



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**HİPOKSİK VE NORMOKSİK ORTAM ŞARTLARINDA
OSTEOJENİK NESİLE FARKLILAŞTIRILMIŞ İNSAN
ADİPOZ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
GEN/MİKRORNA İFADE PROFİLLERİNİN
KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

Oya ÇELİKAĞ

**DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. A. Eser ELÇİN**

**ANKARA
2016**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPOKSİK VE NORMOKSİK ORTAM ŞARTLARINDA
OSTEOJENİK NESİLE FARKLILAŞTIRILMIŞ
İNSAN ADİPOZ KÖKENLİ MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELERİN GEN/MİKRORNA İFADE
PROFİLLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

Oya ÇELİKAĞ

**DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. A. Eser ELÇİN

**Bu tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından
15L0216002 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2016

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum **“Hipoksik ve Normoksik Ortam Şartlarında Osteojenik Nesile Farklaştırılmış İnsan Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Gen/MikroRNA İfade Profillerinin Karşılaştırmalı Analizi”** başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Oya ÇELİKAĞ

Tarih: 12.08.2016

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinlerarası Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalı'nda Oya ÇELİKAĞ tarafından hazırlanan "Hipoksik ve Normoksik Ortam Şartlarında Osteojenik Nesile Farklılaştırılmış İnsan Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Gen/MikroRNA İfade Profillerinin Karşılaştırmalı Analizi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / ~~OY~~

~~ÇOKLUĞU~~ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Prof. Dr. Sibel Sümer
Hacettepe Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Yrd. Dr. Klara Dalva
Ankara Üniversitesi
Raportör

İmza

Prof. Dr. A. Eser Elçin
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Zafer Karaer
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simge ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xvi
1. GİRİŞ	
1.1. Kök Hücreler	1
1.2. Mezenkimal Kök Hücreler	2
1.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	3
1.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Multipotent Farklılaşma Potansiyeli	4
1.2.2.1. İn Vitro Osteojenik Farklılaşma	5
1.2.2.2. İn Vitro Adipojenik Farklılaşma	7
1.2.2.3. İn Vitro Kondrojenik Farklılaşma	8
1.3. Kök Hücrede Niş Kavramı	9
1.3.1. Yetişkin Kök Hücre Nişleri	10
1.3.1.1. Hematopoetik Kök Hücre Nişi	10
1.3.1.2. Adipoz Kökenli Kök Hücre Nişi	12
1.3.2. Yetişkin Kök Hücre Nişinin Yapısı ve Bileşenleri	13
1.4. Düşük Oksijen Seviyesi (Hipoksi)	17
1.4.1. Düşük Oksijen Seviyesinin Kök Hücreler Üzerindeki Etkisi	20
1.5. Mikro RNA (miRNA)	23
1.5.1. miRNA Biyogenezi	23
1.5.2. Gen Ekspresyonunun miRNA Tarafından Düzenlenmesi	25
1.5.3. miRNA ve Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Kemik Hücrelerine Farklılaşması	26
1.6. Çalışmanın Amacı	32
1.7. Çalışmanın Hipoteziyle İlgili Sorular	32
2. GEREÇ VE YÖNTEM	
2.1. Çalışmada Kullanılan Gereçler	33
2.2. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültüre Edilmesi	34
2.2.1. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	36
2.2.1.1. Farklılaştırma Çalışmaları	36
2.2.1.2. CFU Analizi	36
2.2.1.3. Akım Sitometri Analizi	37
2.3. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin	37

Kemik Hücrelerine Farklılaştırılması	
2.3.1. Histokimya Çalışmaları	38
2.3.1.1. Von Kossa Boyaması	38
2.3.1.2. Alizarin Kırmızısı Boyaması	39
2.3.2. İmmünohistokimya Çalışması	39
2.3.3. Kalsiyum Tayini	40
2.3.4. Alkalen Fosfataz Aktivitesi Tayini	40
2.4. Mikro RNA Analizi	41
2.4.1. RNA İzolasyonu	41
2.4.2. RNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi	42
2.4.3. Agaroz Jel Elektrofrezisi	42
2.4.4. cDNA Sentezi	43
2.4.5. RT-PCR Reaksiyonu	43
2.4.6. İstatistiksel Değerlendirmeler	44
3. BULGULAR	
3.1. İnsan Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	45
3.2. Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Normoksi ve Hipoksi Ortamında Yapılan Analizleri	48
3.2.1. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklı Oksijen Koşullarında Karakterizasyon Çalışması	48
3.2.1.1. İvert Mikroskop Analizi Bulguları	49
3.2.1.2. CFU Analizi Bulguları	50
3.2.1.3. Akım Sitometri Analizi Bulguları	51
3.2.2. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kemik Hücrelerine Farklılaştırılması	56
3.2.2.1. İvert Mikroskop Analizi Bulguları	57
3.2.2.2. Histokimya Analizi Bulguları	58
3.2.2.3. İmmünohistokimya Analizi Bulguları	61
3.2.2.4. Kalsiyum Analizi Bulguları	70
3.2.2.5. ALP Analizi Bulguları	71
3.2.3. mikro RNA Analizi Bulguları	72
3.2.3.1. RNA Sentezi Bulguları	72
3.2.3.2. RT-PCR Analizi Bulguları	73
4. TARTIŞMA	77
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	83
ÖZET	85
SUMMARY	86
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	97

ÖNSÖZ

Oksijenin canlı hayatı üzerinde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Memeli canlıların metabolizması, yaşamlarını sürdürdükleri ortamda oksijenden azami olarak faydalanmak üzerine programlanmıştır. Araştırmalar, düşük oksijen koşulları anlamına gelen hipoksik ortamın canlıların hayatında oldukça önemli etkilere yol açtığını göstermektedir. Bu çalışmada, insan yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin (AMKH'lerin) hipoksik (~%2 O₂) ve normoksik (~%20 O₂) şartlar altında ve osteojenik ortamda osteoblastlara farklılaşma düzeylerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, osteojenik farklılaşma gen/miRNA ifadesi düzeyinde takip edilerek AMKH'lerin osteojenik nesile yönlendirilmesinde kültür ortamındaki oksijen miktarına bağlı olarak ifadesi azalan ve artan miRNA'lar karşılaştırılmıştır.

Yüksek lisans kapsamında bana bu tez konusunu veren ve araştırmalarımın her aşamasında engin fikirleriyle gelişmeye katkı sağlayan ve bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. A. Eser ELÇİN'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince her türlü bilimsel ve laboratuvar desteğini sağlayan Sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e,

Bu süreç boyunca bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen tüm Elçin Lab ekibine,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman beni sabırla dinleyen, desteklerini esirgemeyen arkadaşım Betül Aynoğlu'na,

Bugüne kadar verdikleri maddi ve manevi tüm destekler için ve sevgilerini hiç esirgemeyip hep yanımda oldukları için canım aileme,

Hayatımdaki büyük kararlarda hep arkamda olan, sevgisiyle aslında dünyadaki tüm güzelliklere sahip olduğumu hissettiren Orçun Sertel'e,

Teşekkür ederim.

Bu çalışmadaki tüm deneyler Elçin Lab'da gerçekleştirilmiştir.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AgNO₃	Gümüş nitrat
α	Alfa
a.a	Amino asit
ALP	Alkalın fosfataz
AMKH	Adipoