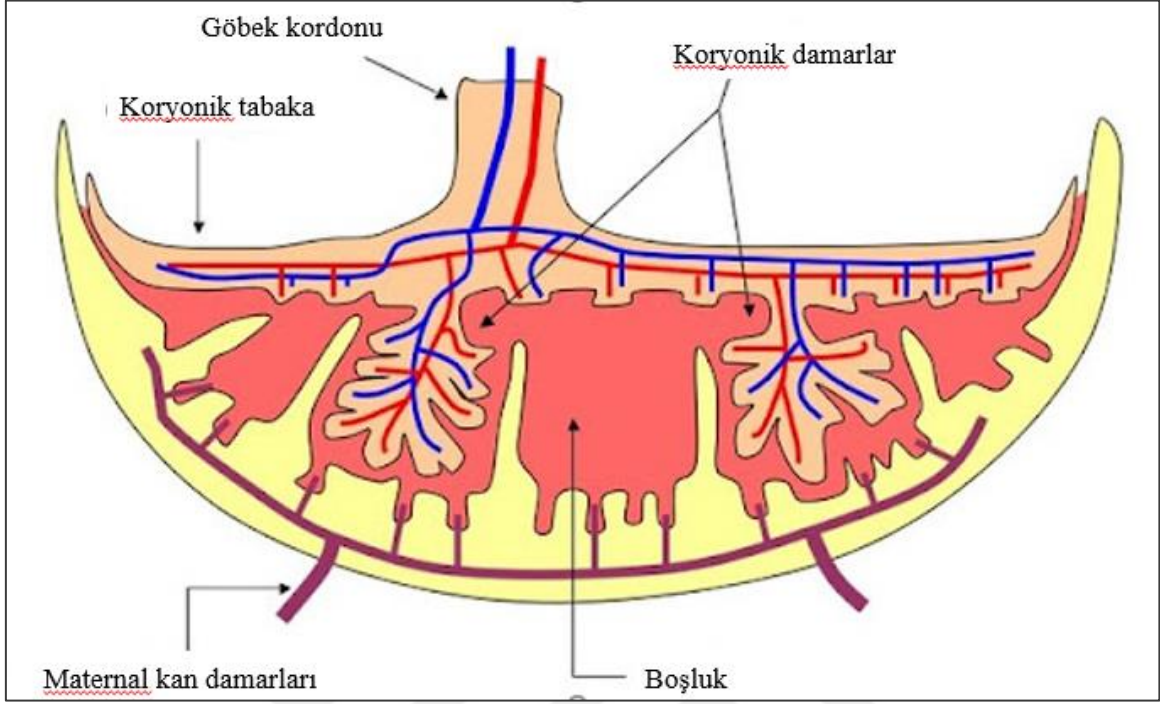
Placenta, maternal ve fetal organizmanın kendi aralarında beslenme, gaz ve hormon alışverişine izin veren, annenin endokrin, immün ve metabolik fonksiyonlarını embriyonun avantajına olacak şekilde yönlendiren geçici bir organdır. Placenta gelişimi, gastrulasyondan önce, erken embriyolojik süreçte başlamaktadır. Memelilerde embriyonik gelişimin sağlanması için blastosistin maternal organizmaya implantasyonu gerekmektedir. Bu implantasyon sonucu placenta oluşmaktadır (39).

Döllenmeden yaklaşık beş gün sonra morula rahme ulaşır. Bu aşamada morula yerini blastosite (trofoblast hücreleri, blastosöl ve iç hücre kitlesi) bırakır. Blastosite pluripotent potansiyele sahiptir. Blastositin yüzeye yakın olan hücreleri placenta ve göbek kordonu dahil olmak üzere ekstraembriyonik yapıları meydana getirmek için trofoblast haline gelmektedir. İç hücre kitlesi (embriyoblast), endometriyuma implantasyondan hemen önce ya bir üst katmana (epiblast ve hipoblast) ya da bir alt katmana (ilkel endoderm) farklılaşmak için hücresel değişiklikler geçirmektedir. Böylece iç hücre kitlesinden embriyonik kök hücreler gelişmektedir (40–42).

Blastositin trofoblast hücreleri 2 tip hücreyi oluşturmaktadır. Bunlardan ilki sinsitroblast hücreleridir. Bu hücreler uterin duvarını işgal ederek yapay bir organ gibi burada büyümeye başlamaktadır. İnsan plasentası ise epitel kök hücre olan sitotrofoblastların farklılaşması ile oluşmaktadır. Sitotrofoblastlar tümör hücreleri gibi yayılma politikası izleyerek uterusu istila etmektedirler. Uterusa yeteri kadar gömülen sitotrofoblastlar, işgal etme politikalarını durdurmaktadırlar. Bu süreçte sitotrofoblastlar aşamalar halinde farklılaşmaya başlamaktadır (43).

Farklılaşan hücreler endovasküler invazyonun bir sonucu olarak plasentaya maternal kan akışını başlatmak ve damar çapını büyük ölçüde genişletmek üzere uterus arteriyollerinin endotel ve kas astarlarının yerini almaktadır (44,45). Trofoblastlar kan damarlarını oluşturmak için akın ettiklerinde, kan akışı anneden bebeğe doğru kolay bir şekilde gerçekleşmektedir. Zamanla büyümesini sürdüren plasantanın fonksiyonu her zaman ağırlığı

ile doğru orantılı olmamaktadır. Plasentanın histomorfolojisi eninde sonunda dengeye ulaşmaktadır (46,47). Plasentanın olgunlaşmış (full-term) yapısı (Şekil 2.1.) gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Placenta şematik gösterimi (48)

2.3. PLASENTANIN KISIMLARI

Plasenta yapısı gereği hem maternal organizmayla hem de fetüsle bağlantı kurmaktadır. Böylece plasentanın iki farklı yüzeyi oluşmaktadır. Bu yüzeyleri kendi içerisinde kategorize etmek de mümkün olmaktadır. Plasenta başlıca şu kısımlara (Çizelge 2.1.) ayrılabilir:

Çizelge 2.1. Plasentanın Bölümleri

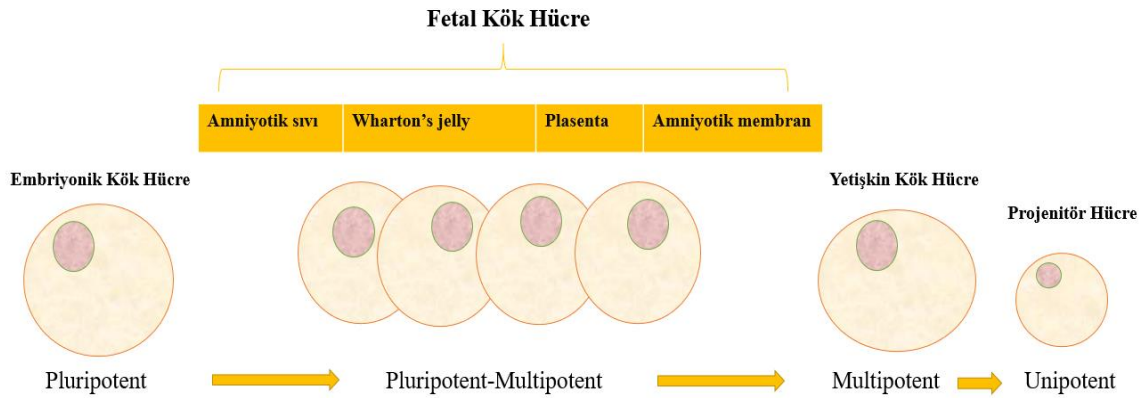
Fetal Yüzey	Maternal Yüzey
Koryonik Bölüm	Desidual Bölüm
Amniyotik Bölüm	

2.3.1. FETAL YÜZEY

Fetal yüzey başlıca amniyon ve koryon olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır. Amniyon, koryona bağlı olup ince ve elastik yapıya sahip olan cenin zarıdır. Amniyotik tabaka kendi içerisinde 3 kısımdan oluşur;

1. Epitel hücrelerin kapladığı epitelyal tek tabaka
2. Aselüler ara katman
3. MKH açısından zengin olan ve koryona yakın yerleşmiş tabakadır (49).

Koryon ise dış katmanda yer almaktadır. Ayrıca trofoblastik, koryonik ve mezenkimal dokuları da içermektedir. Koryon ve amniyon katmanları gebeliğin ilk trimesteri boyunca ayrı iki doku halinde bulunmaktadır. İkinci trimesterde ise birbirine kaynaşmaktadırlar. Bu iki katmanın arasında ise zona spongiosa tabakası bulunmaktadır. Amniyon ve koryon birlikte içi amniyotik sıvı ile dolu olan amniyon kesesini oluşturarak ve fetal ortamın korunmasını sağlamaktadır (50).



Şekil 2.2. Kök hücre farklılaşması, pluripotent kök hücreden başlar ve unipotent progenitör kök hücreye kadar devam eder. Fetal kök hücrelerin embriyonik kök hücreler ile yetişkin kök hücreler arasında yeni bir sınıf olduğu düşünülmektedir (50)

Farklı çalışma grupları amniyondan ve koryondan kök hücre izole edilebildiğini göstermiştir. İn vitro koşullar altında ise AMKH'lerinin her 3 germ tabakasından olan hücrelere (Şekil 2.2.) farklılaşabildiği görülmüştür (51).

Başlıca fetal yüzey kök hücre grupları;

1. İnsan amniyon mezenkimal kök hücreleri (AMKH) (52)

2. Amniyotik zar mezenkimal kök hücreleri (53)
3. İnsan amniyotik epitel hücreleri (AEH) (54)
4. İnsan koryonik mezenkimal kök hücreleri (KMKH) (31)
5. İnsan koryonik trofoblastik hücreler (KTKH) (55)

2.3.1.1. Amniyotik Zar (AZ) Kök Hücreleri

Amniyotik zar, fetal zarın iç tabakasının büyük kısmını meydana getirmektedir ve herhangi bir vasküler dokusu bulunmamaktadır. AZ, embriyonik epiblast hücrelerinden türevlenir ve AZ kök hücreleri fiziksel ve enzimatik sindirim yoluyla elde edilmektedir (56).

Amniyotik zar kök hücreleri (AZKH) başlıca, amniyotik epitel hücreleri (AEH) ve amniyotik zar mezenkimal kök hücreleri (AZ-MKH) olmak üzere iki tip kök hücre içermektedir. Her iki kök hücre tipinin de ortaya çıkması embriyonun pregastrulasyon aşamasına denk gelir. Her üç germ tabakasından da köken almalarına rağmen çoğunlukla epitelial oldukları görülmektedir. AMKH'ler kalın bir bazal zar (kolajen ve laminden) altına yerleşmiştir. Bu bazal laminada kolajen I, kolajen III ve fibronektin bulunmaktadır. AZ'da mezenkimal kök hücre ve nadiren makrofajlar görülmektedir. AMKH'ler, yağ dokusu, kemik ve kıkırdak gibi mezenkimal soylara farklılaşabilmektedir ve anjiyojenik potansiyelleri bulunmaktadır (51,57,58).

2.3.1.2. Amniyotik Epitel Hücreleri (AEH)

İnsan amniyotik epitel hücreleri (AEH), döllenmenin sekizinci gününde amniyoblasttan oluşmaktadır ve amniyonun iç tabakasında yer almaktadır. Amniyotik epitel (AE) hücreleri amniyotik sıvıyla temas halinde bulunan ve kübik şeklindeki epitel hücrelerdir. AE'ler amniyotik mezoderm ile bağlantı kurabileceği bir bazal laminaya bağlanmaktadır.

AEH'lerin salgıladığı faktörlerin doğuştan ve adaptif bağışıklık sistemleri üzerinde etkili olduğu literatürde gösterilmiştir. Yapılan mRNA analizleri, AEH'lerin makrofaj göçünü inhibe ettiğini ve MIF ürettiğini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle, insan AEH'leri hücrel tedaviler için değerli bir kaynak olabilir (59–61). AEH'lerin glial ve nöronal kök hücrelere farklılaşarak asetilkolinin, katekolaminler, sinir büyüme faktörü ve nörotrofin-3 ifade ettiği gösterilmiştir. Ayrıca AEH'lerin hepatojenik farklılaşması sonrasında üre salgılamaya başladığı gözlemlenmiştir. Böylece farklılaşmış hücreler, çeşitli enzimlerin ve spesifik

mitokondriyal amino asit taşıyıcılarının ifade ederek karaciğere özgü bir işlevi gerçekleştirilmiştir (61,62).

Koryonik ve amniyotik kök hücreler mezenkimal belirteçler (CD105, CD73, CD90, CD29) için pozitif iken hematopoietik belirteçler (CD14, CD34 ve CD45) için negatiftirler (63). Bazı AKH'lerin ise pluripotent kök hücre belirteçlerini ifade ettiği gösterilmiştir. Ayrıca MHC sınıf I antijenlerinin çok düşük ifade edilirken MHC sınıf II antijenlerini ifade etmemektedir. Böylece hücreler immünomodülatör özellik kazanmaktadırlar (30,64,65).

2.3.2. İNSAN KORYONİK MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİ (KMKH'LER)

Gebeliğin üçüncü üç aylık döneminde (üçüncü trimester) plasenta oluşmaktadır. Bu aşamada gelişen yapılar; koryonik villus, koryonik plaka, amniyon ve maternal yüzey olmaktadır. En erken elde edilebilecek fetal materyal, hamileliğin ilk üç ayında oluşan koryonik villus türevi hücreler (KVKH) olmaktadır (66,67).

Koryonik mezenkimal hücreler (KMH'ler) hamilelik sırasında koryonik villuslardan (koryonik villus kök hücreler -KVKH) (66,68) ya da plasentadan (69) izole edilmiştir. Koryonik villus türevli kök hücreler ve plasenta kök hücreleri terimleri birbirinin yerine kullanılabilir. Çünkü her ikisinin de immünofenotipi benzerlik taşımaktadır. Örneğin ikisi de mezenkimal belirteçler (CD73, CD90, CD10) için pozitif ve önemli bazı pluripotens belirteçleri (OCT4, SOX2, SSEA4, REX-1, GATA-4) için de pozitif olduğu görülmektedir. Ekspresyon seviyesinin ise kemik iliğinden türetilen MKH'lere yakın olduğu görülmüştür. MHC sınıf I antijenlerinin çok düşük ifade ettikleri için ve MHC sınıf II'yi ifade etmedikleri için bu hücreler de immünomodülatör etkiye sahiptir (30,63,64,66,68).

Koryonik villuslardan elde edilen KMKH'lerin in vitro deneylerde adipojenik, kondrojenik, osteojenik ve nöral farklılaşma potansiyeli yüksektir (47,70,71). Arakawa ve grubunun yaptığı çalışmada ise KVKH'ların in vitro koşullar altında iskelet kası hücrelerine farklılaşabildiği gösterilmiştir. KVKH'lar etkin bir şekilde distrofin pozitif miyotüpler oluşturmuştur (72).

Sonuç olarak ise amniyon ve koryon türevi mezenkimal hücrelerinin birbirine benzediği görülmektedir. KVKH'lerinin diğer kök hücrelere göre en önemli avantajı yüksek bir miyogenik potansiyele sahip olmasıdır. Diğer bir önemli avantaj ise fetal hücrelerin teratom oluşturmaması ve diğer hücre popülasyonlarından daha az immünojenik reaksiyon oluşturmamasıdır. Böylece nakiller için uygun adaylar haline gelebilirler (62,73).

2.3.3. İNSAN KORYONİK TROFOBLASTİK HÜCRELER (KTKH'LER)

Plasentasının ilk fetal hücresi, villöz ve ekstrasvillöz trofoblastlarını oluşturmak için, ortaya çıkan sitotrofoblastlardır. Sitotrofoblastlar çok aşamalı bir farklılaşma meydana getirmektedirler. Placenta trofoblast hücreleri farklılaşırken iki yol izlemektedir. Bu yollardan ilki implantasyon yapan ekstrasvillöz sitotrofoblastlar hücreleridir. İkincisi ise çok çekirdekli villöz sitotrofoblastlar hücreleridir (40,74).

Villöz trofoblastlar, koryonik villusları kaplayarak, maternal ve fetal organizma arasındaki gaz ve besin alışverişinin gerçekleşmesini sağlar. Ekstrasvillöz trofoblastlar ise uterus duvarının derinliklerine (miyometriuma kadar) yayılırlar ve doğrudan uterus koryonik villusların sabitlenmesiyle ilişkilendirilmektedirler. Ayrıca ekstrasvillöz trofoblastlar, annenin yeni hücreleri reddetmesinin önlemek için HLA-G gibi spesifik HLA antijenlerini ifade etmektedir (75,76).

2.3.3.1. Amniyotik Sıvı (AS) Kök Hücreleri

Amniyotik sıvı, embriyogeneizde gerekli besinlerin tedarik edilmesi ve desteklenmesi için koruyucu bir yapı olarak görev almaktadır. Prenatal tanı için uzmanların sıkça başvurduğu yöntemlerin başında amniyosentez gelir. Amniyotik sıvıda yer alan kök hücreler (ASKH) üç germ tabakasından türevlenen heterojen bir gruba aittir. Bu hücreler epitel kökenlidir ve kaynaklarını gelişen embriyodan ya da amniyotik zarın iç yüzeyinden alırlar. ASKH'leri morfolojileri, büyümeleri ve biyokimyasal karakterlerine göre 3 gruba ayrılır. Amniyotik sıvının kaynağıyla ilgili gerçekler belirsizliğini korumaktadır. Amniyotik sıvının kaynağı ise hem insan amniyotik epitel hücreleri (iAEH) hem de trofoblastlar olabilmektedir (77).

AS'den izole edilen kök hücre popülasyonlarının iki alt popülasyon oluşturduğuna dair yapılan çalışmalar vardır. Bu hücreleri morfolojilerine göre yuvarlak şekilli (RS) AS - MKH'ler ve düz SS - AS - MKH'ler olarak gösterilmiştir. RS - AS - MKH'lere kıyasla CD90'ı daha yüksek ifade edebildiği, proliferasyonunun daha fazla olduğu ve farklılaşma potansiyelinin fazla olduğu gösterilmiştir. Proteomik analizin kullanılmasıyla, iki popülasyon arasında farklı şekilde ifade edilen 25 protein olduğu gösterilmiştir. Bu farklı ifade edilen proteinler iki hücre tipinin çoğalma, göç ve farklılaşma özelliklerindeki neden farklılık gösterdiğini açıklayabilir. SS - AS - MKH'ler ve RS - AS - MKH'ler arasında vimentin, galectin, gelsolin ve prohibitin gibi proteinler farklı şekilde ifade edilmektedir. Ancak bu proteinlerin hiçbiri MKH'lerde yüksek oranda ifade edilmemektedir (78).

MKH'leri AS'den izole ederken dikkat edilmesi gereken bazı parametreler şu şekildedir;

1. Nakledilen kök hücrelerin hasarlı dokulara başarılı bir şekilde göç edebilmeli ve onarım sağlayabilmelidir,
2. Hücrelerin göçünü düzenleyen ve hasarlı dokuyu onarmasını sağlayan bazı molekülleri ifade etmeleri gerekmektedir. Bu moleküller arasında,
 - a. Hücre göçü için kilit moleküllerden olan VLA-5 integrini [$\alpha 5$ (CD49e) ve $\beta 1$ (CD29)]
 - b. Adhezyon molekülü olan CD44'ün ifadesi bulunmaktadır (78).

Amniyotik sıvıda bulunan hücrelerinin çoğunluğu kültür koşullarında kültür kabı yüzeyine yapışma ve çoğalma davranışı sergilemez. Amniyotik sıvıdaki canlı hücre popülasyonları şu şekilde gruplandırılabilir;

1. Rutin kültür koşullarında bağlanan hücreler
 - a. Bölünen, koloni oluşturan hücreler
 - b. Rutin olarak kullanıldığında çoğalmayan hücreler
2. Rutin kültür koşullarında bağlanmayan hücreler

Amniyotik sıvıda bulunan canlı hücre popülasyonlarından 1a ve 1b gruplarıyla ilgili yeterli araştırma hala yoktur. Bu hücre gruplarının araştırılması ve fetal anomali ile ilişkisi olup olmadığına bakılması gerekmektedir (79).

Amniyotik sıvı içerisinde bulunan, bağlanan ve koloni oluşturabilen kök hücreler 3 ana gruba ayrılmıştır;

1. Epiteloid E-tipi hücreler
2. Amniyotik sıvıya özgü olan AF-tipi hücreler
3. Fibroblastik yapıya sahip F-tipi hücreler

AF tipi ve E-tipi hücreler amniyotik sıvı kültürlerinin ilk aşamasında görülmektedir. Ancak kültür devam ederken bu hücre tiplerinin sayısı önemli oranda düşmektedir. F tipi hücreler her amniyosentezden elde edilememektedir. Genellikle geç ortaya çıkmaktadırlar (79).

Amniyotik sıvıda yer alan;

1. E-tipi hücreler fetal deri ve idrardan,
2. AS-tipi hücreler fetal zarlardan ve trofoblastlardan,
3. F tipi hücreler ise fibröz bağ dokusu ve dermal fibroblastlardan türevlendiği düşünülmektedir (80–82).

AS tipi hücreler ise östrojen üretebilmekte iken F-tipi hücreler hormon üretmez. Bu yüzden AS-tipi hücrelerin trofoblasttan kaynaklandığı düşünülürken F-tipi hücrelerin mezenkimal dokudan köken aldığı kabul gören bir görüştür. Ayrıca her iki hücre tipide HLA Sınıf I (HLA ABC) yüzey antijenlerini ifade edebilir ancak HLA Sınıf II (HLA-DR) yüzey antijenlerini ifade edemez. Hem AS- hem F-tipi hücreler fibroblastik görüntü oluşturabilmektedir ancak baskın bulunanın AS-tipi hücre olduğu görülmektedir. AS tipi hücreler keratin ve vimentini beraber ifade etmektedirler (56,83).

Nadri ve grubunun yaptığı çalışmada ise AS -MKH'ler kolayca izole edildiği ve uygun kültür koşulları altında kemik iliği-MKH'lerine kıyasla daha hızlı büyüdüğü gösterilmiştir. Buna ek olarak Sun ve grubunun yaptığı çalışmada ise, iskele üzerine tohumlanan ve osteojenik indükleyici ortama maruz bırakılan AS-MKH'lerinin, in vivo implantasyonundan sonra kemik oluşturabildikleri ve pre-klinik çalışmalar için değerli bir kaynak olabileceği gösterilmiştir (84,85).

2.3.4. PLASENTANIN MATERNAL YÜZEYİ

2.3.4.1. Desidual Bazalis Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler

Desidual kök hücreler (DKH), hamilelik sırasında, genellikle blastosistin implantasyonundan sonra ortaya çıkan bir hücre sınıfıdır (86). Progesterona yanıt olarak endometrial kök fibroblastlar farklılaşmaya başlar (desidualizasyon) ve periarteriolar bölgede subepitelyal olarak başlar. Memeli canlılarda trofoblastlar maternal dokuyu işgal etmeye başladıktan sonra endometriyal kök hücreler tarafından desidua oluşturulmaktadır.

Kadınlarda menstrüel siklusun orta-geç sekretuar fazında endometriyal stromal hücreler desidual hücrelere farklılaşmaktadır. Maternal-fetal arayüzün maternal bileşeni olan desidual doku, stromal hücrelerden, glandüler hücrelerden ve lökositlerden meydana gelmektedir (87,88).

Memeli desidual dokusunun esas görevi embriyonun implante olmasını ve yerleşmesini sağlamaktır. Desidua dokusunun diğer bir görevi de trofoblast işgalini sınırlandırmak için bariyer görevi görmektir. Desidua, trofoblast göçü, invazyonu için gereken moleküllerin (bağlayıcı protein-1 [IGFBP1], insülin benzeri büyüme faktörü [IGF], fibronektin vb.), desidual ECM'nin değiştirilmesini sağlayan MMP'lerin salgılanmasını değiştirmektedir (89-91). Desidua hücreleri çok sayıda sitokin sentezini tetikler, interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8), makrofaj koloni uyarıcı faktör, makrofaj inflamatuvar protein-1 α ve tümör nekroz faktörü- α örnek verilebilir. Trofoblastlar tarafından üretilen ürünler ile endometrial stromal hücreleri, proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve anjiyojenik faktörler üretmek için indüklenmektedir. MMP ve TIMP salgılanmasıyla beraber trofoblast istilası düzenlenmektedir. Desidua söz konusu istilayı durdurmak için ise bazı molekülleri salgılayarak (IL1B ve IGF2 vb.) TIMP3 ve IGFBP1 ifadesini inhibe etmektedir (92,93).

Endometrium aylık olarak yeniden şekillenme geçirmektedir ve çok dinamik bir yapıya sahiptir. Ancak endometriumun esas değişimi gebeliğin başlamasıyla mümkün olmaktadır. Endometriyumda diğer bir önemli olayda stromanın desidualizasyonudur. Fibroblast benzeri predesidual stromal hücreler (predsh) bu aşamada morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler geçirmektedir. Decidualizasyon olayı adet döngüsünün luteal fazı sırasında meydana gelir veya gebeliğin gerçekleşmesi durumunda ise korpus luteum tarafından salınan yumurtalık hormonları tarafından düzenlenmektedir. Desidualize hale gelen hücreler artık sitoplazmalarında desmin eksprese eder ve prolaktin salgılamaya başlar (86,87,94,95).

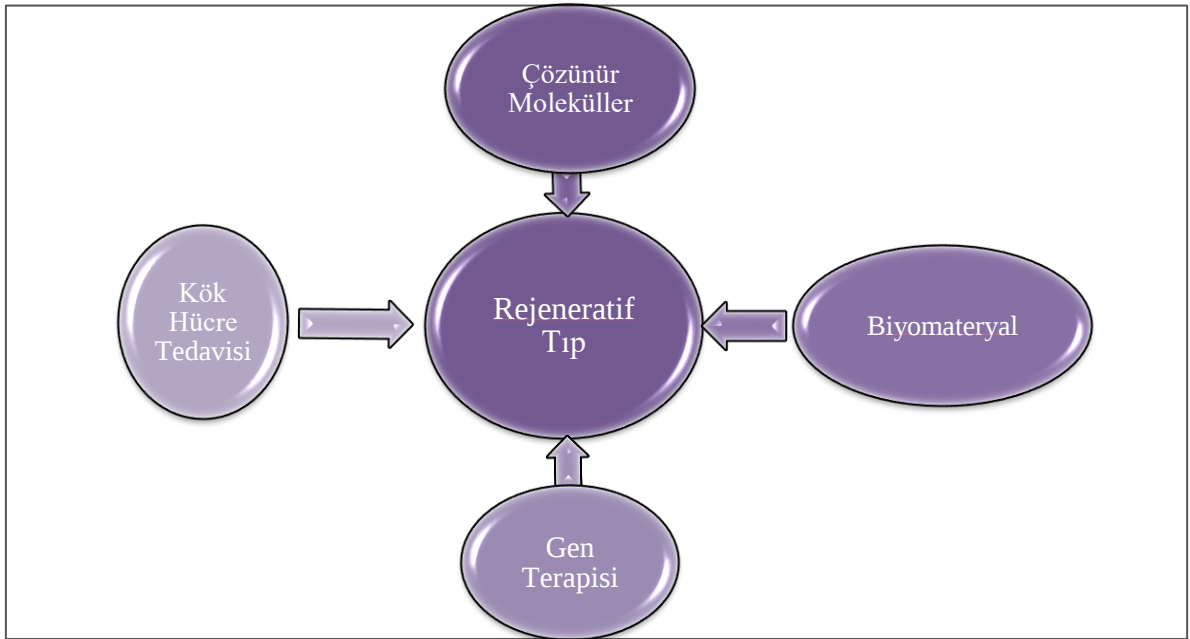
1990'lı yıllarda kök hücrelerin, endometriumun rejeneratif özellik kazanmasındaki ana kaynak olduğu düşünülmüştür. Ancak 2001'den sonra yapılan çalışmalar bu hücrelerin izolasyonu üzerinde durulmuştur. İnsan endometriyumundan kök hücrelerin izole edilebildiğini ve osteojenik, miyojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir (2,96-98). Yapılan bazı çalışmalarda desidua kök hücrelerinin fibroblast benzeri bir morfoloji sergiledikleri ve mezenkimal kök hücre belirteçlerini ifade ederken hematopoietik hücrelerin belirteçlerini ifade etmedikleri görülmüştür. Bu hücrelerin CD34 ifadesinin olmadığı ve HLA-DR ifade eden hücrelerin ise yüzdesinin oldukça düşük olduğu gösterilmiştir (96,99).

2.3.5. GÖBEK KORDONU (GK)

MKH kaynağı olan göbek kordonunda ise, göbek kordonu veni ve göbek kordonu arterleri çevreleyen bağ dokusu bulunmaktadır. Bu bağ dokusu Wharton'un jölesidir. Wharton'un jölesi ve göbek kordonu da mezenkimal kök hücresi (GK-MKH) bakımından zengin bir kaynaktır (100). Göbek kordonu ve kord kanı diğer yöntemlere kıyasla daha invaziv bir yöntemdir. Bebeğe ve anneye bir zarar gelmemektedir. Ancak GK'nın MKH kaynağı olarak kullanılması hala tartışmalara sebep olmaktadır (101). Göbek kordonuyla ilgili yapılan çalışmaların sayıları arttıkça MKH kaynağı olarak kullanılıp kullanılamayacağı netlik kazanacaktır.

2.4. REJENERATİF TIP VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Rejeneratif tıp, doğumsal kusurların, hastalıkların, travmaya maruz kalmış ya da yaşlanma nedeniyle, bozulmuş olan hücrelerin, dokuların veya organların onarımı, değiştirilmesi veya yenilenmesini sağlayan multidisipliner araştırma ve klinik uygulama alanıdır. Rejeneratif tıp kendi içinde birçok teknolojik yaklaşımı (Şekil 2.3.) birleştirmektedir. Vücutta hasar görmüş bölgelerin onarımı veya yenilenmesi için kök hücreler kullanılmaktadır. Kök hücrelerin göç etme potansiyeli sayesinde hasarlı bölgelere ulaşarak dokunun yenilenmesine katkı sağlamaktadır (102).



Şekil 2.3. Rejeneratif tıp yaklaşımları, çözünebilir moleküllerin kullanımını, gen terapisini, kök hücre terapisini ve biyokompozitlerin kullanımını içerebilir (103)

2.4.1. REJENERATİF TIP TARİHİ

Rejeneratif tıbbın başlangıcı 1950'lerin sonlarına kadar uzanmaktadır. 1950'lerde kalp yetmezliğinin önüne geçmek için hayvan modellerinde kalp nakilleri denenmiştir. Bu süreci takiben insanlarda ilk kalp nakli 1967'de gerçekleştirilmiştir (104).

Bilim adamları donör organ eksikliği, greftlerin başarısız olması ve çeşitli etik kaygılar taşıması nedeniyle rejeneratif tıp için farklı uygulamalar geliştirilmektedir. Örneğin, tüm organın yerine yenisini takmak yerine hücreleri ve belirli özelliklere sahip dokuları nakletmeye odaklanmaktadır. Geleneksel tıbbın yetersiz kaldığı ve tedavi edilemeyen hastalıklar için (kalp yetmezliği, nörolojik rahatsızlıklar, oto immün hastalıklar, multip skleroz) kök hücreler (EKH, iPS, MKH) tedavi etme potansiyeline sahiptir (105,106).

Rejeneratif tıp için çalışılan alanların başında deri sorunları gelmektedir. Deri yaralanmalarında mevcut tedaviler yeterli değildir ve ağır bir ekonomik yükü de beraberinde getiren dünya çapında bir sorun teşkil etmektedir (107). Cilt yaralanmaları için geliştirilen doku mühendisliği ürünleri kusurların hızlı bir şekilde örtülmesini, hastanın ağrılarının azaltılmasını ve rutin hayatında kişinin kendisinin uygulayabileceği kolaylıkta olması beklenmektedir. Buna ek olarak iltihaplanmaya ve yeni yaraların açılmasına sebep vermemelidir. Hasarlı dokuyu yenilenmeye teşvik etmelidir. Uygulanan deri greftleri estetik bir görüntüye sahip, kişinin deri rengine uygun, darbelere karşı dayanıklı olmalı ve toksik etki yaratmamalıdır (108,109). Bu konuda başarıya ulaşp ticari olarak satılan ürünler bulunmaktadır. Bunlar hücresiz yapay veya biyolojik kaynaklı malzemelerdir.

2.5. REJENERATİF TIP (YENİLEYİCİ TIP) UYGULAMALARI

2.5.1. REJENERATİF TIPTA (YENİLEYİCİ TIPTA) KÖK HÜCRELERİN KULLANIMI

Rejeneratif tıp alanında kullanılan kök hücreler, kemik iliği kök hücreleri (KİKH), mezenkimal kök hücreler (MKH), embriyonik kök hücreler (EKH), dokuya özgü progenitör kök hücreler, göbek kordonu kök hücreleri (GKKH) olarak sıralanabilir. Kök hücrelerle ilgili çalışmaların sayıların artmasıyla, tedavisi olmayan hastalıklarda kök hücre kullanımı umut vermektedir. Mezenkimal kök hücreler hem hasar gören bölgeye göç ettiği için hem de kuvvetli bir immün yanıt oluşturmadağı için rejeneratif tıp alanında kullanımı için uygun olmuştur (110).

Yapılan bazı kök hücre tedavisi çalışmalarında, farelerde meydana getirilen enfarktüs hasarı sonrasında kalp fonksiyonunu iyileştirebildiği gösterilmiştir. Bilindiği üzere yetişkin kök hücreler kalbi yenileyememekte ve yeni kardiyomiyositler üretememektedir. Bu iyileştirme fonksiyonu sadece canlı hücrelerin, ölü hücre kalıntılarının temizlenmesini sağlaması için doğal bağışıklık tepkisini indüklediğinden olmaktadır. Böylece kalbe küçük bir iyileştirici fayda sağladığı bulunmuştur (111).

MKH'ler ile ilgili başka çalışmalarda kardiyovasküler hastalık tedavisi için de önemli rol oynamaktadır. Farklılaşmaya ek olarak MKH'lerin kardiyovasküler progenitör hücrelere öncülük ettiği düşünülmektedir. MKH'den türetilmiş hücre dışı veziküllerin kardiyomiyosit otofajisini ve anjiyogenezi artırdığı, hücre apoptozunu azalttığı, çoklu mikroRNA'lar (miRNA'lar) aracılığıyla hücrenin hayatta kalma sinyal yolağını etkinleştirdiği görülmektedir. Son zamanlarda, genetik modifikasyonları ve biyolojik materyallerin kullanılması hatta kombinasyonlarının oluşturulması ile MKH'lerin terapötik etkilerini arttırmak için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir (27).

2.6. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

1976'da Avrupa Biyomalzeme Derneği'ne (ABD) göre biyomateryaller, 'biyolojik sistemlerle etkileşime girebilen ve tıbbi cihazlarda kullanılan cansız malzeme' olarak tanımlanmıştır. Daha sonrasında ise ABD'nin tanımı 'vücudun herhangi bir organını dokusunu veya bir fonksiyonunu tedavi etmek veya değiştirmek için biyolojik sistemlerle arayüz oluşturun materyaller olarak değiştirilmiştir (112). 1994 yılında Robert Langer ilk defa doku mühendisliği ismini kullanmıştır (113). Bu yeni çalışma alanının en önemli araştırmacıları arasındadır.

2.6.1. BİYOLOJİK KAYNAKLI BİYOMALZEMELER

Biyolojik malzemeler sentetik malzemelere göre hücrelerin iskeleye yapışmasını ve farklılaşmasını daha iyi desteklemektedir. Ayrıcı biyolojik süreçler içerisinde bozunurlar. Böylece konakçının kendi hücre dışı matriksi zaman içerisinde oluşarak biyokompozitin yerini alabilmektedir. Biyolojik malzemelerin ise iki önemli dezavantajı vardır;

1. Tekrarlanabilir ve homojen üretimleri zordur

2. Zayıf mekanik özelliklere sahiptirler.

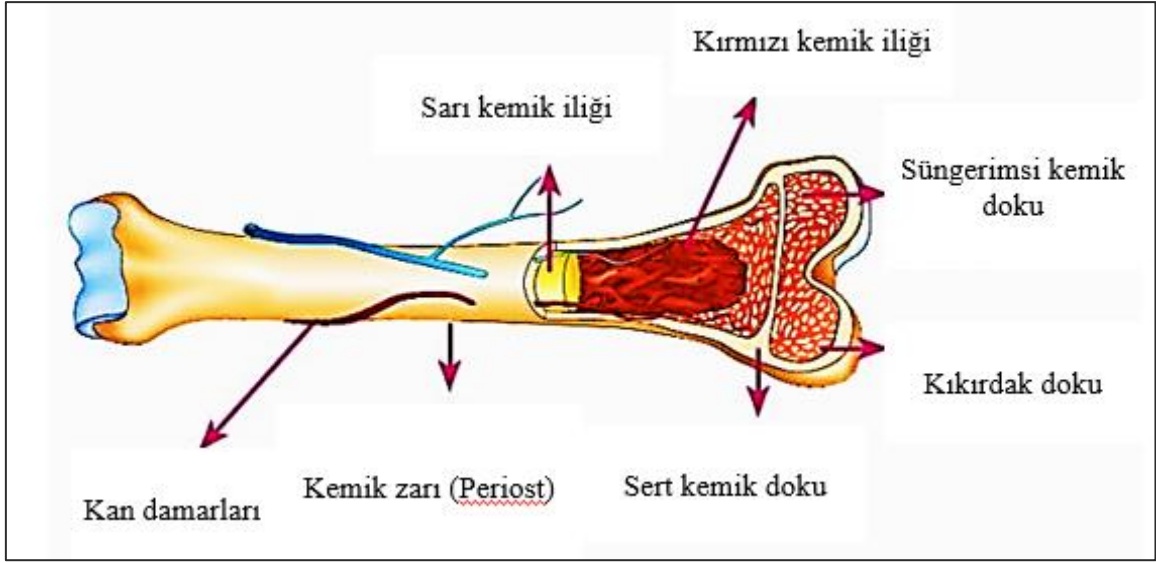
Bu konuda yapılan araştırmalarda tek faza sahip iskelelerin kendi aralarında karakterizasyon çalışmalarında dezavantajları vardır. Tek fazlı iskelelerin dezavantajını azaltmak için çok sayıda aşmaya sahip olan biyokompozitlerin geliştirilmesi sağlanmaktadır. Araştırmacılar bazıları sentetik ve biyolojik malzemeleri birleştirirken kimi araştırmacılar da seramiği polimer bazlı yapı iskelelerine dahil etmeye çalışarak hedef dokuya benzer yapılar oluşturmuşlardır. İkili yapılarla bazı problemlerle karşılaşılsa bile doku benzeri yapıları meydana getirerek bu problem aşılmaya çalışılmıştır; biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirliği veya her ikisiyle de ilgili sorunlarla hala çözüm aranmaktadır (114,115).

2.6.2. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİğİ

Doku mühendisliğinin amacı bir dokunun tedavi edilmesine yardımcı olmak ya da hasarlı dokunun yerini alacak yeni bir doku üretebilmektir. Doku mühendisliği ile üretilen bir malzemenin üzerine hücre ekilerek onun dokuya benzer bir hale gelmesi hedeflenmektedir. Kemik doku mühendisliği alanı için hem doğal kemik bileşeni kullanılabilirken hem de biyomimetik (seramikler, kompozitler vb.) malzemeler kullanılabilir. Kemik allogreftleri ve otogreftleri yerine kemik doku mühendisliği ile daha verimli materyallerin tasarlanması amaçlanmaktadır (116).

2.6.3. KEMİK YAPISI

Kemik kan damarları vasıtasıyla beslenen sert dokudur. İskelet sisteminin ana unsurunu meydana getirmektedir. İnsan iskelet sistemi toplamda 206 kemiğe sahiptir. Bu kemikler belirli bir düzen içerisinde yerleşir. Kemik organik ve inorganik bileşenlerden oluşmaktadır. İnorganik matriks içerisinde magnezyum fosfat, hidroksiapatit, sodyum klorür ve su bulundurmaktadır. Organik matriksinde ise büyük miktarda kolajen ve kolajenöz olmayan proteinleri barındırmaktadır. Kemik esnekliğini organik kısımdan alırken sertliğini inorganik matriksten almaktadır. Kemik başlıca iki kısma ayrılmaktadır. Bunlardan ilki kompakt kemik iken ikincisi süngerimsi kemik dokudur. Kemiğin süngerimsi ve kompakt kemik görünümü Şekil 2.4.'te verilmiştir (117).



Şekil 2.4. Kemiğin yapısı (118)

Kemik yapısı gereği içerisindeki hücreler sıkı bir şekilde birbirine bağlanmaktadır. Kemiğin yüzeyini kaplayan hücreler osteoblastlardır. Bunlar epitik karakterli hücrelerdir. Osteoblastlar protein sentezini gerçekleştiren hücrelerdir. Bu protein sentezi sayesinde hücre dışı matriks oluşmaktadır. Kemik matriksi büyüdükçe osteoblastların etrafını sarar ve bunun sonucunda osteositler meydana gelmektedir. Böylece bu hücreler matriksin içerisine gömülü halde kalır (119).

2.6.4. KEMİK EKSTRASELÜLER MATRİKSİ (ECM)

Kemik, osteoklastların ve osteoblastların vasıtasıyla kendisini yenileyebilmektedir. Sağlıklı bir iskelet sistemi için kemiğin yeniden modellenmesinin sürekli devam etmesi gerekmektedir. Bu süreçte meydana gelen dengesizlikler ise osteoporoz gibi kemik kaybına sebep olan hastalıklara yol açmaktadır. Osteoklastlar hematopoietik kök hücrelerden köken alırken osteoblastlar mezenkimal kök hücrelerden köken almaktadır. Osteoklastlar, osteoblastlar vasıtasıyla düzenlenmektedir. Osteoblastlar kemiği oluşturan hücrelerdir ve ECM'nin şekillenmesini sağlarlar. İlerleyen süreçte osteoblastlar ya apoptoza uğrar ya da osteositlere farklılaşarak ECM'ye gömülürler. Kemik ECM'si oldukça karmaşık bir oluşum sürecine sahiptir. Hidroksiapatit kristalleri tip-1 kolajen üzerinde birikmektedir. Osteositler tarafından MEPE (matris ekstraselüler fosfoglikoprotein), DMP1 (dentin matrix protein 1), SIBLING (Small integrin-bağlayıcı ligand-bağlı glikoprotein) proteinlerini osteositler sentezlemektedir. Kemik 100'den daha fazla ECM proteini içermektedir. Kemiğin dayanıklı olmasında ve mineralize yapısının korunmasında oldukça önemlidir (120).

2.6.5. HİDROJELLER

Jeller, katı ya da sıvı fazın arasında bir forma sahip olan maddelerdir. Bu maddeler çapraz bağlı polimerlerden ya da uzun zincirli moleküller vasıtasıyla elde edilmektedir. Kullanılan kimyasallara ve ortam koşullarına bağlı olarak jellerin kıvamları sıvıya ve katıya yakın olacak şekilde değişkenlik göstermektedir. Ancak hepsinin ortak özelliği jöle gibi bir kıvama sahip olmalarından gelmektedir. Bilinen en eski jel tanımı Herman tarafından yapılmıştır. Hermans jellerin 3 önemli özelliğinden bahsetmiştir. Buna göre, katı bir madde sıvı içerisinde tamamen çözünmelidir. Daha sonrasında uygulanan mekanik kuvvete karşı katı faz davranışı sergileyerek direnç göstermelidir. Sistem kendi kendisine uzama hareketi yapmalıdır. Jellerin hidrojel özellik gösterebilmesi için hidrofilik grupları (-OH, -COOH, -NH₂, -COOR) bünyesinde barındırması gerekmektedir. Hidrojeller esnek olmaları ve yapılarında bol miktarda su taşımaları nedeniyle canlı dokuyla benzerlik göstermektedir (121).

Çizelge 2.2. Hidrojellerin sınıflandırılması

Hidrojellerin Hazırlanma Yöntemi	• Homopolimer • Kopolimer • Çoklu polimer • İç içe geçmiş ağ yapılı (IPN)
Hidrojellerin Yan Grupları	• Nötral (iyonik olmayan) • İyonik hidrojeller
Hidrojellerin Fiziksel Yapıları	• Amorf • Yarı kristalin • Hidrojen bağlı
Hidrojellerin Çapraz Bağlanmaları	• Fiziksel çapraz bağlı • Kimyasal çapraz bağlı
Hidrojel Kaynakları	• Doğal • Sentetik
Hidrojellerin Kimyasal Kararlılıkları	• Biyolojik olarak bozunabilen • Biyolojik olarak bozunmayan
Hidrojellerin Su Tutma Kapasiteleri	• Düşük şişme • Orta şişme • Yüksek şişme • Süper-absorbans

Hidrojeller ise üç boyutlu yapısını koruyan ve suyla daha şişkin hale gelmiş malzemelerdir. Hidrojeller doğal kaynaklı, sentetik, ve hibrit (doğal ve sentetik malzemelerin karıştırılması) olabilmektedir (122). Hidrojelleri çapraz bağlanma şekillerini göre fiziksel ve kovalent jellerdir olarak ayırabilmektedir. Hidrojeller çapraz bağlanmaları kovalent ve iyonik bağlar ile gerçekleşmektedir. Zayıf bağlardan olan hidrojen ve Van der Waals kuvvetleri ile çapraz bağlantılar kurulabilmektedir (123). Çizelge 2.2. de hidrojellerin sınıflandırılması detaylı olarak açıklanmıştır.

2.6.6. VÜCUT SIVILARI

Vücutta bulunan suyun ve su içerisinde çözünmüş olan elektrolitlerin oluşturduğu sıvının tamamına vücut sıvıları denmektedir. İnsanların vücut sıvıları ağırlıklarının yarısından fazlasını meydana getirmektedir. Vücut sıvıları hücre içi ve hücre dışı vücut sıvıları olarak ikiye ayrılmaktadır. Potasyum iyonunun çoğu hücre içerisinde bulunmaktadır. Daha az bir kısmı ise hücre dışında kalmaktadır. Böylece sodyum iyonu ve adenosin trifosfataz (ATPaz) ile hücre içi ve hücre dışı elektrolit dengesi sağlanmaktadır. Hücre dışı sıvılar hücre içi sıvılara göre çok daha çeşitlidir. İçerisinde oksijen, sodyum, klorür, aminoasit, glikoz gibi besinleri, gazları ve atıkları da taşımaktadır. Vücut sıvıları kan damarında ve hücre içerisinde bulunmaktadır. Buna ek olarak kan damarı ve hücre arasında kalan boşlukta da vücut sıvısına rastlanmaktadır. Vücut sıvıları, kan, kan plazması, hücre içi sıvılar, idrar, beyin omurilik sıvısı, gözyaşı sıvısı, seröz boşluklardaki sıvılar, ter, süt, sindirim sistemi sıvıları olarak gruplandırılmaktadır (124).

2.6.7. SENTETİK VÜCUT SIVILARI

Sentetik vücut sıvıları (SVS) inorganik iyon içeriği bakımından hücre dışı sıvılarla benzerlik gösteren ve organik bileşenler barındırmayan sıvılardır. SVS tasarlanırken insan kan plazması baz alınmıştır. Ancak bazı iyonların konsantrasyonu bakımından değişiklik gösterebilmektedir. SVS kemik gibi biyolojik biyomalzemelerin yüzeyinde hidroksiapatit oluşumunun arttırılması için kullanılmaktadır. SVS'ye maruz kalan malzemelerin yüzeylerindeki Ca-P dengesi değişmektedir. FTIR, X ışını, SEM görüntüleri Ca-P yapısının SVS'den etkilendiğini göstermektedir (125).

2.6.8. BİYOMALZEMELERİN ÖZELLİKLERİ

2.6.8.1. Biyouyumluluk

Biyouyumluluk, bir malzemenin belirli bir fizyolojik durumda uygun bir tepki ile performans gösterme yeteneğini ifade eder (126). Biyokompozitlerin genellikle konak dokulara uyum gösterdiği bilinmektedir. Biyokompozitler için biyouyumluluk kavramı oldukça önemli ise de, bu kavram biyokompozitlerin evrimleşmesiyle beraber zaman içerisinde değişmektedir. Biyokompozitler, doku mühendisliği, invazif sensörler, ilaç verme, gen transfeksiyon sistemleri, tıbbi nanoteknoloji uygulamaları ve biyoteknoloji gibi alanlarda kullanılmaktadır. Biyokompozitlerin üretimi giderek daha çeşitli alanlarda ve karmaşık sistemler ile yapılmaktadır. Bu alanlarda biyokompozitlerin kullanımlarının ilk kriteri biyouyumlu olup olmamalarıdır. 1940 ile 1980 arasındaki yıllarda ilk nesil implante edilebilir cihazları geliştirilen ve kullananlar, biyolojik olarak en iyi performansı sunan ancak kimyasal olarak en az reaktif olan malzemeleri geliştirmeyi hedeflemişlerdi. Süreç içerisinde kullanılan malzemeler ve onlardan beklenen özellikler değişmeye başlamıştır. Günümüzde materyaller seçilirken, toksik olmayan, immünojenik yanıt ve trombojenite oluşturmayan, kanserojen olmayan, tahriş edici etkisi bulunmayan vb. parametreler dikkate alınmaktadır (127).

2.6.8.2. Biyobozunurluk

Doku mühendisliği ile elde edilen greftlerin başlıca amacı implante edildikleri dokuların ya da hücrelerin yerini almasıdır. Zaman içerisinde iskeleler hücrelerin kendi ECM'sini oluşturmasına izin verir. Bu sürece biyobozunma ya da yeniden modellenme denmektedir. Biyobozunma sonucunda ortaya çıkan yan ürünler kesinlikle toksik etkiye sahip olmamalıdır. Diğer organlarla etkileşime girerek herhangi bir zarara yol açmadan vücuttan atılabilmelidir (128,129).

2.6.8.3. Mekanik Özellikler

Greftler, implante edilecekleri bölgeye göre tasarlanmaktadır. Örneğin nakledileceği bölgenin mekanik özelliklerini taşıması ve cerrahi operasyonlara dayanabilir yapıda olması gerekmektedir. Özellikle kardiyovasküler ve ortopedik uygulamalarda yeterli mekanik özelliklere sahip olan iskeleleri üretmek karşılaşılan en ciddi sorunlardandır. Böylesi dokular

için üretilen iskelelerin implante edildikleri andan itibaren yeniden modellemeye kadar gerekli mekanik bütünlüğe sahip olması beklenmektedir (130).

2.6.8.4. İskele Tasarımı

Doku mühendisliği için kullanılan iskelelerin hücrelere uygun olarak tasarlanması önemlidir. Çünkü hücresel penetrasyon ve besinlerin yapı içindeki hücrelere ulaşması, hücreler tarafından oluşturulan ECM'nin yeterli difüzyonu sağlayabilmesi için birbirine bağlı ve gözenekli bir yapıda olması gerekmektedir. Doku mühendisliğinin önemli konularından birisi de, iskele bozunması sonucu oluşan yan ürünlerin diğer doku veya organlarla etkileşime girmeden atılmasını sağlamaktır (131). İskeleler tasarlanırken diğer bir önemli noktada gözeneklerin boyutu olmaktadır. İskelelerin yüzeylerinde bağlanma peptitleri veya kimyasal gruplar yer alabilmektedir. Hücreler bu grupları tanıyarak iskelelere tutunabilmektedir. Doğal malzemelerden elde edilen iskeleler söz konusu ligandlara sahiptirler. Ancak sentetik malzemeler kullanılarak sentezlenen iskeleler için ligandlar sonradan dahil edilmektedir. Sentezlenen iskelelerdeki gözenek boyutuna bağlı olarak hücrelerin yapıya göç etmesi değişkenlik göstermektedir. Yeterli gözenek büyüklüğüne sahip olan iskelelerde hücre göçü daha başarılı ilerlemektedir ve hücreler iskele içindeki ligandlara bağlanabilmektedirler (132).

3. GEREKÇE ve AMAÇ

Kemik oldukça dinamik bir yapıya sahip ve hasar aldığı anda kendisini çoğunlukla iz bırakmadan yenilebilmektedir. Ancak büyük ölçekli doku kayıplarında ve/veya birleştirilemeyen kırıklarda bu yenilenme istenilen düzeyde gerçekleşmemektedir. Kemikte tümör, büyük lezyonlar, enfeksiyon gibi durumlarda ise kritik boyut aşıldığında klinik bir müdahale gerekmektedir. Kritik boyutun aşıldığı durumlarda tedavi olarak otojen, allojenik veya ksenojenik kemik grefti nakilleri yapılabilmektedir. Böylece rejeneratif tıp yöntemlerine ve kemik doku mühendisliği ile hazırlanan kemik yapılarına talep artmaktadır.

Kemiklerde oluşan büyük hasar veya kayıplar için Kemik doku mühendisliği yaklaşımları ümit vaat etmekte olup, biyolojik olarak istenilen zaman içinde yıkılabilen ve gözenekli iskeleler veya kemiğe benzer yapılar tasarlanmaktadır. Tasarlanan kemik benzeri yapılara hücreler tutunup çoğalabilmekte, hücreler ile etkileşime giren kemik iskelesinin daha sonrasında doku restorasyonunu ve vaskülarizasyonu desteklemesi beklenmektedir. Doku mühendisliğinde iskele tabanlı veya organ benzeri yaklaşımların amacı kemiğin kendisini yenilemesi için teşvik edilmesine dayanmaktadır. Ancak söz konusu iskelelerin ya da organ benzer yapıların konakçıya aktarıldıktan sonra inflamatuvar yanıt oluşturma riski de mevcuttur.

Bu tez çalışmasında, plasentadan elde edilen amniyotik zar-kökenli mezenkimal kök hücrelerin, sığır femur kemiğinden elde edilen biyolojik hidrojel ile (uygun şartlarda jelleştirilmesi ve modifiye edilmesi sonrası) kemik dokuya farklılaşabilme potansiyelinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ise sığır femur kemiğinden elde edilen ECM'ler çeşitli işlemlerden geçirilerek elde edilen biyokompozitlerin üzerine belli oranlarda AZ-MKH ekilmiş ve hücrelerin kemik hücrelerine farklılaşma durumları incelenmiştir.

Bu kapsamda, sığır femur kemiğinin süngerimsi kısmında ilk olarak demineralize ve deselülerize kemik matriksi elde edilmesi, ayrıca DKM sentetik vücut sıvısı- ile muamele edilerek akışkan hidrojin mineralizasyonunun sağlanması, sonrasında fizyolojik sıcaklıkta jelleşebilen ve kemik doku yenilenmesine uygun üç-boyutlu gözenekli bir iskele yapısı oluşturulması hedeflenmiştir. İkinci adımda farklı formlardaki iskelelerin amniyotik zardan elde edilen MKH ile standart vasat ve osteojenik vasat içeren farklı hücre kültürü koşullarında çoğalma durumları ve osteojenik farklılaşma durumlarının incelenmesi hedeflenmiştir.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1. PLASENTANIN TEMİN EDİLMESİ

Bu çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 09.07.2020 tarih ve İ7-410-20 karar nolu etik kurul onayı alınmıştır. Etlik Zübeyde Hanım, Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde sezeryan doğum yapan kadınlardan bilgilendirilmiş gönüllü onam formu alınmıştır. Sağlıklı 38 ila 40 haftalık sezeryan doğumlardan aseptik cerrahi koşullarda elde edilen plasenta steril torba içerisinde teslim alınmış ve en kısa sürede (1 saat) laboratuvara ulaştırılarak +4 °C'de bekletilmiştir. Çalışmaya dahil olma ve olmama kriterleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilecek örneklerin belirlenmesi

Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri	Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri
Kişinin çalışmaya katılmayı kabul etmiş olması	Kişinin çalışmaya katılmayı kabul etmemesi
Kişinin herhangi bir hastalığa sahip olmaması	Bulaşıcı bir hastalık taşıması
Plasentanın sezaryen doğum sonrasında alınmış olması	Doğumsal bir anomalinin olması
Hamileliğin 38-40 haftalık olması	

4.2. PLASENTADAN KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE ÇOĞALTILMASI

4.2.1. MATERNAL DOKUNUN DİSEKSİYONU (MD)

Plasenta diseksiyon için laminar akışlı kabin içerisine (Labconco) alındı. Şekil 4.1.'de plasentanın diseksiyon için belirlenen kısmı gösterilmiştir. Plasentanın maternal tarafından 0,5 cm kalınlığında parçalar kesildi. Doku parçalarının nemli kalması için diseksiyon

sırasında HBSS içeren steril petri kabına yerleştirildi. 50 mL'lik steril tüp (Corning) içerisine yaklaşık 10 g doku koyuldu.



Şekil 4.1. Plasentanın maternal yüzeyinden doku parçalarının çıkarılması

4.2.2. KORYONİK TABAKANIN (KT) DİSEKSİYONU

Amniyotik zarı plasentanın fetal yüzeyinden (amniyotik kese değil) mekanik olarak çıkarıldı. Koryonik plakadan 0,5 cm derinliğinde ~1 cm genişliğinde parçalar (Şekil 4.2.) kesildi. Koryonik plakayı, plasentanın kenar kısmından uzakta, göbek kordonuna en yakın bölgeden hasat edildi. Doku parçalarını diseksiyon sırasında HBSS içeren steril petri kabına yerleştirildi ve nemli kalması sağlandı. Kesilmiş doku parçaları 50 ml'lik bir tüpün içine, 10 ml çizgisine kadar (~10 g doku) koyuldu.



Şekil 4.2. Plasentanın fetal yüzeyinin görünümü

4.2.3. KORYONİK VİLLUS (KV) DİSEKSİYONU

KT'nin çıkarıldığı plasenta dokusundan ~0,5 cm daha derine inildiğinde KV dokusu elde edildi. Yine, plasantanın kenarından uzak, göbek kordonuna en yakın bölgeden (Şekil 4.2) KV dokusu alındı. Doku parçalarını diseksiyon sırasında HBSS içeren steril petri kabına yerleştirildi ve nemli kalması sağlandı. Kesilmiş doku parçaları 50 ml'lik bir tüpün içine, 10 ml çizgisine kadar (~10 g doku) koyuldu.

4.2.4. AMNİYOTİK ZAR (AZ) DİSEKSİYONU

Amniyotik zardan büyük bir parça kesilerek (Şekil 4.3.) ayrıldı. Ayrılan doku fiziksel sindirim için HBSS içeren steril petri içerisine alındı ve makas yardımıyla parçalandı. Kesilmiş doku parçalarını 50 ml'lik bir tüpün içine, 10 ml çizgisine kadar (~10 g doku) koyuldu.



Şekil 4.3. (A) Amniyotik zarın görünümü (B) Amniyotik zarın çıkarılması

4.3. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İZOLASYONU

Üç farklı 50 ml tüp içinde ~10 g MD, KP ve KV dokusu olduğundan, her tüpe yaklaşık 40 ml HBSS eklendi ve dokuyu yıkamak için tüp tekrar tekrar ters çevrildi (~10 saniye tekrarlandı). Süpernatant boşaltıldı ve doku kandan arınıncaya kadar bu yıkama adımını 2-3 kez tekrarlandı. Doku parçaları (en az sıvı transferi ile) 10 cm'lik steril petri kabına tekrar aktarıldı. Doku parçaları steril makas veya neşterle yaklaşık 1-5 mm³'lük ince parçalara kıyıldı. Kolajenaz tip 1 (Thermo Scientific, 17100017) 100 µ/ml, DNaz-1 (Thermo Scientific EN0521) 1.5 µg/ml ve Dispaz (Sigma D4818) 2,4 µ/ml, steril filtreden (Corning,

431219) geçirilerek serum içermeyen DMEM (Lonza, BE12-707F) içersine eklendi ve parçalama çözeltisi taze bir şekilde hazırlandı. Doku üzerine 1:1 oranında taze hazırlanmış parçalama çözeltisi eklendi (örn.10 ml doku üzerine 10 ml parçalama çözeltisi). Tüplerdeki dokular 37°C'de 1-2 saat parçalama çözeltisi ile inkübe edildi.

4.3.1. P-MKH'LERİN ALT KÜLTÜR YAPILMASI

Parçalama çözeltisi ile elde edilen parçalanmış doku parçaları explant kültür olarak T75 kültür kaplarına ekildi. 14 gün süreyle takip edildi ve her 2 güne bir besiyeri değiştirildi. 14 gün sonunda explant kültür tripsin-EDTA ile kaldırılarak santrifüj yapıldı. Böylece büyük doku parçaları uzaklaştırıldı. Doku parçalarının tamamen uzaklaştırılması ise pasaj 2'de sağlandı.

4.3.2. PBS (FOSFAT TAMPONLU TUZ SOLÜSYONU) ÇÖZELTİSİ

PBS ortamın pH'sini düzenleyen bir tampon çözeltidir. 300 ml deiyonize su içersine 0,36 g KH_2PO_4 , 22,5 g NaCl ve 1,32 g NaH_2PO_4 eklendi ve son hacim 500 ml'ye tamamlandı. PBS pH 7,4 olarak ayarlandı. PBS 5X stok çözeltisi olarak hazırlandıktan sonra deiyonize su ile seyreltilerek kullanıldı. Hücre kültürü için kullanılan PBS, 121 °C'de otoklavda steril edildi.

4.3.3. TRİPSİN-EDTA SOLÜSYONU VE FETAL SIĞIR SERUMU (FBS)

Tripsin-EDTA ticari olarak satın alındı ve porsiyon yapılarak kullanıldı. Stok çözeltisi -40 °C'de saklandı. FBS hem hücrelerin büyümesini desteklemesi hem de tripsin gibi enzimlerin inaktivasyonu için kullanıldı. Ticari olarak satın alınan 500 ml'lik stoklardan (Biological Industries) 50 ml'lik porsiyonlara bölünerek kullanıldı. Stoklar -80 °C'de saklandı.

4.3.4. TRİPAN MAVİSİ (TM)

Ticari olarak satın alınan tripan mavisi (Bio-Rad) hemositometre (Bio-Rad) ile hücre sayımı yapılmasında kullanıldı. Boyama işlemi için 10 µl tripan mavisi 10 µl örnek ile karıştırıldı. Karışım slaytlara yüklendi ve hücre sayımı yapıldı.

4.3.5. HÜCRELERİN DONDURULMASI

Hücreler tripsin ile kaldırılıp santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atıldı. Serum ve hücre örnekleri artık buzun içersine alındı ve çalışmaya soğuk koşullar altında devam edildi.

Santrifüj tüpünün dibinde kalan pellet ise serum ya da tam vasat besiyeri içerisinde çözöldü. Dondurma tüplerinin içine 1350 µl serum ve hücre karışımı eklendikten sonra %10'u kadar DMSO yavaşça eklendi. Dondurma tüp kısa bir süreliğine alt üst edildikten sonra hızlı bir şekilde -80 °C'ye kaldırıldı.

4.3.6. MEM-A (MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM EAGLE) TAM VASAT BESİYERİNİN HAZIRLANMASI

Ticari satın alınan MEM-α besiyeri (Biological Industries) tam vasat haline getirildi. Toplam MEM-α hacminin %10'u FBS (Biological Industries), %1 penisilin-streptomisin (pen-strep) (Gibco), %1 L-glutamin (Lonza) ve %1 anti-fungal eklendi. Hazırlanan besiyeri +4 °C'de saklandı. Çalışmaya başlamadan yarım saat önce oda ısındā bekletilerek ısıtıldı.

4.3.7. OSTEJENİK FARKLILAŞTIRMA BESİYERİNİN HAZIRLANMASI

MEM-α besiyerinin toplam hacminin %10 FBS, %1 pen-strep, %1 L-glutamin, %1 anti-fungal, 10 mM dexamethasone, 50 µM L-askorbik asit 2 fosfat, 10 mM β-gliserofosfat eklenerek elde edildi.

4.3.8. ADİPOJENİK FARKLILAŞTIRMA BESİYERİNİN HAZIRLANMASI

MEM-α besiyerinin toplam hacminin %10 FBS, %1 pen-strep, %1 L-glutamin, %1 anti-fungal, 1 µM dexamethasone, 0,5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine, 10 µM insan insülin, 0,2 mM indomethocin eklendi.

4.3.9. KARDİYOJENİK FARKLILAŞTIRMA BESİYERİNİN HAZIRLANMASI

50 ml MEM- α besiyerine %10 FBS, %1 pen-strep, %1 L-glutamin, %1 anti-fungal ve %10 5-azetidin eklendi.

4.4. PLASENTA MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KARAKTERİZASYONU

4.4.1. MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLEME

Hücre kültürüne alınan plasenta MKH'lerinin invert mikroskop (T1-SM, Nikon) ile her pasajda fotoğrafları çekildi.

4.4.2. AZ-MKH'LERİN ÜÇLÜ-SOYA FARKLILAŞTIRILMA ÇALIŞMALARI

Mezenkimal kök hücrelerin, adipositler, osteoblastlar ve kardiositlere farklılaşmasını indüklemek için farklılaşmayı destekleyen besiyerleri hazırlandı. Hücrelerin farklılaştırılması için ise pasaj 3 tercih edildi. Hücrelerin çoğaltılması için 8 kuyucuklu chamber slayt kullanıldı. Kontrol kültürleri MEM-alfa (Lonza) besiyerinde genişletildi.

4.4.2.1. Osteojenik Farklılaşma

Osteojenik farklılaştırma için, 5×10^4 hücre/cm² yoğunluğundaki hücreler ticari slaytlara ekildi. %50 yoğunluğa ulaşan hücrelerde osteogenezi indüklemek için besiyeri, çeşitli farklılaştırma ajanları (Sigma'dan) ile desteklendi. Osteojenik indüksiyon için 10 M deksametazon, 10 mM β -gliserofosfat ve 50 mg/ml askorbik asit kullanıldı. Osteojenik farklılaştırma için 400 μ l besiyeri kullanıldı ve her 48 saatte bir tazelendi. 21 gün sonra (veya hücreler ayrılmaya başladığında) soğuk metanol ile hücreler tespit edildi. Hücrelerde kalsiyum birikiminin histokimyasal olarak tespit etmek için ise Alizarin Kırmızısı ve Von Kossa boyaması yapıldı. Işık mikroskobu ile görüntüler alındı.

4.4.2.2. Adipojenik Farklılaşma

Adipojenik farklılaşma için, 5×10^4 hücre, 8 kuyucuklu chamber slayt (Corning) üzerine ekildi. Adipojenik farklılaştırma için besiyerine, indometasin (10 mM), 3-izobutilmetilksantin (0.5 mM), deksametazon (1 uM) ve insülin (10 ug/mL) eklendi. Besiyeri her 48 saatte bir tazelendi. Hücreler 21 gün inkübe edildi. İnkübasyonu takiben hücreler PBS ile 2 kez yıkandı ve önceden soğutulmuş metanolde 5 dakika bekletilerek tespit edilmeleri sağlandı. Hücre içi yağ damlacık birikimlerinin histokimyasal tespiti için Sudan siyahı boyaması yapıldı. Hücrelerin ışık mikroskobik görüntüleri alındı.

4.4.2.3. Kardiyojenik Farklılaşma

Kardiyojenik farklılaşma için 5×10^4 hücre 8 kuyucuklu chamber slayt (Corning) üzerine ekildi. 10 ml farklılaştırma besiyerine 50 μ l azatidin eklendi. Kardiyojenik farklılaşma için hücreler 1 gün süreyle farklılaştırma besiyerinde tutuldu. Soğuk metanol ile tespit edilen hücreler Mayer in hematoksilen eozin boyası ile boyandı. Işık mikroskobunda görüntülendi.

4.4.3. AZ-MKH'LERİNİN KOLONİ OLUŞTURABİLEN BİRİM ÇALIŞMASI

PMKH'ler 100, 1000, 10000 hücre/cm² olmak üzere üç farklı hücre yoğunluğu 6 kuyucuklu kültür kaplarına (Corning) iki tekrarlı olarak ekildi. Standart besiyerinde pasajlama işlemi yapılmadan 14 gün boyunca kültür sürdürüldü. 14 gün sonunda 6 kuyucuklu kültür kabı 2 kez PBS ile yıkanarak besiyeri uzaklaştırıldı. Soğuk metanol ekleyerek 5 dakika bekletildi ve hücrelerin yüzeye sabitlenmesi sağlandı. Hücrelerin oluşturdukları kolonilerin histokimyasal olarak gözlemlenmesi için ise kültürler %0,5 kristal viyole ile boyandı. Koloni oluşumu ışık mikroskopunda görüntülendi.

4.4.4. AZ-MKH AKIM SİTOMETRİ-İMMÜN FENOTİPLEME ÇALIŞMALARI

P-MKH'leri tripsin ile 5 dakika boyunca 37°C karbondioksitli inkübatörde inkübe edildi. Tripsin aktivasyonunun durdurulması için serum eklendikten sonra 340 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. 4,5x10⁶ hücre/ml olacak şekilde serum içerisinde seyreltme yapıldı. Seyreltilen hücre süspansiyonu boyama için tüplere 100 µl eklendi. Böylece her tüpe 200.000-300.000 hücre konuldu. Hücrelerin üzerine ise 3-5 µl kadar boyalı antikor eklendi. Hücreler oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. CD45, CD11b, CD44 ve CD29 monoklonal antikorları (fluoresan izotiyosiyanat konjüge edilmiş) ve CD31, CD73, CD106, TER114, CD90, Sca-1 monoklonal antikorları (Çizelge 4.2.) kullanıldı. Boyama işleminden sonra ise hücreler FACSCanto II cihazının yıkama solüsyonu (%2 serum içeren) ile 2 kere yıkandı. Yıkama işlemi bittikten sonra hücreler 340 g ile 5 dakika santrifüje edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpteki son hacim 200 µl olacak şekilde hücreler akım tamponu (%0,1 sodyum azid ve %0,5 BSA) ile süspanse edilerek sabitlendi. Süspanse edilen hücreler FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, ABD) analiz programı ile tarandı.

Çizelge 4.2. Akım sitometri analizi için seçilen mezenkimal ve hematopoetik kök hücre yüzey belirteçleri listelenmiştir

Pozitif Belirteçler	Negatif Belirteçler
CD105	LINA 750
CD73	HLA-DR
CD90	CD34
CD29	CD31
	CD133

4.4.5. AZ-MKH'LERİNİN KATLANMA SÜRESİNİN BELİRLENMESİ

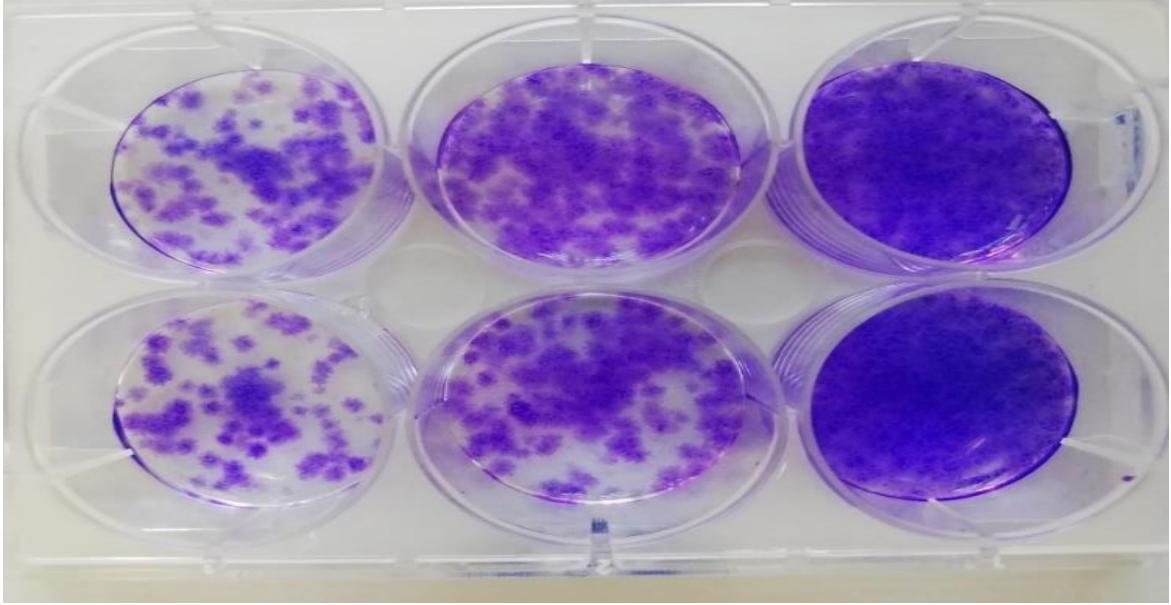
Katlanma süresi, hücrelerin çoğalma kabiliyetlerinin analiz edilmesi ve karşılaştırılması için kullanılmıştır. Katlanma süresi için P3 aşamasında bulunan AZ-MKH'ler kullanıldı. AZ-MKH (5×10^5 hücre/kuyu) 6 kuyucuklu kültür kaplarına (Corning, USA) 2 tekrarlı olarak ekildi ve %5 CO₂ inkübatörde (HERAcell 150i) 37 °C'de inkübe edildi. Besiyeri haftada iki kez değiştirildi. AZ-MKH'nin triplikatları, %0,05 tripsin-EDTA kullanılarak hücrelerin %80 yoğunluğa ulaşma süresine göre pasajlandı. Her pasajdan önce tripan mavisini kullanarak hücre sayımları gerçekleştirildi. Her pasajdan sonra yaklaşık 5×10^5 AZ-MKH, 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında ise tekrar tripsin yapıldı ve tripan mavisini ile boyanarak sayıldı. Tripan mavisini ile boyanan hücrelerin sayımı hücre sayım cihazında (BİO-RAD) yapıldı. "Patterson formülü [$T_d = T_l g^2 / g (N_t / N_0)$]" kullanılarak iki katına çıkma süresi belirlendi.

NOT: T_d iki katına çıkma süresi (saat), t hücrelerin N_0 'dan N_t 'ye (saat) çoğalması için geçen süredir ve N hücre sayısıdır.

4.4.6. HİSTOKİMYASAL BOYALAR

4.4.6.1. Kristal Viyole Boyaması

Yüzeye yapışık hücreler için IHC World %0,5 kristal viyole boyaması kullanıldı. Yüzeye yapışık hücreler 2 kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra tespit edilmesi için soğuk metanol kullanıldı. Soğuk metanolde 10 dakika bekletildikten sonra metanol pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Pipet ucunun yüzeye değmemesine dikkat edildi. Oda sıcaklığında bulunan %0,5'lik kristal viyole boyası eklenerek 10 dakika bekletildi. Kristal viyole boyası uzaklaştırılıp hücreler boyadan arıncaya kadar deiyonize su ile yıkama yapıldı. Faz-kontrast mikroskop ile fotoğrafları (Şekil 4.4.) çekildi.



Şekil 4.4. Kristal viyole ile boyanan hücrelerin makroskobik görüntüsü

4.4.6.2. Alizarin Kırmızısı Boyaması

2 gram alizarin kırmızısı boyası 100 ml deiyonize su içerisinde çözüldü. Örnekler %70 'lık alkol ile yıkandı ve deiyonize su ile alkol kalıntıları uzaklaştırıldı. Alizarin kırmızısı boyası damlatılarak 5 dakika bekletildi ve alkol ile yıkama yapıldı. Işık mikroskobu ile fotoğraflandı.

4.4.6.3. Sudan Siyahı Boyaması

Boyama yapılacak örnekler, 60 °C etüvde ısıtılmış Sudan siyahı boyası ile 10 dakika bekletildi. Deiyonize su ile durulandıktan sonra Nuclear Fast Red solüsyonu ile 5 dakika bekletildi. Musluk suyu ile slaytlar durulandı. Mikroskobik görüntüleri alındı. Lipidler siyah mavi boyanırken çekirdekler kırmızı renk ile boyandı.

4.4.6.4. Von Kossa Boyaması

Boyaması yapılacak örnekler deiyonize su ile yıkandı. %1 gümüş nitrat solüsyonu ile muamele edilerek en az 1 saat UV ışığın altında bekletildi. Slayt deiyonize su ile durulandı. Reaksiyona girmeyen gümüş nitratın uzaklaştırılması için ise %5 sodyum tiyosülfat ile yıkandı. Deiyonize su ile kalan kimyasallar uzaklaştırıldı. Nükleer hızlı kırmızı ile 5 dakika boyunca örnekler boyandı. Deiyonize su ile yıkanan örnekler dereceleri alkolden geçildi ve ksilen ile temizlendi. Von Kossa boyası ile Ca birikimleri siyah-kahverengi, çekirdek kırmızı ve sitoplazma pembe görüldü.

4.4.6.5. Hematoksilen Eozin Boyaması

Boyama için hazırlanan örnekler deiyonize su ile yıkandı. Örnekler hematoksilenle 10 dakika boyandı. Musluk suyu ile durulandı ve asit alkolde bekletildi. Alkol musluk suyunda durulandı. Eozin ile 1 dakika boyandı. Musluk suyu ile durulandı ve boya uzaklaştırıldı. Boyanan örneklerin ışık mikroskopik görüntüsü alındı.

4.5. BİYOKOMPOZİTLERİN HAZIRLANMASI

4.5.1. SIĞIR FEMUR KEMİĞİNDEN DOKU ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Taze olarak alınan sığır femur kemiği kasaptan alındıktan sonra kullanıldı. Sığır femur kemiğinin süngerimsi kemik dokusu kompakt kemikten (Şekil 4.5.) ayrıştırıldı. Ayrıştırılma işleminden sonra doku örnekleri PBS ile yıkandı.



Şekil 4.5. Sığır femur kemiğinin genel yapısının gösterimi

4.5.2. KEMİK DOKUNUN DESELÜLERİZASYON VE DEMİNERALİZASYON İŞLEMİ

Süngerimsi kemik dokuları 0.5 N HCl asit çözeltisi ile oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırıcıya bırakıldı. 24 saat içerisinde birden fazla HCl değişimi yapıldı. Kemik dokuları seri deiyonize su yıkamalarına maruz bırakılarak asitten tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama işleminden sonra yağların uzaklaştırılması için kemik dokuları metanol-kloroform (1:1) ile oda sıcaklığında 1 saat muamele edildi. Toplanan kemik dokusu önce metanol ile daha sonra saf su ile yıkanarak temizlendi. Kimyasallardan tamamen arındırılan kemik dokusu liyofilize edildi.

Demineralizasyon işlemi tamamlanan kemik dokusu deiyonize su ile yıkandıktan sonra PBS içerisinde hazırlanmış olan %0,05 tripsin- %0,02 EDTA çözeltisi ile 37 °C'de %5 CO₂'de 24 saat muamele edildi. Demineralize kemik dokusu süzildükten sonra %1 penisilin-streptomisin içeren PBS solüsyonunda +4 °C'de 24 saat inkübatörde çalkalandı. Demineralize kemik dokusu tekrar süzülerek -20 °C buzdolabına kaldırılarak donması sağlandı. Donma işlemi gerçekleşen kemik dokusu liyofilizatörde (Şekil 4.6.) kurutuldu. Liyofilize edilerek tamamen kurutulan sünger doku makas yardımıyla oldukça küçük parçalara kesildi.



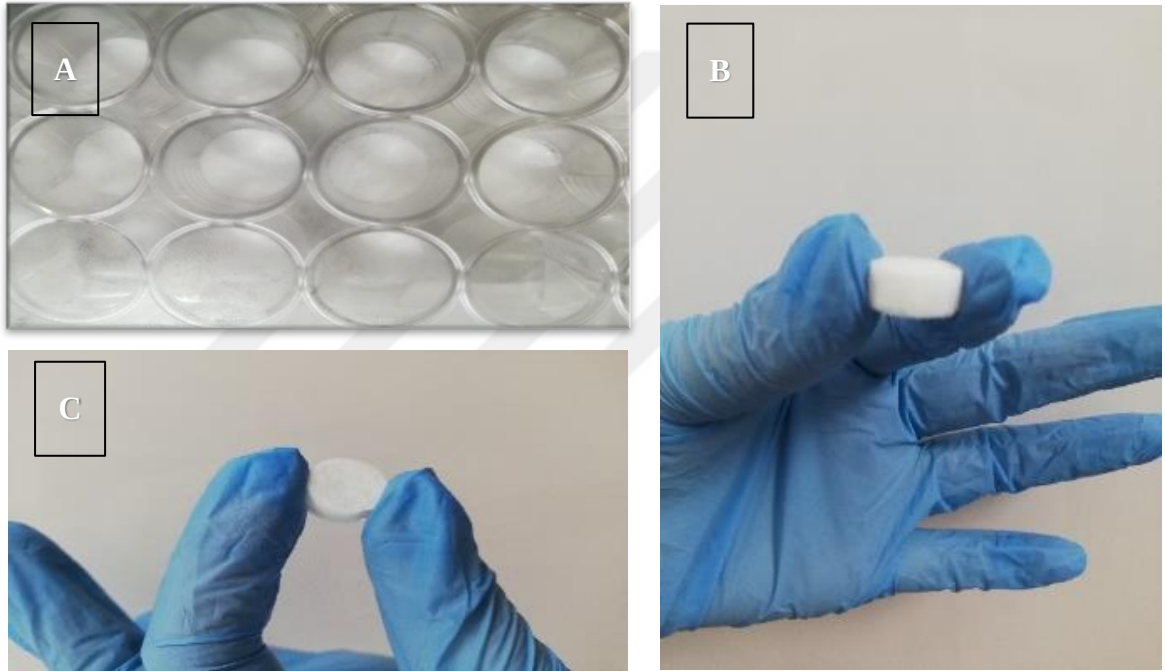
Şekil 4.6. Sığır femur kemiğinden ECM hidrojel elde edilmesi (A) Süngerimsi kemik dokunun lipid ve minerallerinden arındırması için enzim ile inkübasyonu (B) Elde edilen DKM'nin liyofilizatörde kurutulması

4.5.3. DKM’NİN JELLEŞTİRİLMESİ

Jelleőtirme için 21 µl HCl asit ve 25 mg pepsin 25 g DKM üzerine eklendi. 3 gün süreyle manyetik karıştırıcı üzerinde ve soğuk kalması sağlanarak jel haline getirildi.

4.5.4. DKM’NİN JELLEŞTİRİLMESİ VE LİYOFİLİZE EDİLMESİ

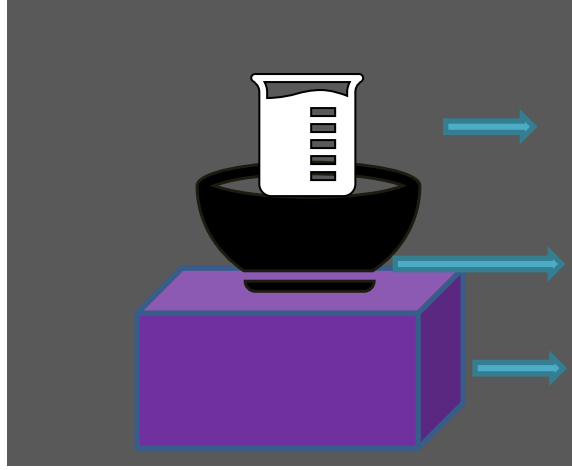
Akışkan hidrojel haline getirilen DKM’lerin 24 kuyucuklu kùltür kaplarına dökümü yapıldı. Her bir iskelenin çapı 6-7 mm yüksekliği 4-5 mm olacak şekilde ayarlandı. Döküm işlemine takiben örnekler 37 °C etüvde 40 dk boyunca bekletildi (şekil 4.7.). Setlenen örnekler -80 °C içerisinde 2 saat bekletildikten sonra liyofilizatör ile kurutuldu.



şekil 4.7. (A) Kurutulan kemik ECM’nin 12 kuyucuklu kùltür kapları içerisindeki görüntüsü (B) ECM’nin yandan görünümü (C) ECM’nin üstten görünümü

4.6. SVS (SENTETİK VÜCUT SIVISI) HAZIRLANMASI

500 ml deiyonize su polietilen behere alınır. Beherin üzeri streç film ile kapatılır. Deiyonize suyun ısısının 36,5 °C olması gerektiği için etüvde uygun ısıya gelene kadar bekletilir. Isısı ayarlanan deiyonize su manyetik karıştırıcının üzerine şekil 4.8.’deki gibi yerleştirilir. SVS içeriği ayrıntılı olarak Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4.’te verilmiştir.



Polietilen Beher (İçinde Manyetik Balık olmalı)

Su Kabı (Isıyı Sabit Tutmak için)

Manyetik Karıştırıcı

Şekil 4.8. SVS hazırlanırken ısıнын muhafaza edilmesi için kurulan düzenek

Çizelge 4.3. SVS ve insan kan plazmasındaki iyon konsantrasyonu (mM)

İyon	Sentetik Vücut Sıvısı	Kan Plazması
Na ⁺	142.0	142.0
K ⁺	5.0	5.0
Mg ²⁺	1.5	1.5
Ca ²⁺	2.5	2.5
Cl ⁻	148.8	103.0
HCO ³⁻	4.2	27.0
HPO ₄ ²⁻	1.0	1.0
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5

Çizelge 4.4. SVS içerisine kimyasalların eklenme sırası

Sıra	Kimyasal	Miktar
1	NaCl	7.996 g
2	NaHCO ₃	0.350 g
3	KCl	0.224 g
4	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0.228 g
5	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.305 g
6	1M-HCl	40 mL
7	CaCl ₂	0.278 g
8	Na ₂ SO ₄	0.071 g
9	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6.057 g

4.7. DKM’NİN SVS İLE BİYOMİNERALİZASYONUNUN ARTTIRILMASI

Kurutulmuş DKM 6 kuyucuklu kültür kabı içerisinde üzerine SVS eklendi. DKM, SVS içerisinde 8 gün boyunca tutuldu ve her 3 günde bir tazelendi. Böylece DKM’nin biyomineralizasyonunun arttırılması sağlandı.

4.8. BİYOKOMPOZİT KARAKTERİZASYONU

4.8.1. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) GÖRÜNTÜLEME

Hücreli biyokompozitler %2,5 gluteraldehit ile tespit edildi. Tespit edilen örnekler deiyonize su içerisinde 5 dakika bekletilerek yıkandı. İşlem 2 kere tekrarlandı. Yıkanan örneklerin üzerine %70’lik alkol eklendi ve yarım saat alkol içerisinde bekletildi. Fazla alkol uzaklaştırıldıktan sonra ise örneklerin kurutulması sağlandı. SEM analizinden önce hafif nemli olacak şekilde kalması gerekir. Örnekler analiz için yüksek çözünürlüklü altın ile kaplandı. Hücreli biyokompozitlerin analizi için taramalı elektron mikroskobu (ZEISS EVO 40) kullanıldı.

4.8.2. FOURİER DÖNÜŞÜMLÜ KIZİLÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR)

FTIR analizleri için numuneler 600-4000 cm^{-1} aralığında FTIR spektrometre (Shimadzu IRAffinity) ile analiz edilmiştir.

4.8.3. GAG (GLİKOZAMİNOGLİKAN) ANALİZİ

Sülfatlı GAG içeriği analizlerinde, kondroitin-6-sülfatın kullanıldığı standart eğri oluşturuldu. Dimetilmetilen mavisi (DMMB) boyaması ile üretici talimatlarına göre sGAG içerikleri belirlendi.

4.8.4. DNA ANALİZİ

Numuneler liyofilize edildi ve Proteinaz K (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) ile gece boyunca enzimatik olarak sindirildi. DNA içeriğinin belirlenmesi Picogreen boyası tahlil kiti (Molecular Probes, Inc., Eugene, ABD) üreticinin talimatlarına göre uygulandı. Hücre sayısı, MSC'leri için hücre başına ortalama 5.6 pg DNA değeri kullanılarak DNA miktarı analiz edildi.

4.9. HÜCRE- BİYOKOMPOZİT ETKİLEŞİMİ

4.9.1. DENEY TASARIMI

Deney için DKM ve SVS ile biyomineralizasyonu arttırılmış DKM iskelesi kullanılmıştır. Her deney grubu iki tekrarlı olarak yapılmıştır. İlk grup standart vasat ile kültüre edilirken ikinci grup ise osteojenik vasat (Çizelge 4.5.) ile kültüre edilmiştir. Böylece SVS kullanılan ve kullanılmayan malzemenin hem hücre tutma kapasitesine hem de osteojenik farklılaşmayı destekleme potansiyeline bakılmıştır.

Çizelge 4.5. Hücre tohumlanan DKM iskelesinin standart vasat ve osteojenik vasat ile incelenmesi

Günler	DKM- Standart Vasat	DKM- Osteojenik Vasat	SVS+DKM Standart Vasat	SVS+DKM Osteojenik Vasat
0 gün				
7 gün				
14 gün				
21 gün				

4.9.2. DKM İSKELESİNE AZ-MKH TOHURLANMASI İÇİN YAPILAN HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARI

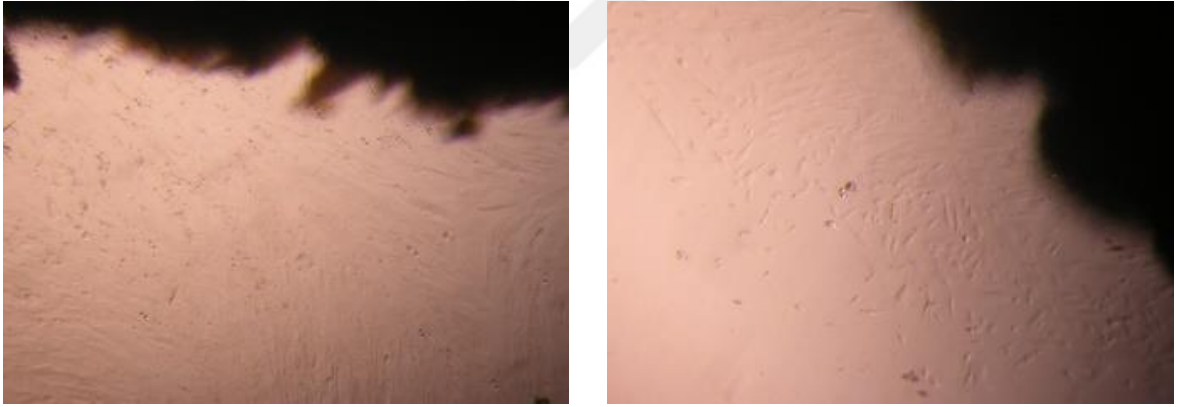
DKM kemik doku mühendisliği çalışmaları için elde edilmiş doğal bir iskeledir. AZ-MKH'lerinin kemik doku iskelesindeki davranışlarının incelenmesi ve osteojenik farklılaşma potansiyellerinin araştırılması için hücre kültürü çalışmaları yapıldı. Plazenta dokusundan başarılı bir şekilde izole edilen mezenkimal kök hücrelerin pasaj 3'te hücre karakterizasyonu çalışmaları yapıldı. Karakterizasyonu takiben 3 farklı kişiden alınan AZ-MKH'leri karma kültür haline getirildi. Birbirine uyum sağlayabilmeleri için ise 1 pasaj daha atlatıldı. Örneklerin iskele üzerine tohumlanması için pasaj 4 seçildi. Tohumlanmadan önce yüzeye yapışık hücreler tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılarak pellet haline getirildi.

4.9.3. DKM’NİN STERİLİZASYONU

DKM ve SVS+DKM üzerine hücre tohumlanması yapılmadan önce sterilizasyonu yapıldı. Sterilizasyon için örnekler 24 kuyucuklu kültür kapları içerisinde çıkarıldı ve laminar akışlı kabin içerisinde steril 12 kuyucuklu kültür kapları içerisine alındı. DKM ve SVS ile muamele edilmiş DKM saf alkol içerisinde 2 saat bekletildi. 2 kez, steril PBS içerisinde 30 dakika, UV altında bekletildi. İskelelerin sterilizasyonundan sonra etrafında sıvı kalmaması gerektiği için tüm sıvı uzaklaştırıldı.

4.9.4. PLASENTA KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN DKM İSKELESİNE TOHURLANMASI

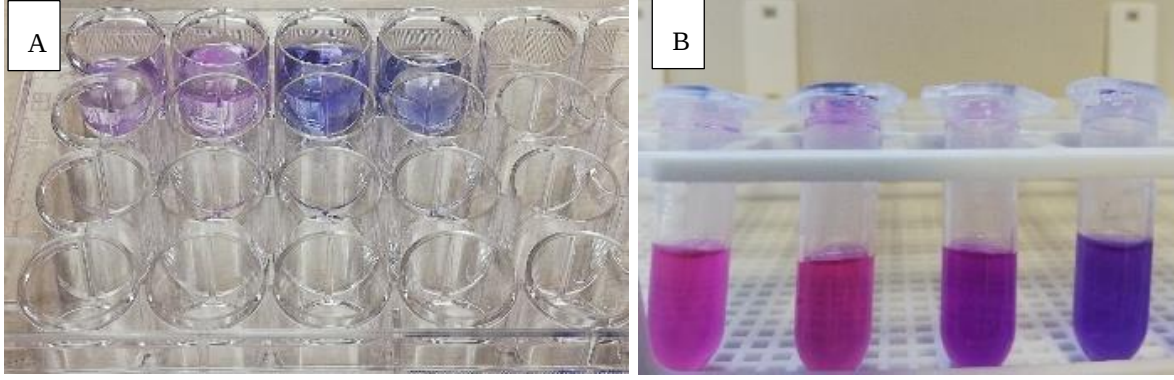
AZ-MKH’ler SVS+DKM ve DKM’ye 5×10^5 hücre olacak şekilde tohumlandıktan (Şekil 4.9.) sonra yaklaşık 2 saat besiyeri eklenmeden beklenmiş ve polimerin hücre salımı engellenmiştir. Besiyeri eklendikten sonra 36 saat hücrelerin yüzeye tutunmaları için beklenmiş ve 0. gün analizi için örnek toplanmıştır. Tohumlamadan 2 gün sonra besiyeri MEM- α tam vasat ve osteojenik farklılaştırma besiyeri ile değiştirildi.



Şekil 4.9. Hücre tohumlandıktan sonra DKM iskelesinin görüntüsü

4.9.5. HÜCRE CANLILIĞI (ALAMAR MAVİSİ) ANALİZİ

Hücre-biyokompozit etkileşiminin hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisinin anlaşılması için alamar mavisi analizi yapılmıştır. Belirlenen zaman noktalarında deney gruplarının besiyerleri tamamen uzaklaştırıldı. Steril filtreden geçirilen PBS ile 2 kere yıkandı. Alamar mavisi analizi için ortamın karanlık olması sağlandı. Örnek sayısı hesaplanarak alamar mavisi ve serum içermeyen besiyeri (1:9) hazırlandı.

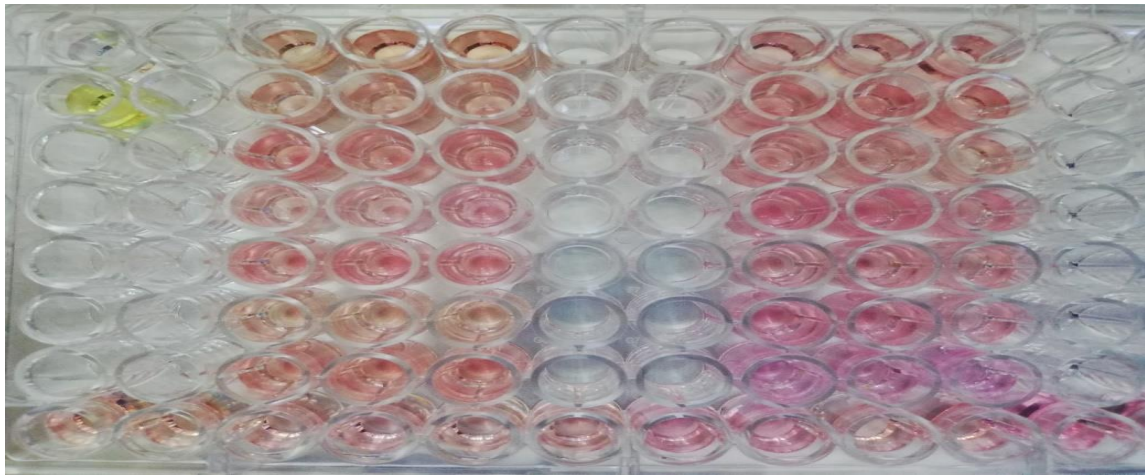


Şekil 4.10. (A) Alamar ile inkübe edilen deney grubu (B) Alamar ile inkübasyondan sonra toplanan besiyeri

Karışımdan 1 ml alınarak deney grubunun üzerine eklendi. En az 4 saat boyunca örnekler inkübasyona bırakıldı. Alamar mavisi içeren besiyerleri 4 saat sonrasında analiz için steril eppendorf tüplerine (Şekil 4.10.) toplandı. Cihazın örnekleri okuması için besiyeri deiyonize su ile sırasıyla 1:4 oranında seyreltildi. 80 μ l deiyonize su 96'lık siyah kuyuların içerisine alındıktan sonra üzerine 20 μ l alamar mavisi içeren besiyeri eklendi. Örnekler spektrofotometre cihazına yerleştirildi ve analizleri yapıldı.

4.9.6. ALP MİKTARI TAYİNİ

ALP analizi için BioAssay Alkaline Phosphatase Assay Kit (Çizelge 4.6.) kullanıldı. ALP analizi için 96 kuyucuklu kültür kabı kullanıldı. Kuyucuklardan birisine 200 μ l deiyonize su ve diğerine 200 μ l tartrazin eklendi. Diğer kuyucuklara ise 5 μ l örnek ve üzerine 195 μ l çalışma solüsyonu eklendi (Şekil 4.11.). Her bir kuyucukta son hacim 200 μ l olmalı. Örnekler 0. dakika ve 4. dakikada spektrofotometrede 405 nm dalgaboyunda ölçüldü.



Şekil 4.11. ALP analizinin görüntüsü

Çizelge 4.6. ALP miktar tayini kitinin içeriği

Çalışma Miktar	Solüsyonu
Assay Buffer	200 µl
Mg Acetate	5 µl
pNPP	2 µl

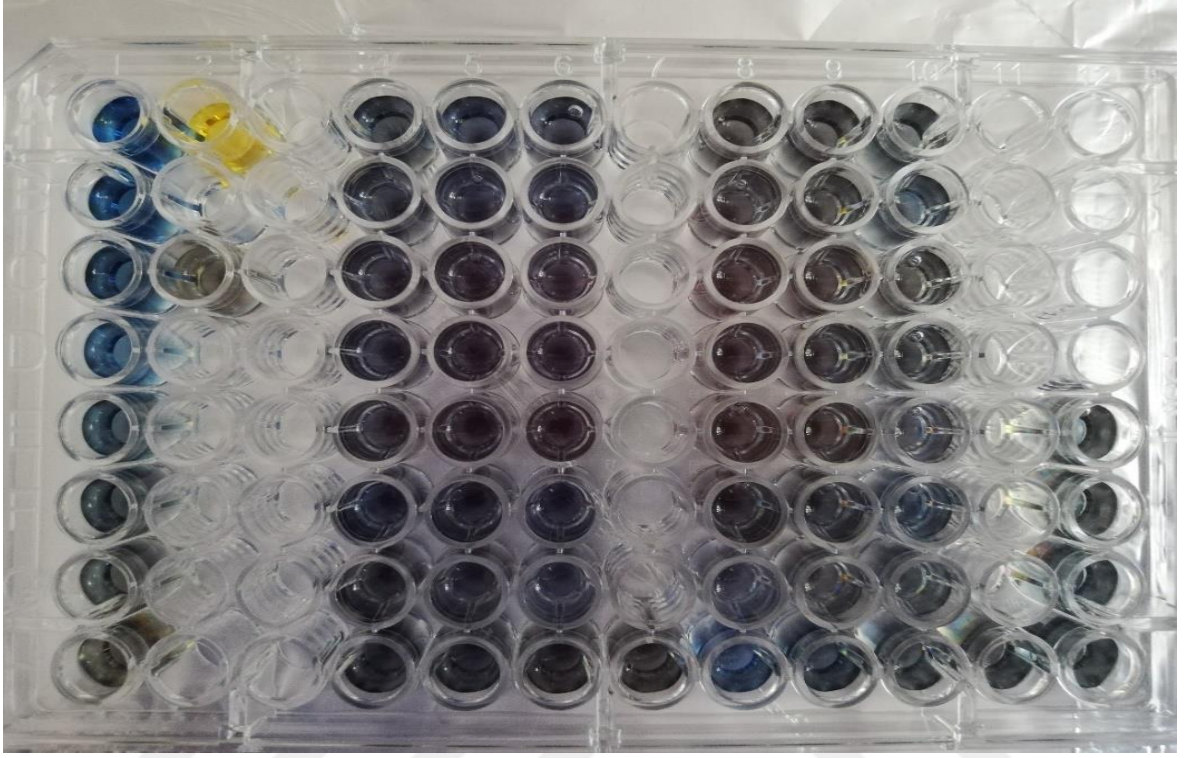
4.9.7. Ca²⁺ MİKTARI TAYİNİ

Ca²⁺ Miktarı Tayini için BioAssay Ca Assay Kit kullanıldı. Kit protokolü takip edilerek standartlar ve çalışma solüsyonu (Çizelge 4.7.) hazırlandı. Deiyonize su ile farklı seyreltme oranlarında () olacak şekilde standartlar hazırlandı. Çalışma solüsyonu için ise %50 Reaktif A ve %50 Reaktif B karışımı elde edildi.

Çizelge 4.7. Standartların seyreltme oranları

Standartların Hazırlanması	Ca ²⁺ Miktarı (mg/dl)
100 µl standart + 0 µl H ₂ O	20
80 µl standart + 20 µl H ₂ O	1
60 µl standart + 40 µl H ₂ O	6
40 µl standart + 60 µl H ₂ O	12
30 µl standart + 70 µl H ₂ O	8
20 µl standart + 80 µl H ₂ O	6
10 µl standart + 90 µl H ₂ O	4
0 µl standart + 100 µl H ₂ O	2

Seyreltilerek elde edilen standartları ve örnekleri ayrı kuyucuklara 5 µl (Şekil 4.12.) eklenir. Üzerine 200 µl çalışma solüsyonu eklenir. Ölçüm 612 nm dalgaboyunda yapıldı. NOT: Ca^{2+} miktar tayini için kitin önerdiği formül kullanıldı: $\text{mg/dl}_{\text{Ca}} = (\text{OD}_{\text{ÖRNEK}} - \text{OD}_{\text{KÖR}}) / \text{SLOPE}$



Şekil 4.12. Ca^{2+} miktar tayini görüntüsü

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. PLASENTA MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KARAKTERİZASYONU

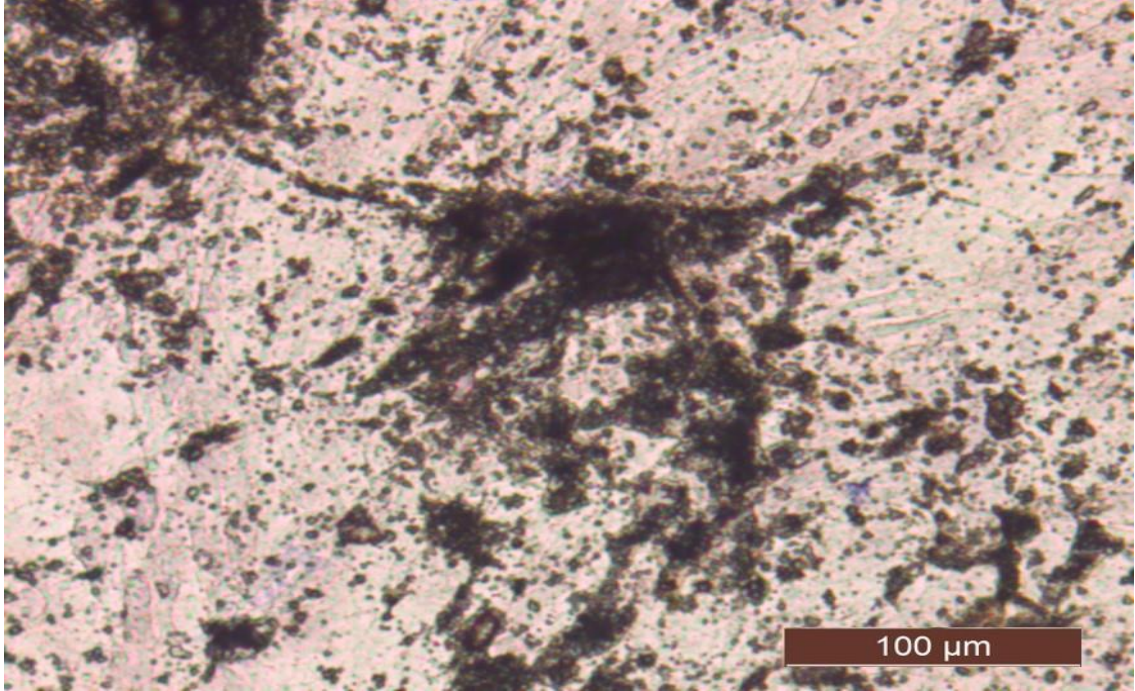
5.1.1. PLASENTANIN KISIMLARININ GENEL GÖRÜNTÜSÜ

Hücre kültürüne alınan plasenta MKH'lerinin invert mikroskop (T1-SM Nikon) ile izolasyondan sonra her pasajda (Şekil 5.1.) fotoğrafları çekilerek takip edildi. Hücreler başta yuvarlak bir morfoloji sergilerken zaman içerisinde fibroblast benzeri görüntü oluşturmaya başladı. Tam olarak fibroblast benzeri görüntünün elde edilmesi ise ilerleyen pasajlarda mümkün oldu.

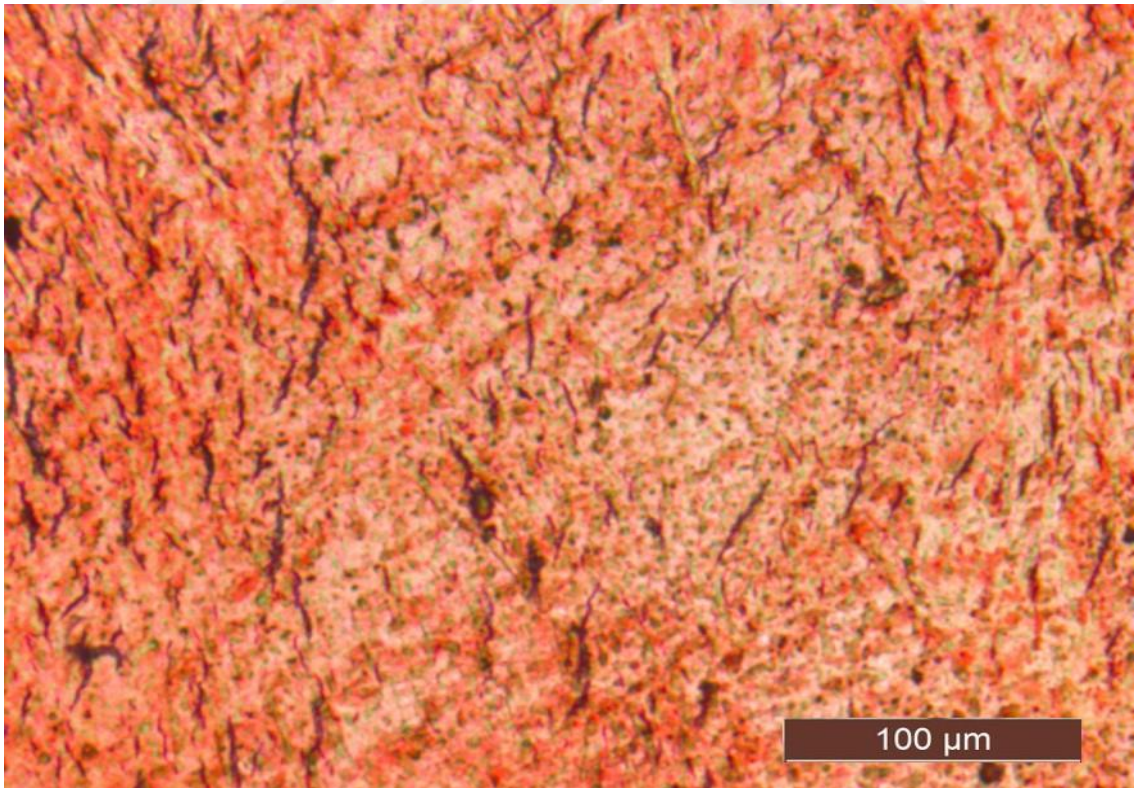
P0	
P1	

Şekil 5.1. AZ-MKH farklılaşmasının ışık mikroskobu görüntüleri

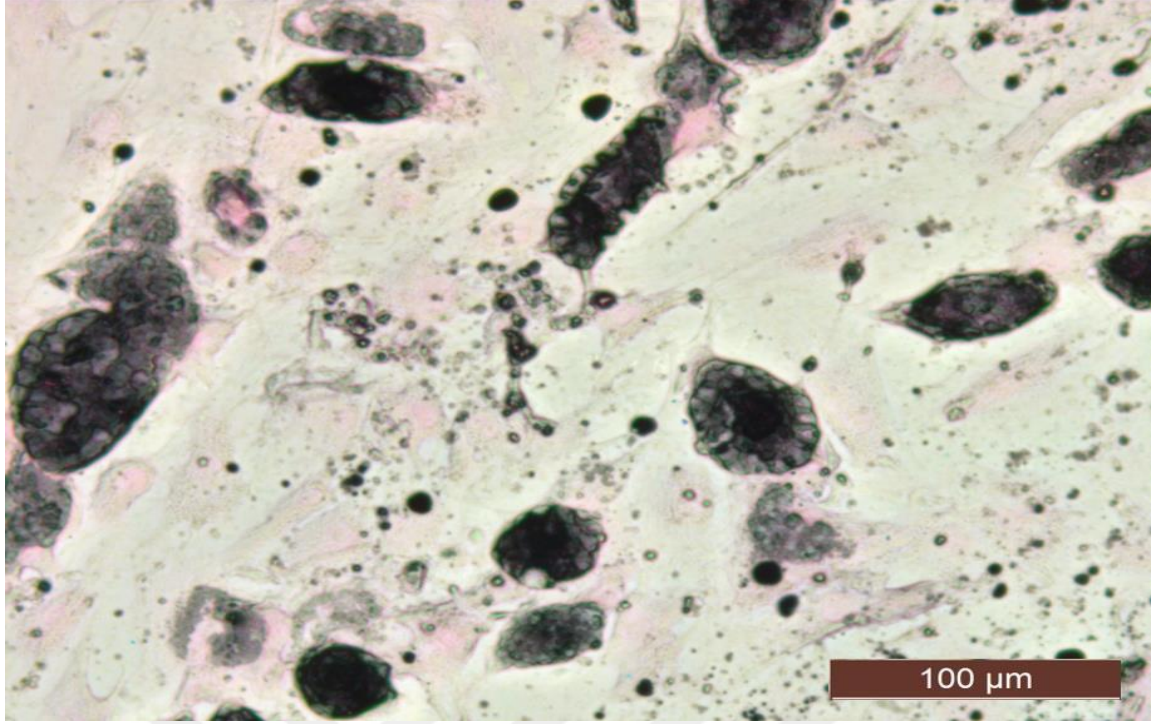
5.1.2. AZ-MKH ÜÇLÜ-SOYA FARKLILAŞMA (OSTEOJENİK, ADİPOJENİK KARDİYOJENİK) HİSTOKİMYASAL BOYAMALARI



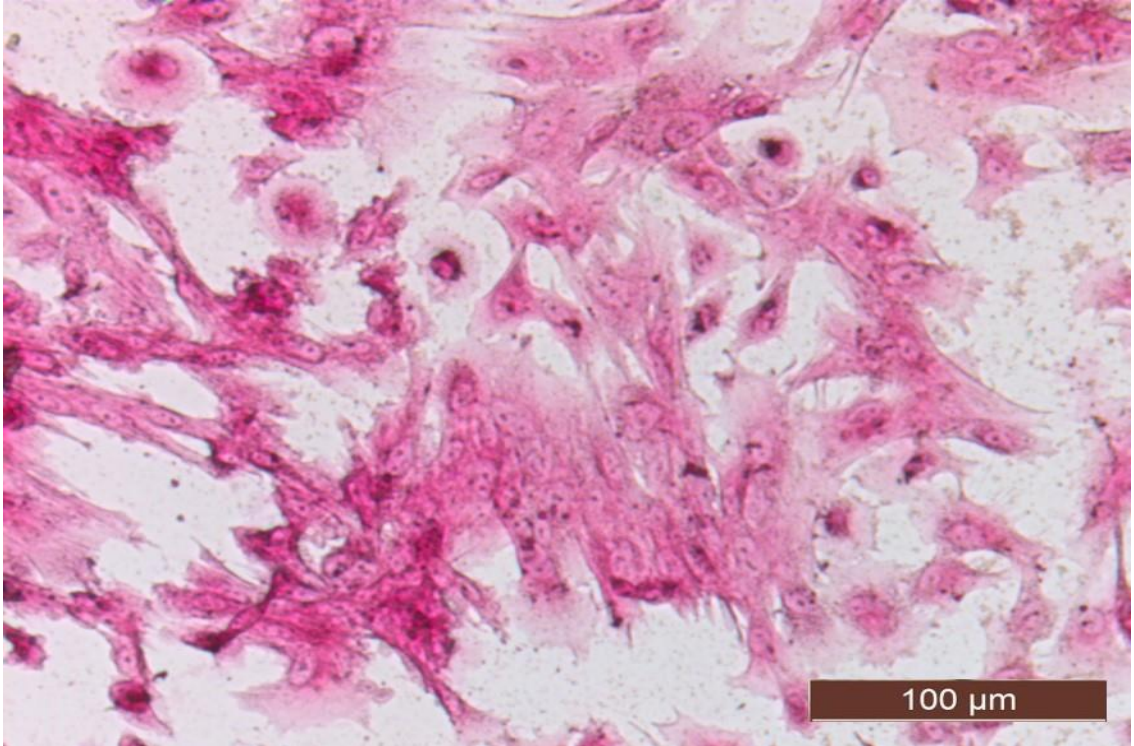
Şekil 5.2. AZ-MKH'lerin osteojenik farklılaşmasının Von Kossa boyaması ile gösterimi.



Şekil 5.3. AZ-MKH osteojenik farklılaşmasının Alizerin kırmızısı boyaması ile gösterimi.



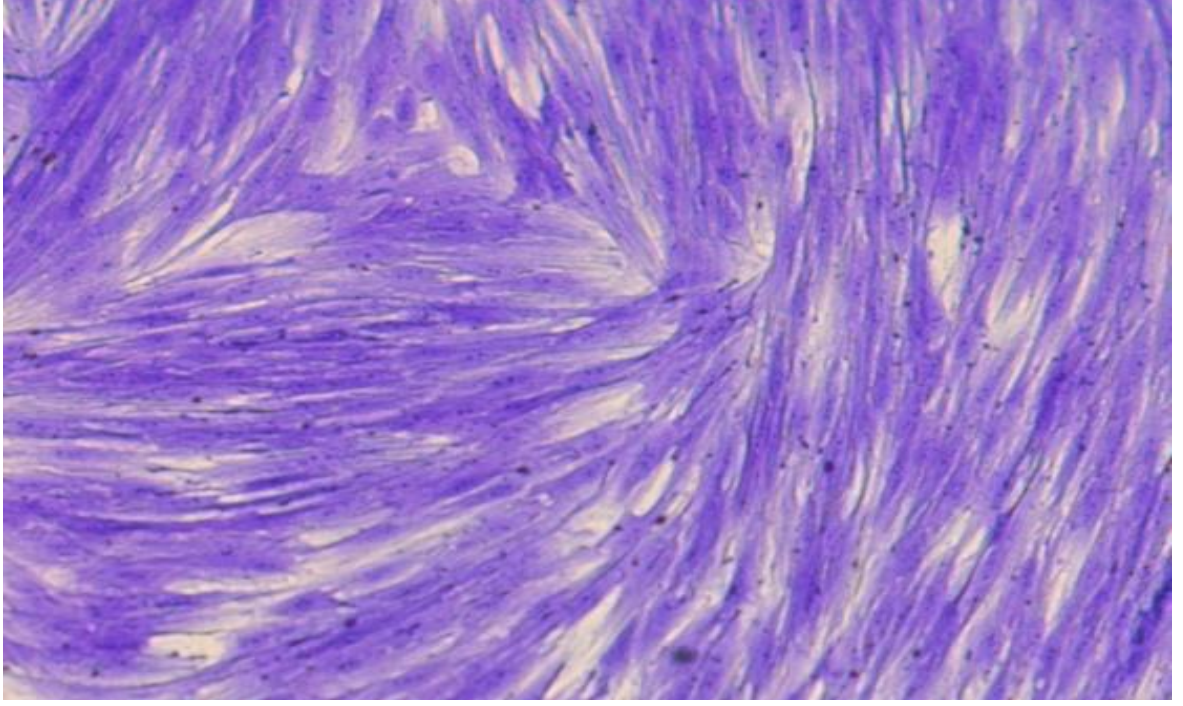
Şekil 5.4. AZ-MKH'lerin adipojenik farklılaşma potansiyelinin sudan siyahı boyası ile gösterimi. Lipidler siyah renk iken çekirdekler kırmızı renk olarak görülmektedir.



Şekil 5.5. AZ-MKH'lerinin kardiyojenik farklılaşma potansiyeli hemotoksilen eozin boyası ile gösterildi. Kardiyomiyosit benzeri hücre formasyonları pembe renk olarak görülmekte.

5.1.3. COLONY FORMİNG UNİT (CFU) OLUŞUM GÖRÜNTÜSÜ

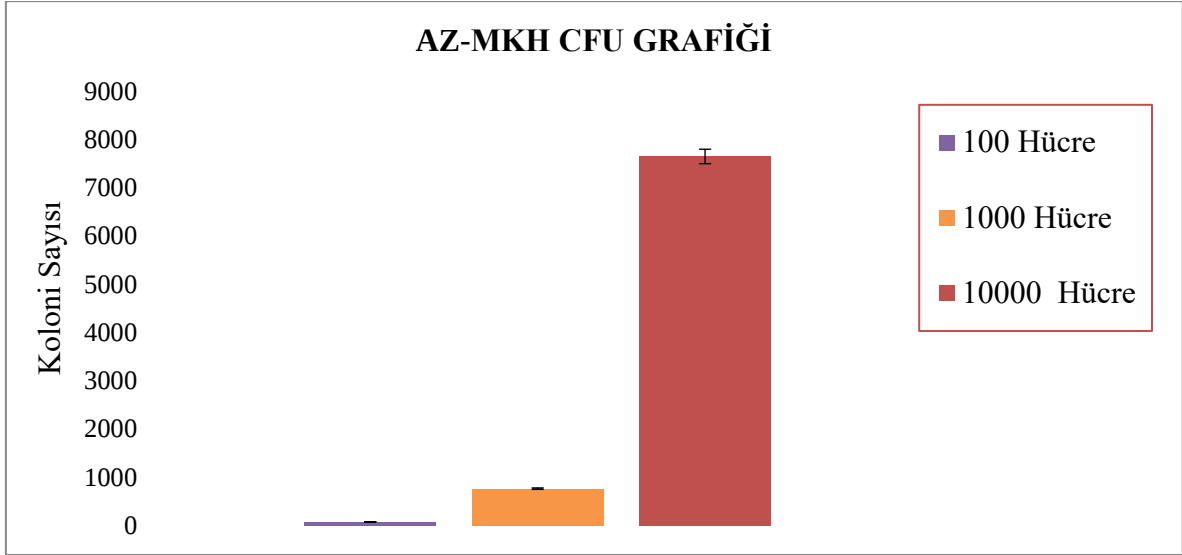
AZ-MKH'lerinin koloni oluşturma kapasitesinin belirlenmesi için farklı yoğunluklarda ekim yapıldı. Üç farklı grup içinde AZ-MKH'leri başarılı bir şekilde koloni (Çizelge 5.1.) oluşturabildi. Mikroskopik görüntüsüyle (Şekil 5.6.) koloni oluşturabildiği ve grafikte de (Şekil 5.7.) koloni sayıları gösterildi.



Şekil 5.6. CFU oluşumunun mikroskopik görünümü.

Çizelge 5.1. AZ-MKH'lerinin oluşturdukları koloni sayıları

100 hücre ekildiğinde koloni oluşumu	1000 hücre ekildiğinde koloni oluşumu	10000 hücre ekildiğinde koloni oluşumu
75	750	7500
78	780	7800



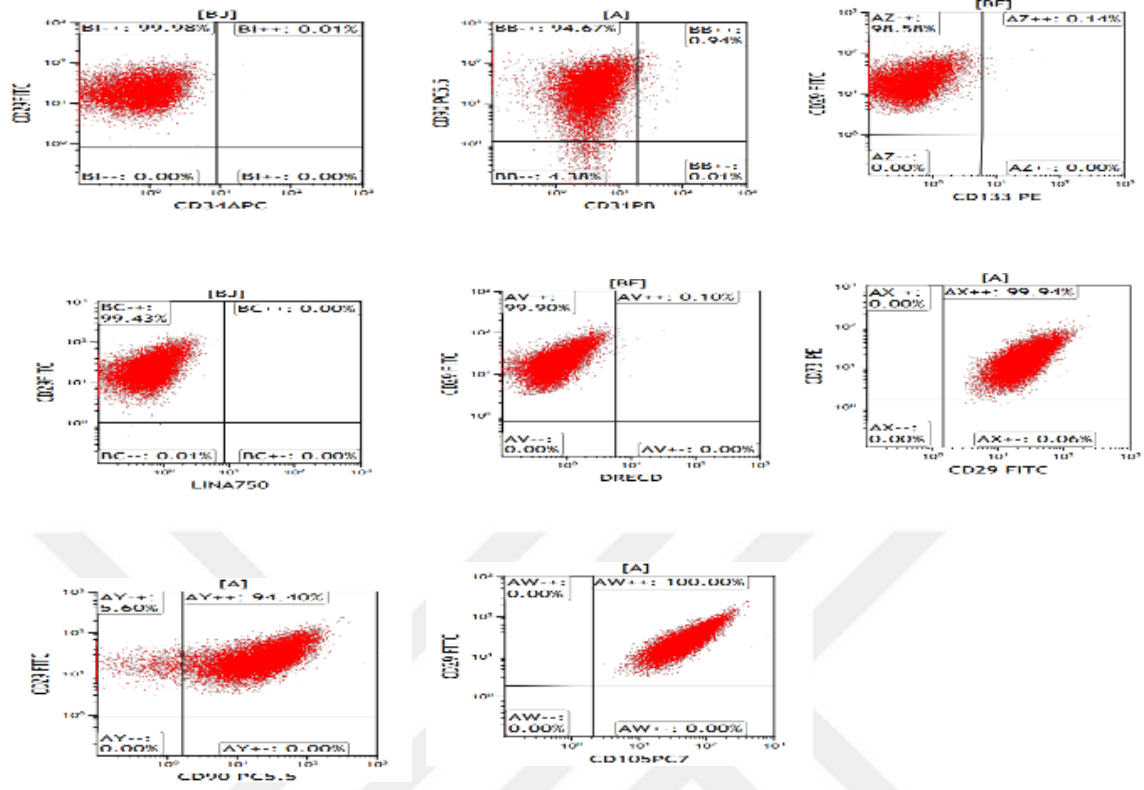
Şekil 5.7. AZ-MKH'lerin 100, 1000 ve 10000 hücre/cm² yoğunlukta oluşturabildiği koloni sayısı.

5.1.4. AKIM SİTOMETRİ-İMMÜN FENOTİPLEME ÇALIŞMALARI

Plasentadan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin hepsi yüksek düzeyde MKH belirteçlerini (CD73, CD90, CD105 ve CD29) ifade ediyorken, hemapoiyetik kök hücre belirteçlerini (CD34, CD31, CD133, LIN, HLA) ifade etmemektedir (Çizelge 5.2., Şekil 5.8.).

Çizelge 5.2. AZ-MKH akım sitometri çalışmasının sonuçları

	AMNİYOTİK ZAR (n=3)	
YÜZEY BELİRTECİ	EKSPRESYON (%)	SONUÇLAR
CD34 APC	0.01	NEGATİF
CD31PB	0.94	NEGATİF
CD133PE	0.14	NEGATİF
LINA750	0	NEGATİF
HLA-DRECD	0.10	NEGATİF
CD73PE	99.94	POZİTİF
CD90 PC5.5	94.40	POZİTİF
CD105 PC7	100.00	POZİTİF
CD29FITC	98.33	POZİTİF



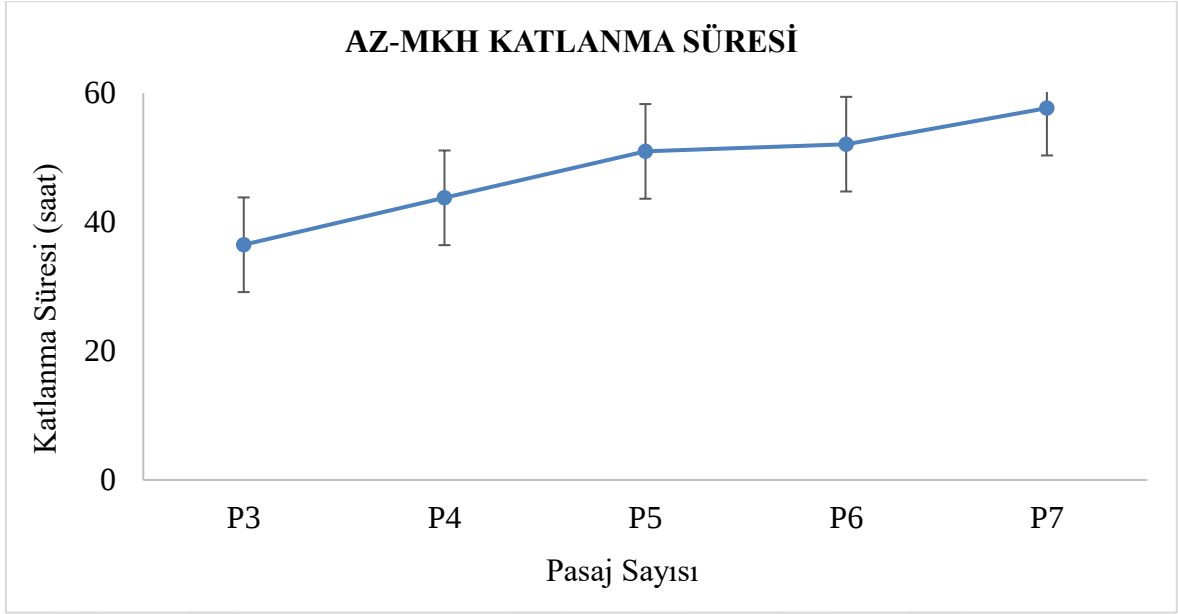
Şekil 5.8. AZ-MKH'lerin akım sitometri sonuçlarının toplu gösterimi.

5.1.5. KATLANMA SÜRESİ SONUÇLARI

Katlanma süresi analizi (Çizelge 5.3.) hücrelerin ve popülasyonun poliferasyon potansiyelini belirlemektedir. AZ-MKH'leri Pasaj 3'ten 7'ye (n=3 örnek) kadar alt kültür yapılmıştır. Katlanma süresi ortalama 45 saat olarak bulunmuştur (Şekil 5.9.).

Çizelge 5.3. Pasaj sayısına göre AZ-MKH'lerinin katlanma süresi

Pasaj Sayısı	Katlanma Süresi (saat)
P3	36,47
P4	43,75
P5	50,95
P6	52,07
P7	57,66



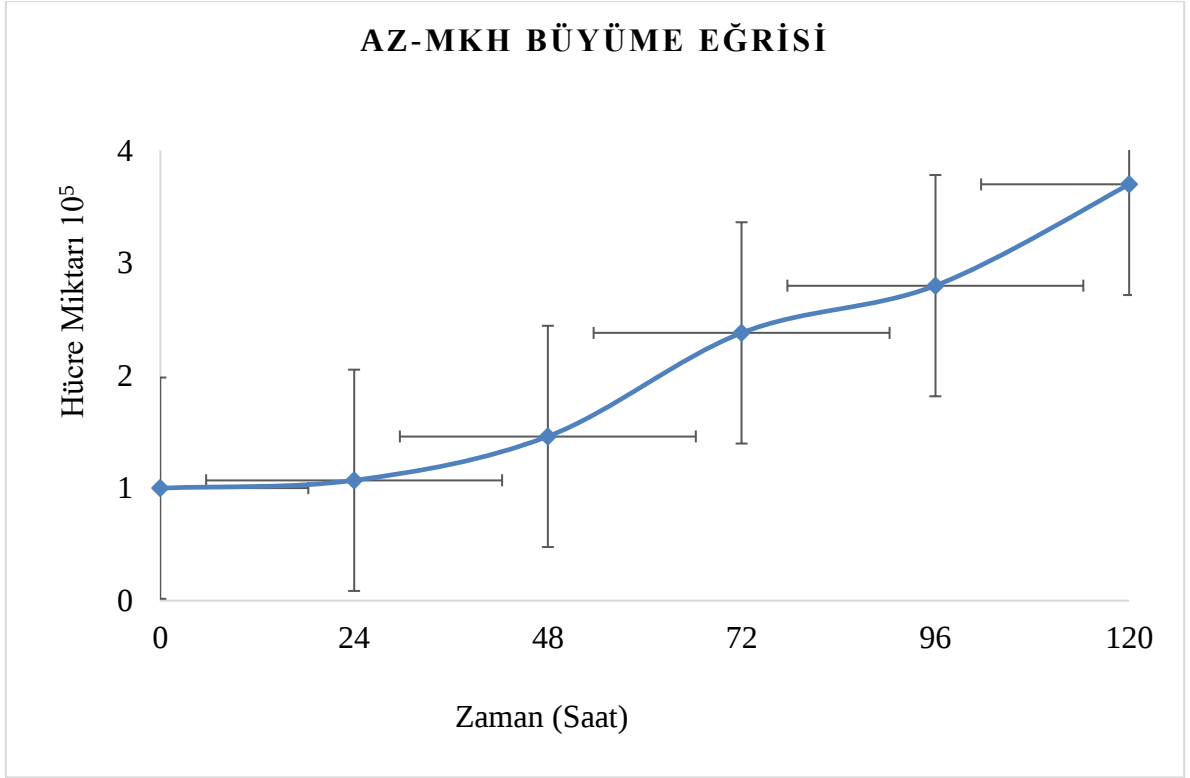
Şekil 5.9. AZ-MKH'lerin katlanma sürelerini gösteren grafik.

5.1.6. AMNİYOTİK ZAR MKH BÜYÜME EĞRİSİ SONUÇLARI

AZ-MKH'leri 10^5 hücre/cm² yoğunlukta ekildi. Her 24 saatte bir hücre miktarı (Çizelge 5.4.) tekrar sayıldı. Hücrelerin kültür kabının yüzeyini tamamen kaplaması için 120 saat geçtiği (Şekil 5.10.) belirlendi.

Çizelge 5.4. Saatlik olarak AZ-MKH'lerinin artış miktarı

SAAT	HÜCRE SAYISI
0.saat	10^5
24. saat	$1,07 \times 10^5$
48.saat	$1,46 \times 10^5$
72. saat	$2,38 \times 10^5$
96. saat	$2,8 \times 10^5$
120.saat	$3,7 \times 10^5$

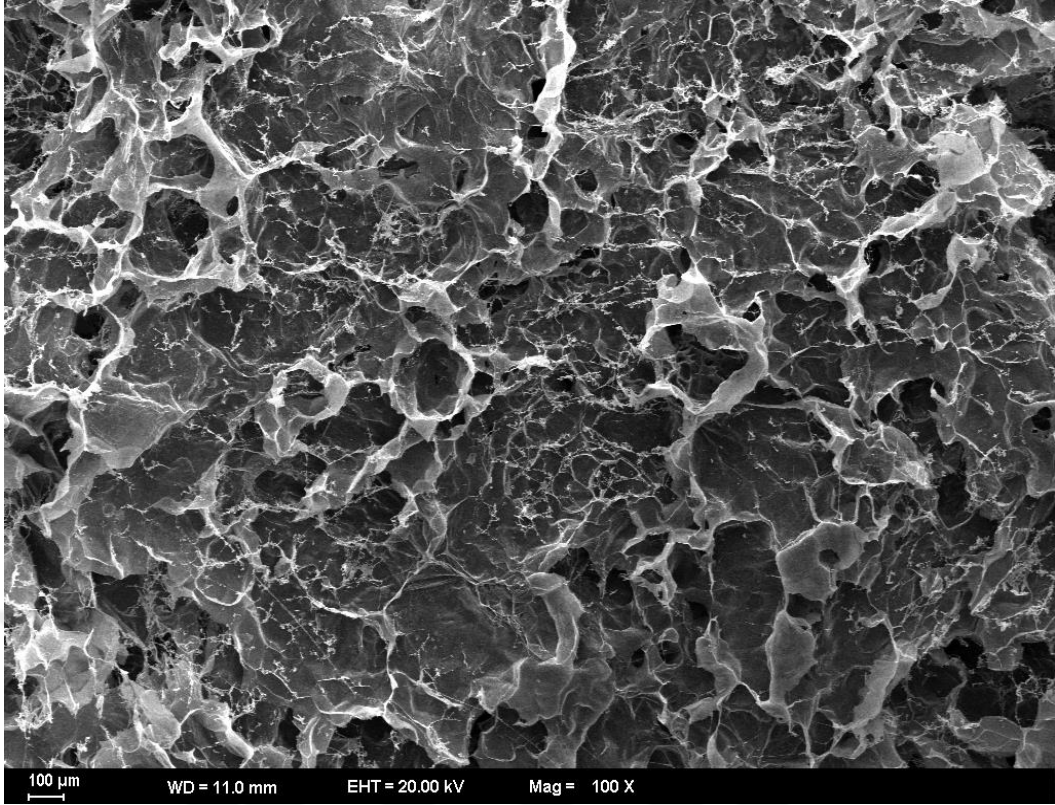


Şekil 5.10. AZ-MKH miktarının saatlik artışı

5.2. KEMİK DOKUNUN HÜCRESİZLEŞTİRİLME VERİMLİLİĞİ

5.2.1. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) GÖRÜNTÜLERİ

DKM'nin yüzey morfolojisi SEM analizi ile incelendi. Ayrıca SVS ile muamele edilen DKM'nin mineralizasyonunun arttığı ve yüzeyi kaplamaya başladığı da belirlendi (Şekil 5.11. ve Şekil 5.12.).



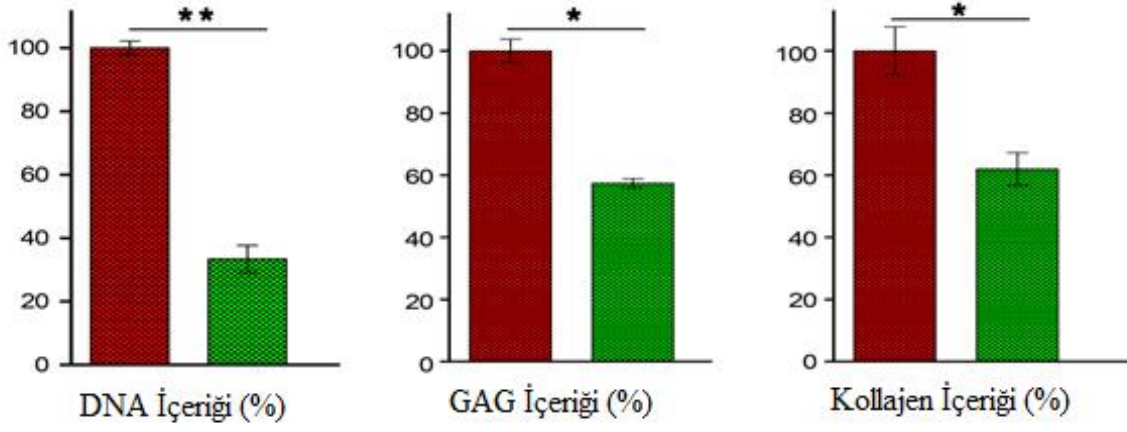
Şekil 5.11. Deselülerize ve demineralize kemik matriksinin SEM görüntüsü



Şekil 5.12. SVS ile inkübe edilmiş DKM'nin SEM görüntüsü

5.2.2. GAG (GLİKOZAMİNOGLİKAN), DNA, KOLAJEN İÇERİĞİ SONUÇLARI

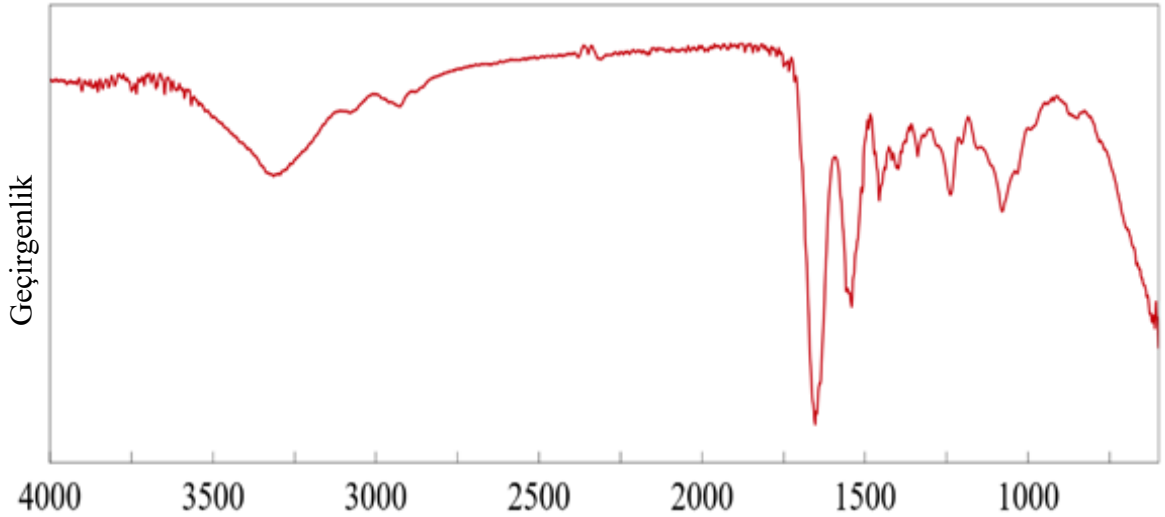
DKM hidrojellerinin hücreleştirilmesinin verimliliğinin anlaşılabilmesi için DNA, GAG ve kolajen içeriği (Şekil 5.13.) tespit edildi.



Şekil 5.13. DNA, GAG ve kolajen içeriğinin yüzde olarak grafiği

5.2.3. FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR) SONUÇLARI

DKM hidrojelinin kimyasal karakterizasyonunun sağlanması için FTIR analizi (Şekil 5.14.) gerçekleştirildi.



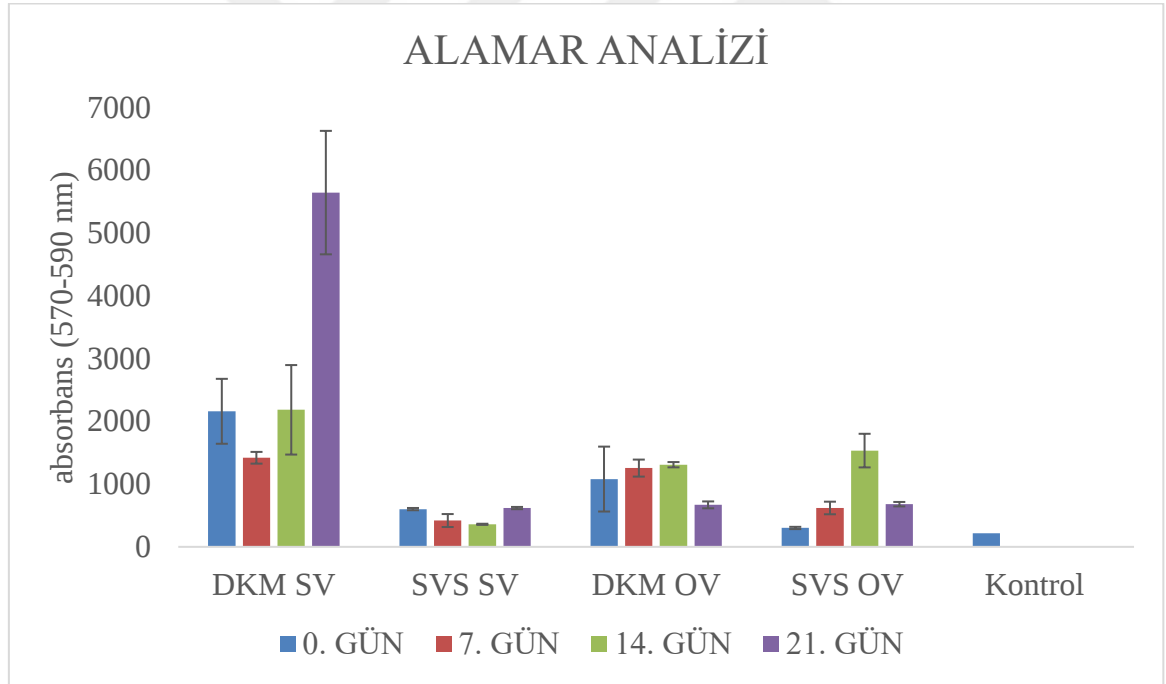
Şekil 5.14. DKM hidrojelinin FTIR spektrumu.

5.3. HÜCRE- BİYOKOMPOZİT ETKİLEŞİMİ

5.3.1. HÜCRE CANLILIĞI (ALAMAR MAVİSİ) ANALİZİ SONUÇLARI

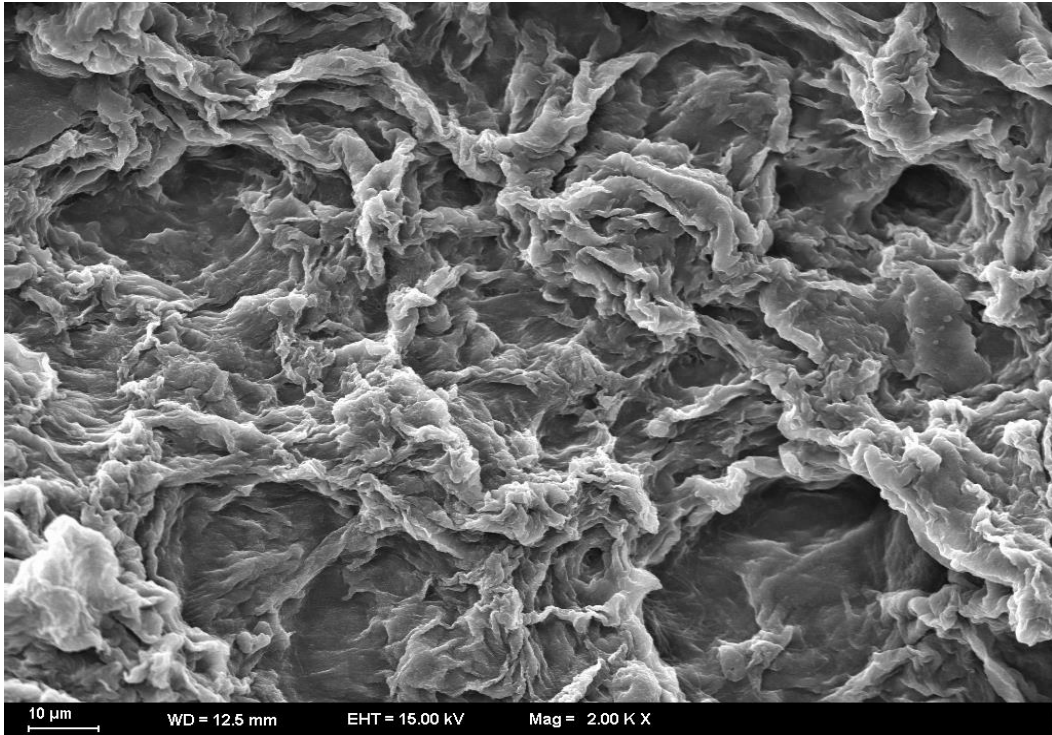
Çizelge 5.5. Dört deney grubu için hücre canlılığı sonuçları

Günler	DKM-SV	DKM-OV	SVS-SV	SVS-OV
0	1080,13	1080,13	300,555	300,555
7	709,755	1255,1	209,52	619,34
14	1091,86	1309	179,5	1534
21	5646	618	669	680

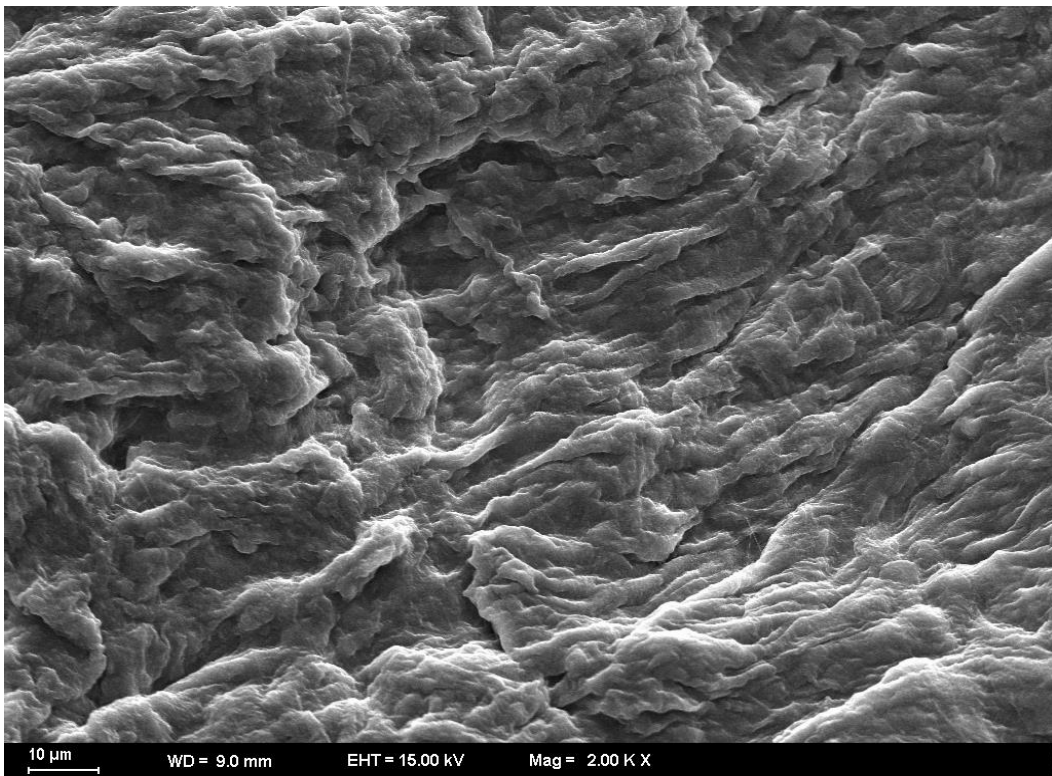


Şekil 5.15. Hücre tohumlanan deney grupları sol baştan sırasıyla, deselülerize kemik matriksi standart vasatta, SVS ile muamele edilmiş DKM standart vasatta, DKM osteojenik vasat ve SVS ile muamele edilmiş DKM osteojenik vasatta 0, 7, 4 ve 21. günlerde analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilir; (n=3)

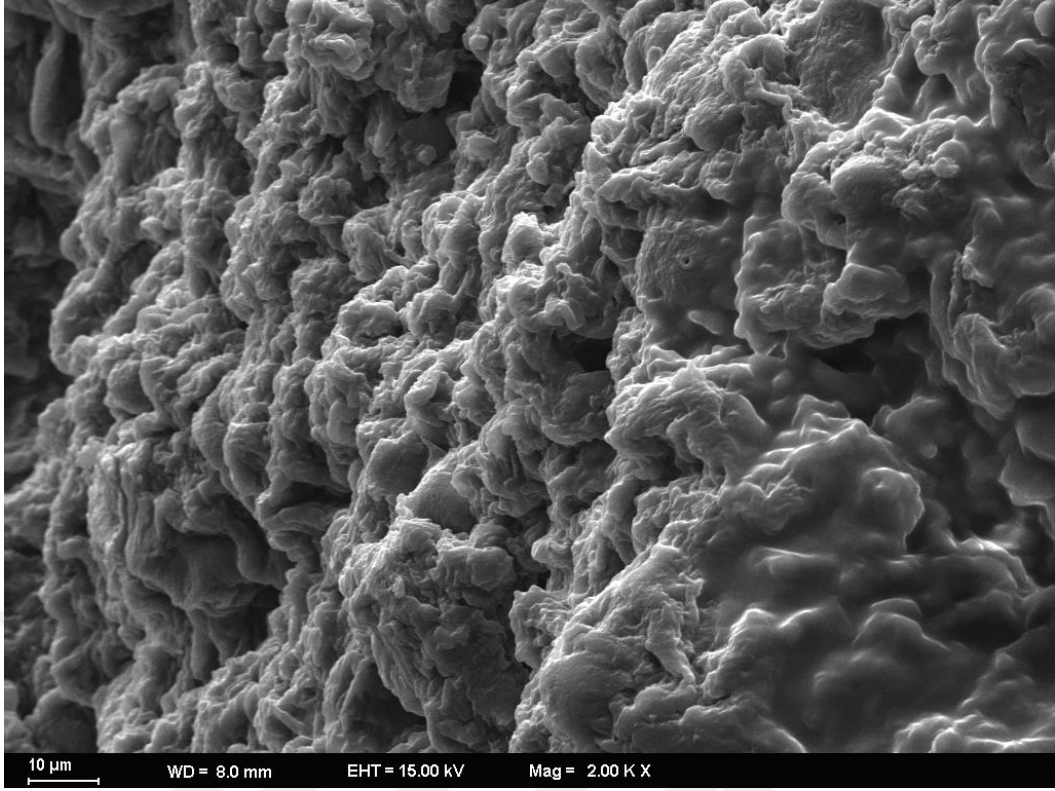
5.3.2. AZ-MKH'LERİNİN DKM ÜZERİNDEKİ SEM GÖRÜNTÜLEMELERİ (0G, 7G, 14G)



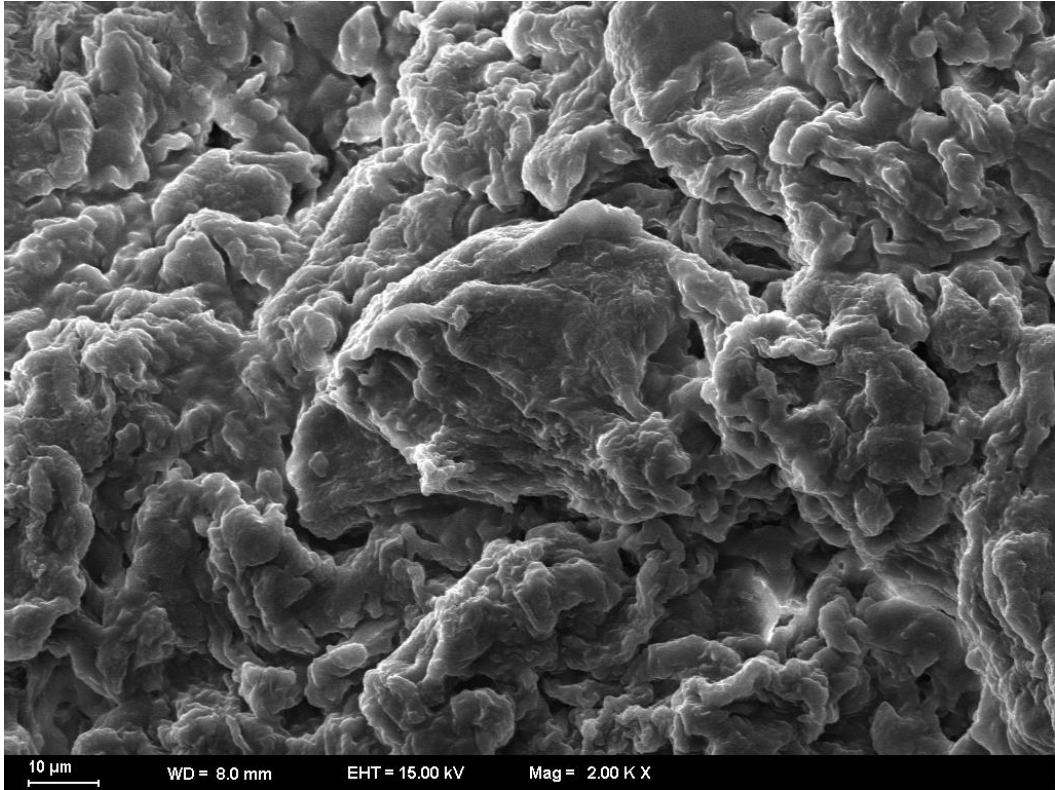
Şekil 5.16. AZ-MKH tohumlanan DKM'nin standart vasat 1. gün SEM görüntüsü



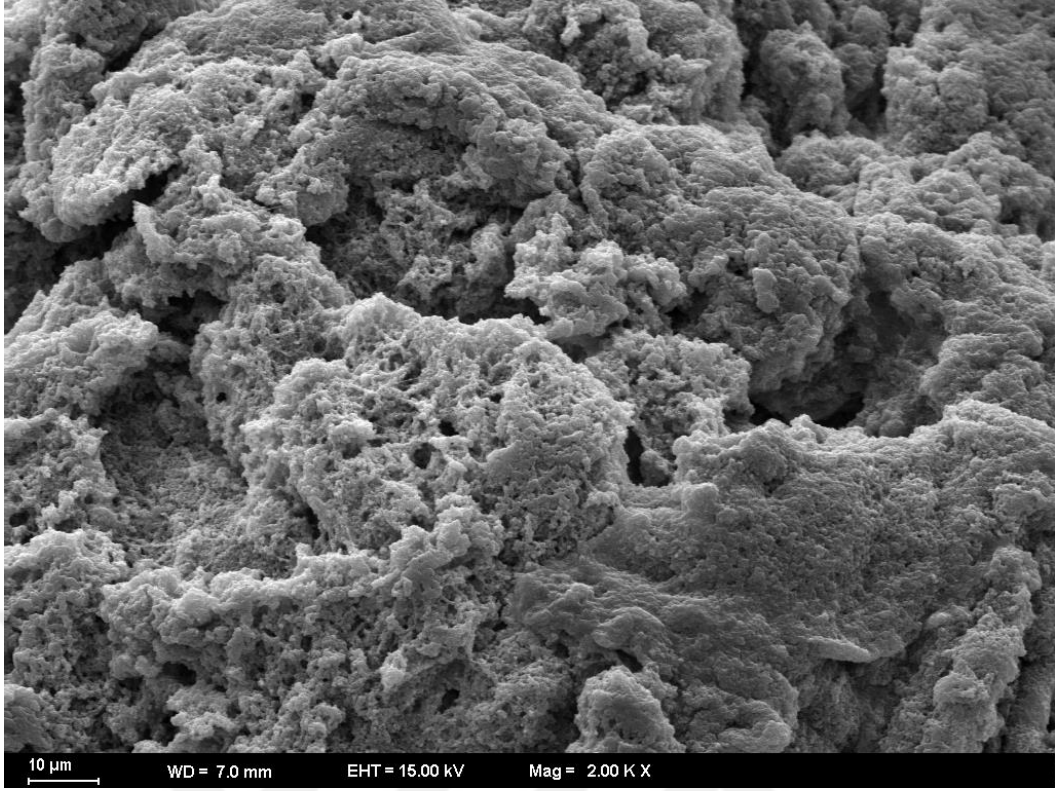
Şekil 5.17. AZ-MKH tohumlanan DKM'nin standart vasat 7. günde SEM görüntüsü



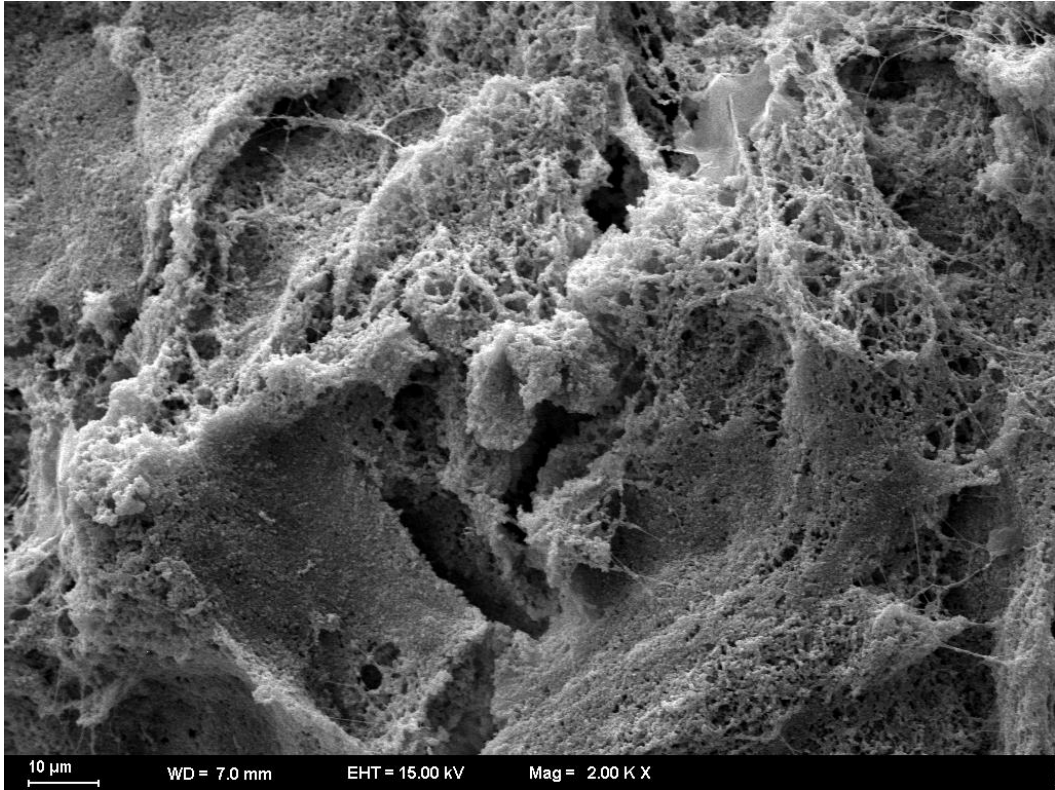
Şekil 5.18. AZ-MKH tohumlanan DKM'nin osteojenik vasat 7. günde SEM görüntüsü



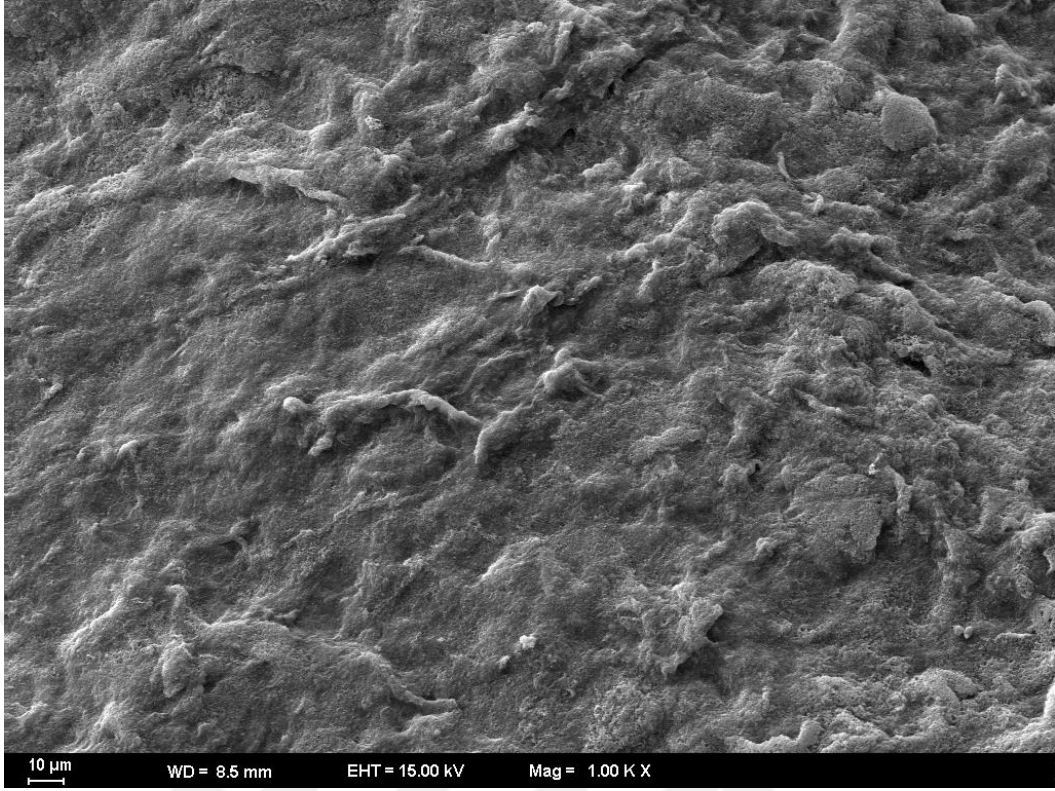
Şekil 5.19. AZ-MKH tohumlanan DKM'nin osteojenik vasat 14. günde SEM görüntüsü



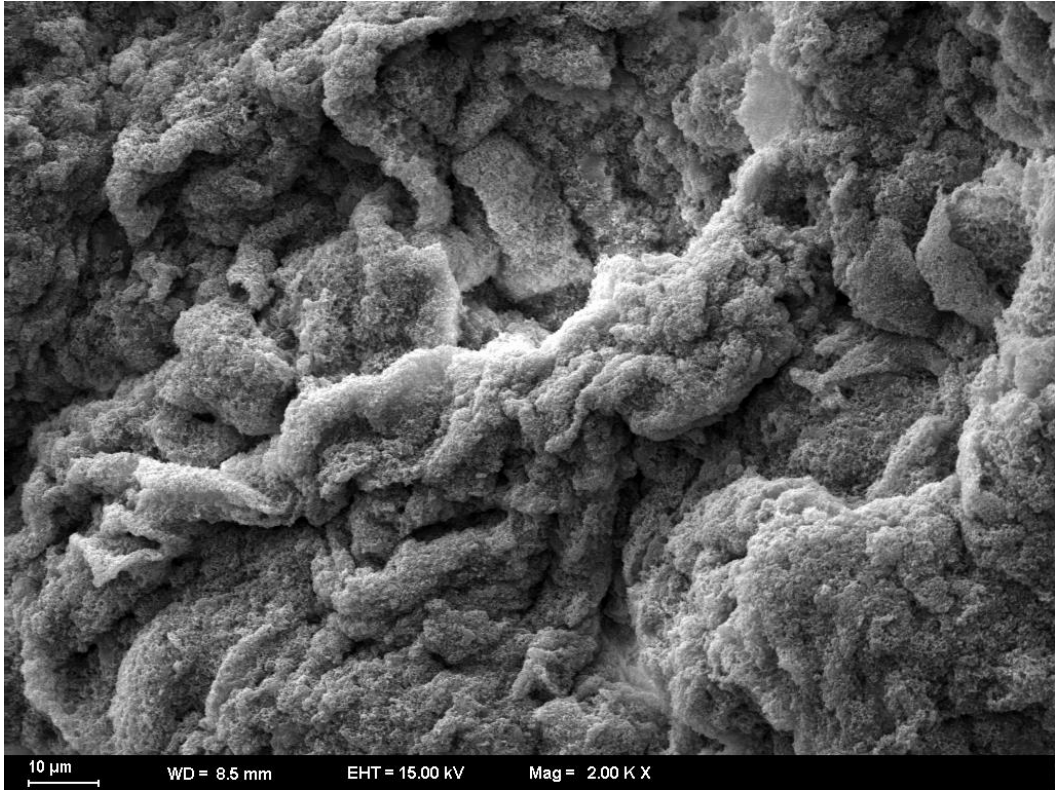
Şekil 5.20. AZ-MKH tohumlanan SVS-DKM'nin standart vasat 1. günde SEM görüntüsü



Şekil 5.21. AZ-MKH tohumlanan SVS-DKM'nin standart vasat 7. günde SEM görüntüsü



Şekil 5.22. AZ-MKH tohumlanan SVS-DKM'nin osteojenik vasat 7. günde SEM görüntüsü



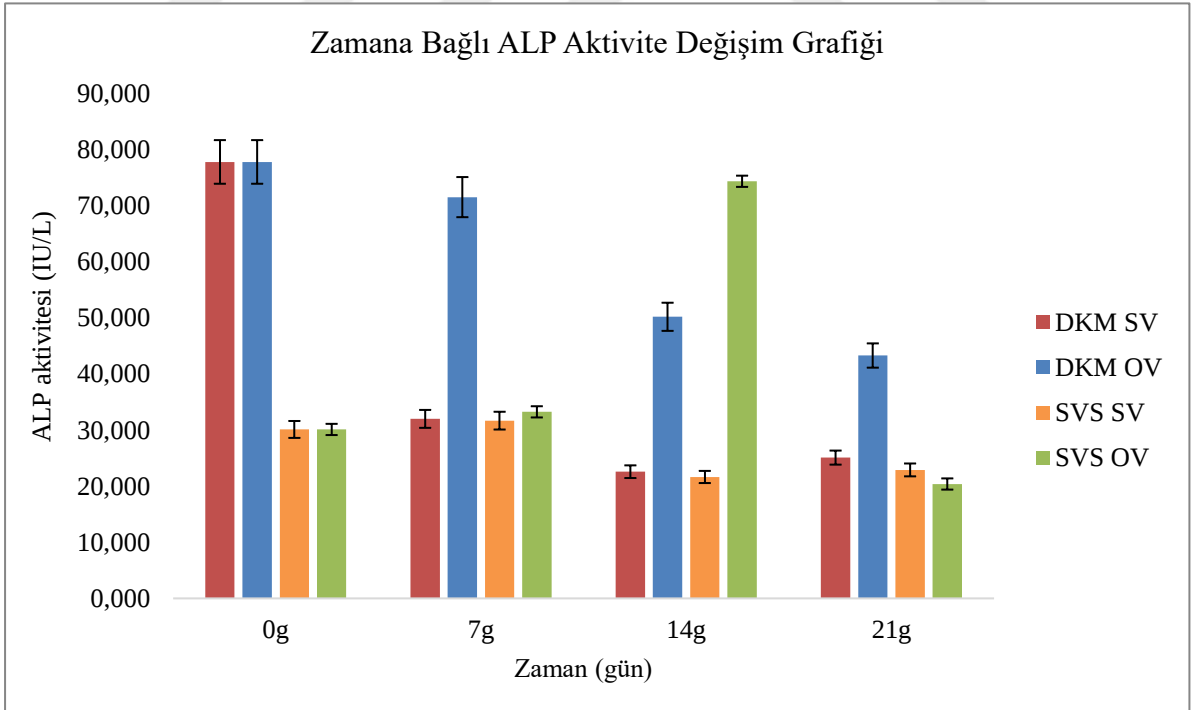
Şekil 5.23. AZ-MKH tohumlanan SVS-DKM'nin osteojenik vasat 14. günde SEM görüntüsü

5.3.3. ALP MİKTARI TAYİNİ

Her 2 güne bir besiyeri değiştirilen örneklerin seçilen günlerde (0, 7, 14, 21, 28) besiyeri toplanarak analizler için -80 °C’de saklanmıştır. Analiz için ALP kiti kullanılmıştır. Kitin protokolü uygulanarak t1 (0. dakika) ve t4 (4. dakikada) absorbans (405 nm) ölçümü (Şekil 5.24.) alınmıştır. Protokol takip edilerek ALP miktarı (Çizelge 5.6.) hesaplanmıştır.

Çizelge 5.6. Deney gruplarının 0, 7, 14 ve 21. Günlerdeki ALP miktarı

Günler	DKM-SV	DKM-OV	SVS-SV	SVS-OV
0	77,817	77,817	30,123	30,123
7	32,005	71,541	31,691	33,260
14	22,592	50,204	21,651	74,365
21	25,102	43,301	22,906	20,395



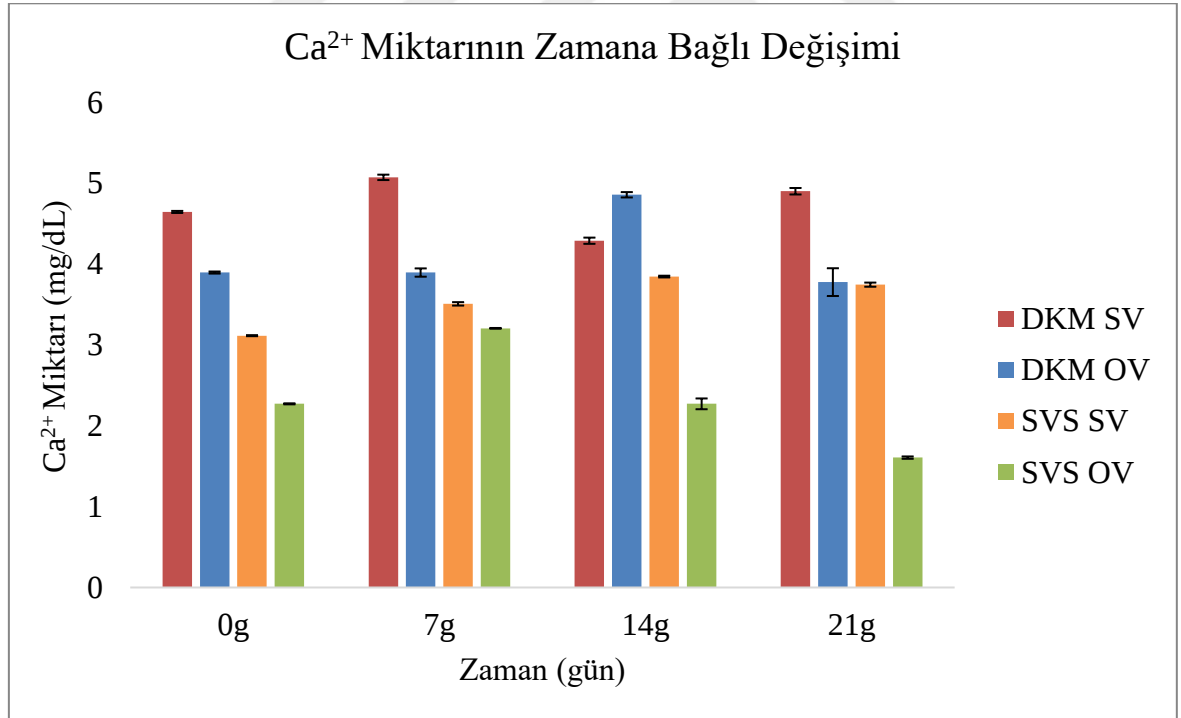
Şekil 5.24. Zamana bağlı ALP miktarı değişimi.

5.3.4. Ca^{2+} MİKTARI TAYİNİ

Her 2 güne bir deney gruplarının besiyeri değiştirildi. Örneklerin seçilen günlerde (0, 7, 14, 21, 28) besiyeri toplanarak analizler için $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Besiyeri 3 farklı örnekten toplanmıştır. Ca^{2+} kitinin protokolü takip edilerek miktar tayini (Çizelge 5.7.) yapıldı. 3 dakikalık oda koşullarında inkübasyondan sonra absorbans (612 nm) ölçümü (Şekil 5.25.) yapılmıştır.

Çizelge 5.7. Belirlenen zaman noktalarında Ca^{2+} miktarları

Günler	DKM-SV	DKM-OV	SVS-SV	SVS-OV
0	4,646360512	3,896594814	3,115588878	2,272102468
7	5,074351765	3,896594814	3,50921587	3,206185567
14	4,290221806	4,858794127	3,846610434	2,272102468
21	4,902530459	3,777881912	3,746641674	1,606685411



Şekil 5.25. Zamana bağlı Ca^{2+} miktarı değişimi.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kök hücreler kendisini yenileme ve farklılaşma potansiyeline sahip olan hücrelerdir. Bu hücreler embriyonik kök hücreler gibi bir canlıyı meydana getirememekte ise de, mezodermal kökenli hücre tiplerine (adiposit, osteosit, kondrosit vb.) farklılaşabilirler (133). Mezenkimal kök hücreler farklı kaynaklardan elde edilebilmektedir. Elde edildikleri kaynağa bağlı olarak özellikleri da farklılık göstermektedir (134–138) .

Plasenta ise yeni bir mezenkimal kök hücre kaynağı olarak araştırılmaktadır. Plasentanın farklı bölgeleri bulunmakta olup bu bölgelerden mezenkimal kök hücre elde edilebilmektedir (139). Barlow ve arkadaşları, P-MKH ve kemik iliğini biyolojik özellikleri açısından karşılaştırmıştır. P-MKH'lerin kemik iliği kök hücrelerine göre daha hızlı çoğaldığını, MKH belirteçlerini benzer şekilde ifade ettiğini, fibroblastoid yapıdaki hücre morfolojilerinin de benzerlik gösterdiğini raporlanmıştır (140). Bu tez çalışmasında, Pelekanos ve arkadaşlarının plasenta kökenli mezenkimal kök hücre izolasyonu protokolü uyarlanarak, enzimatik sindirim ve mekanik diseksiyon ile başarılı bir şekilde MKH izolasyonu gerçekleştirilmiştir (2). Plasenta desidual bazalis, koryonik tabaka, koryonik damarlar, göbek kordonu, amniyotik zar olarak bölgelere ayrılmıştır. Bu bölgelerden izole edilen MKH'lerin karakteristik özellikleri benzerlik gösterse bile bazı farklılıklar içermektedir. Çalışmamızda kullandığımız amniyotik zar kökenli MKH'lerin çoğalma ve farklılaşma potansiyelinin plasentanın diğer bölgelerinden elde edilen MKH'lere göre daha yüksek olduğu geçmişte gösterilmiştir (58). Amniyotik zar elde edilmesi diğer kaynaklara göre daha kolay olup, biyolojik bir atık olması nedeniyle etik problemlere yol açmamaktadır. Amniyotik zarın küçük bir bölümünden elde edilen doku parçasından aynı miktarda kemik iliğinden elde edilen dokudan daha fazla mezenkimal kök hücre elde edilebilmektedir (58).

Plasenta amniyotik zar kökenli mezenkimal kök hücrelerin morfolojik özelliklerinin gösterilmesi için mikroskopik incelemeler farklı pasajlarda gerçekleştirilmiştir ve literatür ile uyumlu morfolojiler gözlenmiştir (141–143). Çalışmamızda gerçekleştirilen histokimyasal boyamalarda plasenta kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin In't Anker ve arkadaşlarının bildirdiği gibi adipojenik ve osteojenik mezodermal soylara farklılaşma potansiyeli bulunduğu, literatür ile uyumlu şekilde gösterilmiştir (97,142). AZ-MKH'nin kardiyojenik farklılaşma potansiyeli olduğu histokimyasal boyamalar ile gösterilmiştir (144). Yine, AZ-MKH'lerin koloni oluşturma kapasitesi (CFU) bulunduğu literatüre uygun şekilde gösterilmiştir (145,146). Bundan sonra, MKH'lerin mezenkimal ve hematopoietik

kök hücre yüzey belirteçlerini ifade etme durumuna bakılmıştır. Sonuçlar literatür ile örtüşen şekilde CD105, CD73, CD90, CD29 belirteçleri için yüksek oranda pozitif iken, LINA 750, HLA-DR, CD34, CD31, CD133 gibi hematopoietik kök hücre yüzey belirteçlerinin ifadesi bakımından negatif olarak belirlenmiştir (42,99,137,147,148).

Wu ve arkadaşlarının farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lerin proliferasyon analizlerinde ise, erken aşamalarda AZ-MKH'lerin Kİ-MKH'lerinden daha iyi bir çoğalma yeteneği olduğu gösterilmiştir (146). Bu tez kapsamında ise AZ-MKH'lerinin hücre poliferasyon kabiliyetinin anlaşılması için katlanma süresi ve büyüme kinetiği analizleri yapılmıştır. Katlanma süresi bulgularında hücrelerin 3. Pasajdan (P3) itibaren sağlıklı bir şekilde çoğaldığı ve hücrelerin kültür kabını kaplama süresinin kısaldığı gözlenmiştir. Bu çalışmada hücrelerin katlanma süresi $41 \pm 7,3$ saat olarak belirlenmiştir. Büyüme kinetiği çalışmasında ise, hücreler günlük olarak tripsin enzimi yardımı ile kültür kabı zemininden kaldırılarak sayılmıştır. Günlük olarak hücrelerin büyümesi devam etmiş ve literatür ile eşleşen sonuçlar belirlenmiştir (149). Bu çalışmada AZ-MKH'lerin, mezenkimal kök hücrelerin sahip olması beklenen belirgin özellikleri sergiledikleri gösterilmiştir.

Özellikle memeli doku veya organlarının travma ya da fonksiyon kaybı gibi durumlarda yenilenme potansiyelinin düşük olduğu bilinmektedir. Bu bakımdan, son yıllarda yeni yaklaşımlara ve doku greftlerine olan ilginin arttığı görülmektedir. Bu kapsamda özellikle doğal dokulardan (kemik, kıkırdak, bağırsak vb.) elde edilen biyolojik greftler ön plana çıkmaktadır (130,150,151).

“Hücreleştirme teknolojisi” ile biyolojik yapıların doğal ECM formu korunarak iskele olarak elde edilmeleri mümkündür. Doğal yapı iskeleleri, hücrelerin tutunması ve farklılaşması için kalıp görevini üstlenebilmektedir. Doğal doku kaynaklı bu tip yapılar ile ilgili ciddi risk ise, antijenlerinden tamamen ayrılamama ihtimalidir. Diğer yandan, uygun yöntemler ile biyoaktif ECM bileşimi büyük ölçüde korunarak dokuya ait kalıntıların temizlenebildiği de bilinmektedir. Bu çalışmada, biyolojik doku kaynağı olarak sığır süngerimsi kemik dokusu kullanılmıştır. Süngerimsi kemik dokuda osteoprogenitörler, preosteoblastlar, osteoblastlar ve kök hücreler gibi çeşitli hücre tipleri bulunmaktadır. Çalışmamızda süngerimsi kemik dokunun kullanılmasının başlıca nedeni ise, kompakt kemiğe göre daha gözenekli bir yapıya sahip olması ve buna bağlı olarak gözenekli alandan hücrelerin uzaklaştırılmasının daha etkin bir şekilde gerçekleştirilebilmesidir (8).

Süngerimsi doku parçalarından, çeşitli asit karışımları kullanılarak, bünyelerindeki lipidlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Dokulardan lipidlerin uzaklaştırılma işleminin ardından hücresizleştirme işlemi gerçekleştirilmiş ve fizyolojik koşullar (pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonu) altında hidrojel formundaki DKM literatür ile uyumlu olarak oluşturulabilmiştir (152,153). Hücresizleştirme verimliliğinin anlaşılması için ise, DKM'nin DNA içerik analizleri yapılmıştır. Doku veya organlardan elde edilen deselülerize greftler /yapı iskeleleri için genel kabul gören DNA içeriği olan 50 ng/mg doku düzeyi (154) çalışmada elde edilmiş olup, DKM'nin DNA içeriği doğal kemik dokusuna göre yüzde yetmiş oranında azaltılmıştır.

Hücresizleştirmenin verimliliğinin anlaşılması için diğer bir yöntemde, sülfatlanmış GAG ve kolajen içeriğinin belirlenmesidir. Sülfatlanmış glikozaminoglikan zincirleri, protein yapılarına bağlanarak proteoglikanları oluşturan polisakkaritlerdir. Yapısında bir amino şeker ve heksuronik asit içeren tekrarlayan disakkarit dizelerinden oluşmaktadır. Kök hücrelerde ve diğer tüm hücre tiplerinde hücre içi ve hücre dışı matrikste bulunur. GAG'ların başlıca görevleri arasında, hücrelerin yapışması, çoğalması ve farklılaşması gibi temel hücresel olaylar yer almaktadır (152). Bu tez çalışmasında ise, sGAG içeriğinin DKM'de %55 oranında korunduğu belirlenmiştir. İskelenin kolajen içeriği ise %60 oranında korunabilmiştir. Sonuçlar, hücresizleştirme verimliliğinin literatür ile uyumlu olarak gerçekleştirilebildiğini göstermektedir.

Çalışmada, DKM'nin yüzey morfolojisi ve kimyasal yapısı da incelenmiştir. Hücresizleştirilmiş süngerimsi kemik dokunun yüzey morfoloji özelliklerinin saptanması için SEM analizi yapılmıştır. Alkol ile yıkanan örnekler kurutulduktan sonra iletken bir alan oluşturması için altın ile kaplanmıştır. DKM'nin ve S-DKM'nin farklı büyütmelerde görüntüleri alınmıştır. DKM yapısının SVS işlemi sonrasında mineralize kristal biriktirdiği gösterilmiştir. Demineralize ve deselülerize doğal kemik dokusunun kimyasal olarak karakterize edilmesi için ise 400-4000 cm^{-1} spektral aralığında FTIR spektral analizi yapılmıştır. Bu kapsamda, DKM hidrojelinde 1528 cm^{-1} 'de gözlenen pik Amid III grubunu, 2920 cm^{-1} 'de gözlenen pik Amid B grubunu ve 3300 cm^{-1} 'de gözlenen pik Amid B grubunu temsil etmektedir. Bunun yanısıra, 1030 cm^{-1} N-H bükülmesi ve 1630 cm^{-1} civarında karbonil gerilmesi görülmüştür. Bu spektral sonuçların literatür ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

DKM karakterize edildikten sonra *in vitro* şartlarda SVS ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon 37 °C sıcaklığa ayarlı etüvde yürütülmüş ve SVS, 3 günde bir tazelenmiştir. SVS ile hidrojel

iskelelerin biyomineralizasyonu, biyolompozit substratların kemik yenilenmesinde potansiyel kullanımına yönelik olarak gerçekleştirilmiştir (155). DKM iskeleleri SVS ile 8 gün süreyle inkübe edilmiş, S-DKM ve DKM örneklerinin SEM görüntüleri karşılaştırıldığında biyomineralizasyonun literatüre benzer şekilde arttığı görülmüştür (155).

Rejeneratif tıpta kullanılacak greftlerin veya doku mühendisliği iskelelerinin hücreler için uygun ortamlar sunması beklenir. Hücrelerin iskeleye tutunması, çoğalması ve istenilen yönde farklılaşmayı sağlaması hedeflenir. Ayrıca bu süreçte yapılar önemli bir immün yanıtı sebep olmamalı, hücreler üzerinde toksik etki ya da hemolitik etki oluşturmamalıdır (108).

Hidrojellerin karakterizasyon çalışmalarından sterilizasyonu sağlanarak üzerlerine hücreler tohumlanmıştır. AZ-MKH'lerin iskelelere ilk tutunması için yaklaşık otuzaltı saatlik bir periyot beklenmiştir. Bu süre sonrasında vasat örnekleri analizler için toplanmaya başlanmıştır. Osteojenik indüksiyon için ilk örnekler 7 gün sonra toplanmıştır. Hücrelerin iskele üzerindeki canlılık oranlarının anlaşılması için Alamar mavisi analizi yapılmıştır. Osteojenik farklılaşmanın gerçekleşme düzeyinin belirlenmesi için ise histokimyasal boyamalar, ALP ve Ca^{2+} miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Böylece çalışmada AZ-MKH'lerin osteojenik farklılaşma durumları gösterilmiştir.

Hidrojel iskelenin hücreler üzerindeki toksik etki gösterme durumunun anlaşılması için ise alamar mavisi ile hücre canlılığı analizi (0, 7, 14, 21. gün) yapılmıştır. Hücre canlılığının DKM SV, DKM OV ve SVS OV için 14. güne kadar arttığı görülmektedir. 21. günde hücre çoğalmasında düşüş olmasına rağmen canlılık korunmaya devam etmektedir. S-DKM örneklerinin hücre çoğalma düzeyinin bir miktar düşük olmasının nedeni olarak, SVS'nin DKM'nin biyomineralizasyonunu arttırarak yüzeyini kaplaması olarak değerlendirilmiştir. Böylece, hücrelerin çoğalma hızında yavaşlama gerçekleşmiştir.

Histokimyasal boyamalar osteojenik farklılaşmanın varlığını açıkça göstermektedir. Histokimyasal boyamalar için örnekler yüzeye sabitlendikten sonra farklı boyalarla boyanarak mineralize plaka şeklindeki birikimler literatür ile paralel şekilde gösterilmiştir. Hidrojellerin osteojenik farklılaşmasının verimliliğinin belirlenmesine yönelik olarak alkalın fosfatazın (ALP) miktarı tayini yapılmıştır. ALP osteoblast benzeri hücrelerin oluştuğunu gösteren erken belirteçlerdendir. Ca^{2+} birikimi ise osteoblast olgunlaşmasını göstermektedir. ALP ve Ca^{2+} miktarına DKM ve S-DKM için de incelenmiştir (156).

KAYNAKLAR

1. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. In: Tissue Engineering. 2001. p. 211–28.
2. Pelekanos RA, Sardesai VS, Futrega K, Lott WB, Kuhn M, Doran MR. Isolation and expansion of mesenchymal stem/stromal cells derived from human placenta tissue. J Vis Exp. 2016 Jun 6;2016(112).
3. Trottier V, Marceau-Fortier G, Germain L, Vincent C, Fradette J. IFATS Collection: Using Human Adipose-Derived Stem/Stromal Cells for the Production of New Skin Substitutes. Stem Cells. 2008 Oct;26(10):2713–23.
4. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. Br J Haematol. 2000;109(1):235–42.
5. Macías MI, Grande J, Moreno A, Domínguez I, Bornstein R, Flores AI. Isolation and characterization of true mesenchymal stem cells derived from human term decidua capable of multilineage differentiation into all 3 embryonic layers. Am J Obstet Gynecol. 2010;
6. Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. Nature. 2001.
7. Towns CR, Jones G. Stem cells, embryos, and the environment: a context for both science and ethics. J Med Ethics [Internet]. 2004 [cited 2021 May 13];30:410–3. Available from: www.jmedethics.com
8. Parmaksiz M, Dogan A, Odabas S, Elçin AE, Elçin YM. Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine. Biomed Mater [Internet]. 2016 Mar 17 [cited 2021 Aug 17];11(2):022003. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-6041/11/2/022003>
9. G K, Y M. Introduction to stem cells and regenerative medicine. Respiration

- [Internet]. 2013 Dec [cited 2021 Sep 21];85(1):3–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23257690/>
10. MJ E, MH K. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* [Internet]. 1981 [cited 2021 Sep 21];292(5819):154–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7242681/>
 11. Ko MSH. Zygotic Genome Activation Revisited: Looking Through the Expression and Function of Zscan4. In: *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press Inc.; 2016. p. 103–24.
 12. Knöfler M, Haider S, Saleh L, Pollheimer J, Gamage TKJB, James J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. Vol. 76, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG; 2019. p. 3479–96.
 13. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001.
 14. Avasthi S, Srivastava RN, Singh A, Srivastava M. Stem cell: past, present and future-a review article. *Internet J Med Updat* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2021 Sep 21];3(1):22–31. Available from: <https://go.gale.com/ps/i.do?p=AONE&sw=w&issn=16940423&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA187844323&sid=googleScholar&linkaccess=fulltext>
 15. Choi YS, Park YB, Ha CW, Kim JA, Heo JC, Han WJ, et al. Different characteristics of mesenchymal stem cells isolated from different layers of full term placenta. *PLoS One*. 2017;
 16. Sun N, Longaker MT, Wu JC. Human iPS cell-based therapy: Considerations before clinical applications. <http://dx.doi.org/10.4161/cc9510827> [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2021 Sep 21];9(5):880–5. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.9.5.10827>
 17. Lowry WE, Plath K. The many ways to make an iPS cell. *Nat Biotechnol* 2008 2611 [Internet]. 2008 Nov [cited 2021 Sep 21];26(11):1246–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/nbt1108-1246>

18. Lengner CJ. iPS cell technology in regenerative medicine. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2021 Sep 21];1192(1):38–44. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1749-6632.2009.05213.x>
19. Heilker R, Traub S, Reinhardt P, Schöler HR, Sternecker J. iPS cell derived neuronal cells for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*. 2014 Oct 1;35(10):510–9.
20. Shambloot MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13726–31.
21. Bjornson CRR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* (80-). 1999;
22. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJL, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. 2001;
23. BESALTI O, AKTAS Z, CAN P, AKPINAR E, ELCIN EA, ELCIN MY. The use of autologous neurogenically-induced bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of paraplegic dogs without nociception due to spinal trauma. *J Vet Med Sci*. 2016 Sep 1;78(9):15–0571.
24. T S, G P, U G. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant* [Internet]. 2016 [cited 2021 Sep 21];25(5):829–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26423725/>
25. Wei X, Yang X, Han Z, Qu F, Shao L, Shi Y. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin* 2013 346 [Internet]. 2013 Jun 5 [cited 2021 Sep 21];34(6):747–54. Available from: <https://www.nature.com/articles/aps201350>
26. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;

27. Bagno L, Hatzistergos KE, Balkan W, Hare JM. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Cardiovascular Disease: Progress and Challenges. *Molecular Therapy*. 2018.
28. Musina RA, Bekchanova ES, Sukhikh GT. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bull Exp Biol Med*. 2005;
29. Klein JD, Fauza DO. Amniotic and placental mesenchymal stem cell isolation and culture. *Methods Mol Biol*. 2011;
30. Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*. 2006;
31. Rus Ciucă D, Sorițău O, Șuşman S, Pop VI, Miha CM. Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stem cells from the placenta. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(3):803–8.
32. Semenov O V., Breymann C. Biomedical Potential of Human Perinatal Stem Cells. In: *Perinatal Stem Cells*, Second Edition. John Wiley and Sons; 2013. p. 139–53.
33. Shaer A, Azarpira N, Aghdaie MH, Esfandiari E. Isolation and characterization of human mesenchymal stromal cells derived from placental decidua basalis; umbilical cord wharton's jelly and amniotic membrane. *Pakistan J Med Sci*. 2014;
34. Timmins NE, Kiel M, Günther M, Heazlewood C, Doran MR, Brooke G, et al. Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng*. 2012;
35. Vellasamy S. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue. *World J Stem Cells*. 2012;4(6):53.
36. Soncini M, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, Denegri M, Albertini A, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;

37. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006 Aug;8(4):315–7.
38. Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. *Stem Cells* [Internet]. 2004 Sep 1 [cited 2020 Mar 4];22(5):649–58. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.22-5-649>
39. Cross JC. How to make a placenta: Mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice - A Review. *Placenta*. 2005;
40. Tarrade A, Lai Kuen R, Malassiné A, Tricottet V, Blain P, Vidaud M, et al. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Investig* [Internet]. 2001 Sep 1 [cited 2021 Mar 10];81(9):1199–211. Available from: <https://www.nature.com/articles/3780334>
41. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. Vol. 266, *Science*. Science; 1994. p. 1508–18.
42. de la Torre P, Jesús Pérez-Lorenzo M, I. Flores A. Human Placenta-Derived Mesenchymal Stromal Cells: A Review from Basic Research to Clinical Applications. In: *Stromal Cells - Structure, Function, and Therapeutic Implications*. IntechOpen; 2019.
43. Genbacev O, Donne M, Kapidzic M, Gormley M, Lamb J, Gilmore J, et al. TISSUE-SPECIFIC STEM CELLS Establishment of Human Trophoblast Progenitor Cell Lines from the Chorion. *Stem Cells* [Internet]. 2011;29:1427–36. Available from: www.StemCells.com
44. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* (80-). 1997 Sep 12;277(5332):1669–72.
45. Bourne G. The foetal membranes: A review of the anatomy of normal amnion and

chorion and some aspects of their function. Vol. 38, Postgraduate Medical Journal. BMJ Publishing Group; 1962. p. 193–201.

46. Gram A, Boos A, Kowalewski MP. Cellular localization, expression and functional implications of the utero-placental endothelin system during maintenance and termination of canine gestation. *J Reprod Dev* [Internet]. 2017 [cited 2020 Sep 28];63(3):235–45. Available from: [/pmc/articles/PMC5481626/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/)
47. Pozzobon M, Piccoli M, De Coppi P. Stem cells from fetal membranes and amniotic fluid: Markers for cell isolation and therapy. *Cell Tissue Bank* [Internet]. 2014 Feb 20 [cited 2021 Mar 9];15(2):199–211. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10561-014-9428-y>
48. Pathology Outlines - Anatomy & histology-placenta & umbilical cord [Internet]. [cited 2021 Dec 6]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/placentanormalhistology.html>
49. Uchide N, Ohyama K, Bessho T, Takeichi M, Toyoda H. Possible roles of proinflammatory and chemoattractive cytokines produced by human fetal membrane cells in the pathology of adverse pregnancy outcomes associated with influenza virus infection. Vol. 2012, *Mediators of Inflammation*. 2012.
50. Patel J, Shafiee A, Wang W, Fisk NM, Khosrotehrani K. Novel isolation strategy to deliver pure fetal-origin and maternal-origin mesenchymal stem cell (MSC) populations from human term placenta. *Placenta* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2020 Oct 23];35(11):969–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2014.09.001>
51. Pozzobon M, Piccoli M, De Coppi P. Stem cells from fetal membranes and amniotic fluid: Markers for cell isolation and therapy. *Cell Tissue Bank*. 2014;15(2):199–211.
52. Li Y, Liu Z, Jin Y, Zhu X, Wang S, Yang J, et al. Differentiation of Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells into Human Anterior Cruciate Ligament Fibroblast Cells by in Vitro Coculture. *Biomed Res Int*. 2017;2017.

53. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring H-J, Evangelista M, et al. Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2008 Feb;26(2):300–11.
54. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cells* [Internet]. 2005 Nov 1 [cited 2021 Feb 15];23(10):1549–59. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2004-0357>
55. Genbacev O, Donne M, Kapidzic M, Gormley M, Lamb J, Gilmore J, et al. TISSUE-SPECIFIC STEM CELLS Establishment of Human Trophoblast Progenitor Cell Lines from the Chorion. *Stem Cells* [Internet]. 2011 [cited 2021 Mar 7];29:1427–36. Available from: www.StemCells.com
56. Roubelakis MG, Trohatou O, Anagnostou NP. Amniotic fluid and amniotic membrane stem cells: Marker discovery. *Stem Cells Int*. 2012;2012.
57. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring H-J, Evangelista M, et al. Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* [Internet]. 2008 Feb 1 [cited 2021 Feb 15];26(2):300–11. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2007-0594>
58. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, et al. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol*. 2007;7.
59. Li CD, Zhang WY, Li HL, Jiang XX, Zhang Y, Tang P, et al. Mesenchymal stem cells derived from human placenta suppress allogeneic umbilical cord blood lymphocyte proliferation. *Cell Res*. 2005;15(7):539–47.
60. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential.

Biol Reprod. 2007 Sep;77(3):577–88.

61. Prusa AR, Hengstschläger M. Amniotic fluid cells and human stem cell research - A new connection. *Med Sci Monit.* 2002;8(11):253–8.
62. De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007;25(1):100–6.
63. Sudo K, Kanno M, Miharada K, Ogawa S, Hiroshima T, Saijo K, et al. Mesenchymal Progenitors Able to Differentiate into Osteogenic, Chondrogenic, and/or Adipogenic Cells In Vitro Are Present in Most Primary Fibroblast-Like Cell Populations. *Stem Cells.* 2007 Jul;25(7):1610–7.
64. Battula VL, Bareiss PM, Treml S, Conrad S, Albert I, Hojak S, et al. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation.* 2007;75(4):279–91.
65. Yen BL, Huang H-I, Chien C-C, Jui H-Y, Ko B-S, Yao M, et al. Isolation of Multipotent Cells from Human Term Placenta. *Stem Cells.* 2005 Jan;23(1):3–9.
66. Poloni A, Rosini V, Mondini E, Maurizi G, Mancini S, Discepoli G, et al. Characterization and expansion of mesenchymal progenitor cells from first-trimester chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy.* 2008;10(7):690–7.
67. Spitalieri P, Cortese G, Pietropolli A, Filaretto A, Dolci S, Klinger FG, et al. Identification of multipotent cytotrophoblast cells from human first trimester chorionic Villi. *Cloning Stem Cells.* 2009 Dec 1;11(4):535–56.
68. Meraviglia V, Vecellio M, Grasselli A, Baccarin M, Farsetti A, Capogrossi MC, et al. Human chorionic villus mesenchymal stromal cells reveal strong endothelial conversion properties. *Differentiation.* 2012 Jun;83(5):260–70.
69. Nazarov I, Lee JW, Soupene E, Etemad S, Knapik D, Green W, et al. Multipotent

Stromal Stem Cells from Human Placenta Demonstrate High Therapeutic Potential. *Stem Cells Transl Med.* 2012 May;1(5):359–72.

70. Ilancheran S, Moodley Y, Manuelpillai U. Human Fetal Membranes: A Source of Stem Cells for Tissue Regeneration and Repair? *Placenta.* 2009 Jan;30(1):2–10.
71. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. In: *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2006. p. 664–73.
72. Arakawa R, Aoki R, Arakawa M, Saito K. Human first-trimester chorionic villi have a myogenic potential. *Cell Tissue Res.* 2012 Apr;348(1):189–97.
73. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FHJ, Willemze R, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation [1]. *Blood.* 2003;102(4):1548–9.
74. Aboagye-Mathiesen G, Laugesen J, Zdravkovic M, Ebbesen P. Isolation and characterization of human placental trophoblast subpopulations from first-trimester chorionic villi. *Clin Diagn Lab Immunol* [Internet]. 1996 [cited 2021 Mar 11];3(1):14–22. Available from: /pmc/articles/PMC170241/?report=abstract
75. S Kovats EMCLMSSFRD. A class antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* (80-). 1990;248:220–3.
76. P Le Bouteiller AB. The functionality of HLA-G is emerging. *Immunol Rev.* 1999;167:233–44.
77. De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007 Jan 5;25(1):100–6.
78. Roubelakis MG, Bitsika V, Zagoura D, Trohatou O, Pappa KI, Makridakis M, et al. In vitro and in vivo properties of distinct populations of amniotic fluid mesenchymal

- progenitor cells. *J Cell Mol Med*. 2011;15(9):1896–913.
79. Ditadi A, De Coppi P, Picone O, Gautreau L, Smati R, Six E, et al. Human and murine amniotic fluid c-Kit+Lin- cells display hematopoietic activity. *Blood*. 2009;113(17):3953–60.
 80. GOSDEN CM. AMNIOTIC FLUID CELL TYPES AND CULTURE. *Br Med Bull* [Internet]. 1983 Jan 1 [cited 2021 Mar 12];39(4):348–54. Available from: <https://academic.oup.com/bmb/article-lookup/doi/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071847>
 81. Fauza D. Amniotic fluid and placental stem cells. Vol. 18, *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2004. p. 877–91.
 82. Bollini S, Cheung KK, Riegler J, Dong X, Smart N, Ghionzoli M, et al. Amniotic fluid stem cells are cardioprotective following acute myocardial infarction. *Stem Cells Dev*. 2011;20(11):1985–94.
 83. Whitsett CF, Priest JH, Priest RE, Marion J. HLA Typing of Cultured Amniotic Fluid Cells. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1983 Feb 1 [cited 2021 Mar 12];79(2):186–94. Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/article/79/2/186/1815554>
 84. Nadri S, Soleimani M. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from murine bone marrow and amniotic fluid. *Cytotherapy*. 2007;9(8):729–37.
 85. Sun H, Feng K, Hu J, Soker S, Atala A, Ma PX. Osteogenic differentiation of human amniotic fluid-derived stem cells induced by bone morphogenetic protein-7 and enhanced by nanofibrous scaffolds. *Biomaterials*. 2010 Feb;31(6):1133–9.
 86. Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruiz C, Olivares EG. Human decidual stromal cells express α -smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts [Internet]. Vol. 14, *Human Reproduction*. 1999 [cited 2021 Mar 12]. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article/14/6/1599/2919278>
 87. Bulmer JN, Pace D, Ritson A. Immunoregulatory cells in human decidua:

- Morphology, immunohistochemistry and function [Internet]. Vol. 28, Reproduction Nutrition Developpement. *Reprod Nutr Dev*; 1988 [cited 2021 Mar 12]. p. 1599–614. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3073448/>
88. Vacca P, Montaldo E, Vitale C, Croxatto D, Moretta L, Mingari MC. MSC and innate immune cell interactions: A lesson from human decidua. *Immunol Lett*. 2015 Dec 1;168(2):170–4.
 89. Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 2002 Nov 1;187(5):1416–23.
 90. Loke YW, King A, Burrows TD. Decidua in human implantation. In: *Human Reproduction*. Oxford University Press; 1995. p. 14–21.
 91. Giudice LC. Elucidating endometrial function in the post-genomic era. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2021 Mar 16];9(3):223–35. Available from: <https://academic.oup.com/humupd/article-lookup/doi/10.1093/humupd/dmg019>
 92. Nasu K. Platelet-activating factor stimulates cytokine production by human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 1999 Jun 1 [cited 2021 Mar 12];5(6):548–53. Available from: <https://academic.oup.com/molehr/article-lookup/doi/10.1093/molehr/5.6.548>
 93. Hess AP, Hamilton AE, Talbi S, Dosiou C, Nyegaard M, Nayak N, et al. Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: Amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol Reprod*. 2007 Jan 1;76(1):102–17.
 94. Glasser SR, Julian J. Intermediate filament protein as a marker of uterine stromal cell decidualization. *Biol Reprod* [Internet]. 1986 [cited 2021 Mar 12];35(2):463–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3533171/>
 95. Tabanelli S, Tang B, Gurpide E. In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992 May 1;42(3–4):337–44.

96. Dimitrov R, Kyurkchiev D, Timeva T, Yunakova M, Stamenova M, Shterev A, et al. First-trimester human decidua contains a population of mesenchymal stem cells. *Fertil Steril*. 2010 Jan 1;93(1):210–9.
97. in 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GMJS, Claas FHJ, Fibbe WE, et al. Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta. *Stem Cells*. 2004 Dec;22(7):1338–45.
98. Wu M, Zhang R, Zou Q, Chen Y, Zhou M, Li X, et al. Comparison of the Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Human Placenta and Umbilical Cord. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).
99. Garcia-Pacheco JM. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2001 Dec 1 [cited 2021 Mar 12];7(12):1151–7. Available from: <https://academic.oup.com/molehr/article-lookup/doi/10.1093/molehr/7.12.1151>
100. Watson N, Divers R, Kedar R, Mehindru A, Mehindru A, Borlongan MC, et al. Discarded Wharton jelly of the human umbilical cord: A viable source for mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2015.
101. Wang Q, Yang Q, Wang Z, Tong H, Ma L, Zhang Y, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Warton's jelly as sources of cell immunomodulatory therapy. *Hum Vaccines Immunother* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2021 Mar 12];12(1):85–96. Available from: </pmc/articles/PMC4962749/>
102. Greenwood HL, Singer PA, Downey GP, Martin DK, Thorsteinsdóttir H, Daar AS. Regenerative medicine and the developing world [Internet]. Vol. 3, *PLoS Medicine*. *PLoS Med*; 2006 [cited 2021 Mar 18]. p. 1496–500. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16968130/>
103. Dieckmann C, Renner R, Milkova L, Simon JC. Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. *Exp Dermatol* [Internet]. 2010 Jun 9 [cited 2021 Mar 18];19(8):697–706. Available

from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0625.2010.01087.x>

104. Chien KR. Regenerative medicine and human models of human disease [Internet]. Vol. 453, *Nature*. Nature Publishing Group; 2008 [cited 2021 Mar 18]. p. 302–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18480810/>
105. Meregalli M, Farini A, Parolini D, MacIotta S, Torrente Y. Stem cell therapies to treat muscular dystrophy: Progress to date. Vol. 24, *BioDrugs*. Springer International Publishing; 2010. p. 237–47.
106. Wang S, Mundada L, Johnson S, Wong J, Witt R, Ohye RG, et al. Characterization and Angiogenic Potential of Human Neonatal and Infant Thymus Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Transl Med*. 2015 Apr;4(4):339–50.
107. Clark RAF, Ghosh K, Tonnesen MG. Tissue engineering for cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2007 [cited 2021 Mar 18];127(5):1018–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17435787/>
108. Ikada Y. Challenges in tissue engineering [Internet]. Vol. 3, *Journal of the Royal Society Interface*. Royal Society; 2006 [cited 2021 Mar 18]. p. 589–601. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16971328/>
109. Metcalfe AD, Ferguson MWJ. Tissue engineering of replacement skin: The crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration [Internet]. Vol. 4, *Journal of the Royal Society Interface*. Royal Society; 2007 [cited 2021 Mar 18]. p. 413–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17251138/>
110. Mahla RS. Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics [Internet]. Vol. 2016, *International Journal of Cell Biology*. Hindawi Limited; 2016 [cited 2021 Jun 4]. Available from: [/pmc/articles/PMC4969512/](https://pmc/articles/PMC4969512/)
111. Huynh K. Stem cell therapy improves heart function by triggering an acute immune response. *Nature Reviews Cardiology*. 2020.

112. Hench LL. Bioceramics. *J Am Ceram Soc.* 1998;81(7):1705–28.
113. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, et al. Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. *Bio/Technology* 1994 127 [Internet]. 1994 [cited 2021 Nov 29];12(7):689–93. Available from: <https://www.nature.com/articles/nbt0794-689>
114. Friess W, Schlapp M. Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006 Jun;63(2):176–87.
115. Norris EG, Dalecki D, Hocking DC. Using Acoustic Fields to Fabricate ECM-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Recent Prog Mater* [Internet]. 2020 Jul 21 [cited 2021 Mar 18];2(3):1–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33604591>
116. Koons GL, Diba M, Mikos AG. Materials design for bone-tissue engineering. *Nat Rev Mater* 2020 58 [Internet]. 2020 Jun 8 [cited 2021 Dec 1];5(8):584–603. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41578-020-0204-2>
117. Jepsen KJ. Systems Analysis of Bone. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* [Internet]. 2009 Jul [cited 2021 Dec 1];1(1):73. Available from: [/pmc/articles/PMC2790199/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10449008/)
118. Qiu ZY, Cui Y, Wang XM. Natural Bone Tissue and Its Biomimetic. *Miner Collagen Bone Graft Substitutes.* 2019 Jan 1;1–22.
119. Crossley K, Bennell KL, Wrigley T, Oakes BW. Ground reaction forces, bone characteristics, and tibial stress fracture in male runners. *Med Sci Sports Exerc* [Internet]. 1999 [cited 2021 Dec 1];31(8):1088–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10449008/>
120. Alford AI, Kozloff KM, Hankenson KD. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015 Aug 1;65:20–31.
121. American TT-S, 1981 undefined. *Gels.* JSTOR [Internet]. [cited 2021 Nov 30]; Available from:

https://www.jstor.org/stable/24964265?casa_token=PQV8cfqa6gUAAAAA:JpfTrJXfQS7d_l5wOTpHO74fA3CW8PHL40Jv8_vEYZN4nsJzWwPGYaQPC7DmT3Y1chg0xw96v3ZWZu2-SCigEZ53Et7CUMR6V5vRGj84QcTKRcfng

122. Kopeček J. HYDROGELS FROM SOFT CONTACT LENSES AND IMPLANTS TO SELF-ASSEMBLED NANOMATERIALS. *J Polym Sci A Polym Chem* [Internet]. 2009 Nov 15 [cited 2021 Nov 30];47(22):5929. Available from: [/pmc/articles/PMC2776732/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19444444/)
123. Hydrogels in Medicine and Pharmacy. *Hydrogels Med Pharm*. 2019 Aug 15;
124. Bayraktar D, Cuè Neyt Tas A. Chemical Preparation of Carbonated Calcium Hydroxyapatite Powders at 37 C in Urea-containing Synthetic Body Fluids.
125. Müller L, Müller FA. Preparation of SBF with different HCO₃⁻ content and its influence on the composition of biomimetic apatites. *Acta Biomater*. 2006 Mar 1;2(2):181–9.
126. Donaruma LG. Definitions in biomaterials, D. F. Williams, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1987, 72 pp. *J Polym Sci Polym Lett Ed* [Internet]. 1988 Aug 20 [cited 2021 Mar 25];26(9):414–414. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pol.1988.140260910>
127. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* [Internet]. 2008 Jul [cited 2021 Mar 25];29(20):2941–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18440630/>
128. Srinivasan G, Patel H, Bonde M. Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue Engineering [Internet]. Vol. 25, *Trends Biomater. Artif. Organs*. 2011 [cited 2021 Mar 28]. Available from: <http://www.sbaoi.org>
129. Park TG. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. *Biomaterials*. 1995 Oct 1;16(15):1123–30.
130. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*.

2000 Dec 15;21(24):2529–43.

131. Phelps EA, Garcia AJ. Update on therapeutic vascularization strategies [Internet]. Vol. 4, Regenerative Medicine. Regen Med; 2009 [cited 2021 Mar 25]. p. 65–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19105617/>
132. Yannas I V, Lee E, Orgill DP, Skrabut EM, Murphy GF. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. Vol. 86, Proc. Nati. Acad. Sci. USA. 1989.
133. Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. npj Regenerative Medicine. 2019.
134. Packthongsuk K, Rathbun T, Troyer D, Davis DL. Porcine Wharton's jelly cells distribute throughout the body after intraperitoneal injection. Stem Cell Res Ther. 2018 Feb 14;9(1).
135. Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AMA, Van Osch GJVM, Balk AHMM, Ijzermans JNM, et al. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. Stem Cells Dev. 2007 Aug;16(4):597–604.
136. Weiss ML, Troyer DL. Stem cells in the umbilical cord. Stem Cell Rev. 2006 Jun;2(2):155–62.
137. Kalaszczynska I, Ferdyn K. Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells: Future of regenerative medicine? Recent findings and clinical significance. Vol. 2015, BioMed Research International. Hindawi Limited; 2015.
138. Young HE, Black AC. Adult Stem Cells [Internet]. Vol. 276, Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology. Wiley-Liss Inc.; 2004 [cited 2020 Mar 4]. p. 75–102. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ar.a.10134>
139. Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human

Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. *Stem Cells*. 2004 Sep;22(5):649–58.

140. Barlow S, Brooke G, Chatterjee K, Price G, Pelekanos R, Rossetti T, et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008 Dec 8;17(6):1095–107.
141. Bačenková D, Rosocha J, Tóthová T, Rosocha L, Šarissk M. Isolation and basic characterization of human term amnion and chorion mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2011;13(9):1047–56.
142. Diaz-Prado S, Muiños-Lopez E, Fuentes-Boquete I, De Toro FJ, Garcia FJB. Human amniotic membrane: A potential tissue and cell source for cell therapy and regenerative medicine. In: *Emerging Trends in Cell and Gene Therapy*. Humana Press Inc.; 2013. p. 55–78.
143. Araújo AB, Furlan JM, Salton GD, Schmalfuss T, Röhsig LM, Silla LMR, et al. Isolation of human mesenchymal stem cells from amnion, chorion, placental decidua and umbilical cord: comparison of four enzymatic protocols. *Biotechnol Lett*. 2018 Jun 1;40(6):989–98.
144. Nartprayut K, U-Pratya Y, Kheolamai P, Manochantr S, Chayosumrit M, Issaragrisil S, et al. Cardiomyocyte differentiation of perinatally-derived mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep* [Internet]. 2013 May 1 [cited 2021 Aug 21];7(5):1465–9. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2013.1356/abstract>
145. Nur Fariha MM, Chua KH, Tan GC, Tan AE, Hayati AR. Human chorion-derived stem cells: Changes in stem cell properties during serial passage. *Cytotherapy*. 2011;
146. Wu C, Chen L, Huang Y zhou, Huang Y, Parolini O, Zhong Q, et al. Comparison of the proliferation and differentiation potential of human urine-, placenta decidua basalis-, and bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells Int*. 2018;2018.
147. Semenov O V., Koestenbauer S, Riegel M, Zech N, Zimmermann R, Zisch AH, et al.

- Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;
148. Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S, Yamaguchi S, et al. Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of +human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Feb 17;340(3):944–52.
 149. Pappa KI, Anagnou NP. Novel sources of fetal stem cells: Where do they fit on the developmental continuum? [Internet]. Vol. 4, *Regenerative Medicine*. Future Medicine Ltd London, UK ; 2009 [cited 2021 Mar 10]. p. 423–33. Available from: www.futuremedicine.com
 150. Salgado AJ, Oliveira JM, Martins A, Teixeira FG, Silva NA, Neves NM, et al. Tissue engineering and regenerative medicine: Past, present, and future. In: *International Review of Neurobiology*. Academic Press Inc.; 2013. p. 1–33.
 151. Prasad A. State of art review on bioabsorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Today Proc.* 2021 Jan 1;44:1391–400.
 152. Sawkins MJ, Bowen W, Dhadda P, Markides H, Sidney LE, Taylor AJ, et al. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. *Acta Biomater* [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 21];9(8):7865. Available from: [/pmc/articles/PMC3711237/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24011237/)
 153. WS P, SN A, D C, M J, JE W-M. BMP depletion occurs during prolonged acid demineralization of bone: characterization and implications for graft preparation. *Cell Tissue Bank* [Internet]. 2011 May [cited 2021 Aug 21];12(2):81–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20039143/>
 154. PM C, TW G, SF B. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* [Internet]. 2011 Apr [cited 2021 Aug 21];32(12):3233–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21296410/>
 155. Maharjan B, Park J, Kaliannagounder VK, Awasthi GP, Joshi MK, Park CH, et al.

Regenerated cellulose nanofiber reinforced chitosan hydrogel scaffolds for bone tissue engineering. Carbohydr Polym. 2021 Jan 1;251:117023.

156. C. B, C. L, LiYanan, LinHang, Beer-StoltzDonna, LiuLi, et al. Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. <https://home.liebertpub.com/teb> [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2021 Aug 24];23(3):268–80. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.teb.2016.0454>



EKLER



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Melisa BAŞTUĞ

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu:

Lisans: Balıkesir Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2013-2017)

Katılım Yapılan Kongreler

- Biyoteknoloji Topluluğu Öğrenci Kongresi
- GTÜ Biyoteknoloji Topluluğu Genetik Günleri
- BAUN- MBG Öğrenci Günleri
- BioTürkiye Kongresi Poster Sunumu

Kurslar ve Sertifikalar

- Hacettepe Kök Hücre Kursu

PP-30

Osteogenic Differentiation of Human Amniotic Membrane Stem Cells on Bone ECM Biological Scaffolds

Melisa BAŞTUĞ,¹ Murat Taner VURAT,¹ Rahmi Sinan KARADENİZ,² Yaprak ENGİN-ÜSTÜN,²
Ayşe Eser ELÇİN,¹ Yaşar Murat ELÇİN^{1,3}

- 1 Tissue Engineering, Biomaterials and Nanobiotechnology Laboratory, Ankara University Biotechnology Institute, Ankara University Faculty of Science, Ankara University Stem Cell Institute, Ankara, Turkey
- 2 Ankara Etlik Zübeyde Hanım Women's Health and Research Center, University of Health Sciences, Ankara, Turkey
- 3 Biovalda Health Technologies, Inc., Ankara, Turkey

Introduction

The low regeneration potential of the human body hinders proper regeneration of tissues or organs that have lost their function due to disease or trauma. Regenerative medicine encompasses approaches to replacing or regenerating human cells, tissues, or organs to restore normal function or rebuild healthy tissue [1,2]. The combined use of stem cell and tissue engineering (TE) technologies has gained importance, especially in the last decade. Studies with stem cells obtained from well-known sources such as bone marrow, adipose tissue and placenta continue at full speed [2-4]. The placenta is a reservoir of progenitors and stem cells that can differentiate into different lineages and cell types [5]. In particular, human amniotic membrane-derived stem cells (hAMSCs) are of interest for TE related to their high regenerative potential and ease of propagation. TE focuses on combining stem cells with extracellular matrix (ECM)-like biomaterials possessing biological, mechanical and architectural properties suitable for functional tissue reconstruction [3].

In this study, an *in vitro* bone TE approach was developed by utilizing the known osteogenic differentiation properties of hAMSCs and bone-derived ECM-based biological scaffolds.

BACKGROUND

The low regeneration potential of the human body hinders proper regeneration of tissues or organs that have lost their function due to disease or trauma. Regenerative medicine encompasses approaches to replacing or regenerating human cells, tissues, or organs to restore normal function or rebuild healthy tissue [1,2]. The combined use of stem cell and tissue engineering (TE) technologies has gained importance, especially in the last decade. Studies with stem cells obtained from well-known sources such as bone marrow, adipose tissue and placenta continue at full speed [2-4]. In this study, an *in vitro* bone TE approach was developed by utilizing the known osteogenic differentiation properties of hAMSCs and bone-derived ECM-based biological scaffolds.

METHODS

Isolation and characterization of hAMSCs: Single cell suspensions of hAMSCs were isolated by enzymatic digestion from three human placentas with ethical approval (17-410-20) (Fig. 1). hAMSCs were expanded in culture in α -MEM (with 10% FBS, penicillin-streptomycin, fungizone). Tri-lineage and colony-forming potentials, doubling-time of cells were evaluated. hAMSCs were seeded on two types of constructs; cultured either under standard expansion or osteogenic culture conditions. The osteogenic differentiation status of hAMSCs cultured on both types of substrates was examined comparatively using biochemical methods.

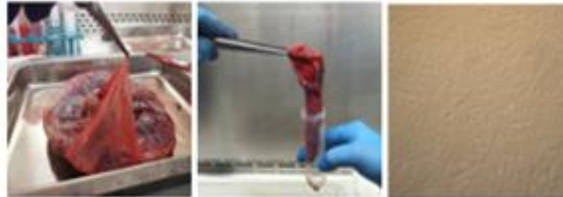


Figure 1. Isolation process of hAMSCs.

Preparation and characterization of Decellularized Bone Hydrogels: Bone-derived ECM was obtained from bovine tibia heads. Cancellous tissue was processed; demineralization and decellularization protocols were applied (Fig. 2). Decellularization efficiency was evaluated by DNA and histochemical analyses. Bioactive content of bone ECM was investigated by assays for sulfated glycosaminoglycans and collagen [5]. Two types of scaffolds were used as cell substrates. First, enzymatically-digested ECM was neutralized, gelled at physiological temperature and freeze-dried. Secondly, this construct was kept in simulated body fluid (SBF) to form a mineralized layer on the scaffold surface.

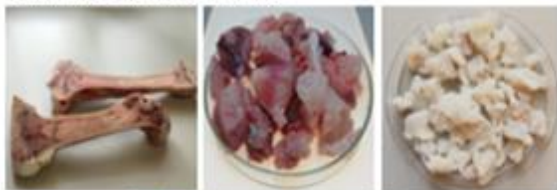


Figure 2. Decellularization and decellularization steps of cancellous bone.

RESULTS AND DISCUSSION

Efficiency of Decellularization:

DNA and histochemical analyses demonstrated the successful obtaining of bone-derived decellularized ECM. Biochemical assays indicated the product was rich in collagen and glycosaminoglycans (Fig. 3).

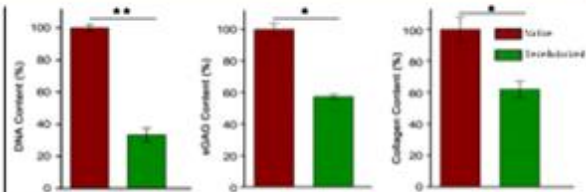


Figure 3. DNA, GAG and collagen content of native and decellularized bone tissues.

FT-IR Analyses: The FT-IR spectrum of the bone-derived ECM hydrogels were similar to collagen extracted from other sources and main peaks of functional groups were observed (Fig. 4). We identified the characteristic bands, such as N-H bending around 1030 cm^{-1} , and carbonyl stretching around 1630 cm^{-1} . On the other hand, the characteristic peaks of Amide III, Amide I and Amide A were detected at around 1528 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} and 3300 cm^{-1} , respectively.

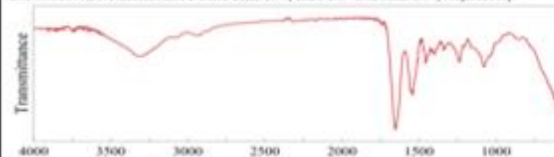


Figure 4. FT-IR spectrum of bone-derived ECM hydrogels.

Flow Cytometry Analyses: Flow cytometry analyses revealed that isolated cells were positive for mesenchymal cell surface markers (CD73 and CD90) and negative for CD34 hematopoietic lineage surface marker (Fig. 5).

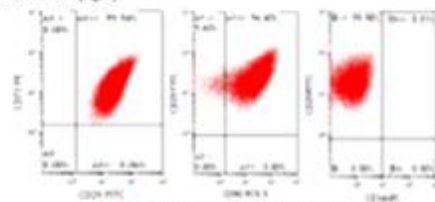


Figure 5. Flow cytometric characterization of hAMSCs.

SEM Analyses: According to the obtained SEM micrographs, we observed that seeded hAMSCs adhere to the surface and make cell clusters (Fig. 6).

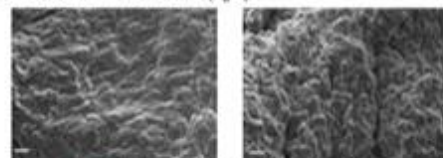


Figure 6. SEM micrographs of biological scaffolds (Scale bar: 20µm).

CONCLUSIONS

Findings support the notion that human amniotic membrane-derived stem cell-laden bone ECM-derived scaffolds have the potential for use in prospective bone regenerative applications.

REFERENCES

1. Kuchel S, Bergh A, Pech A. "Regenerative medicine clinical workflow". *Regen. Med.* 24(3), 459-472, 2021.
2. Elçi Y.M., "3D biodegradable porous scaffolds based on poly(l-lactide) polymer". *Avusturya Tıp Enstitüsü, T.C. Sağlık Bakanlığı, Ankara, 2016.*
3. Elçi Y.M. (2014). "Tissue Engineering, Stem Cells and Bone Tissue". *Quorum Research, New York and London, 2008.*
4. Elçi Y.M. (2014). "3D Biodegradable porous scaffolds". *Avusturya Tıp Enstitüsü, T.C. Sağlık Bakanlığı, Ankara, 2016.*
5. Percec V., Degen A., Elçi A., Elçi Y.M., *Journal of Materials* 11(2), 121013, 2016.



International
Biotechnology Congress

StartHUB

BIOSphere

9 - 11 September 2021



ABSTRACT BOOK



www.bioturkiye.org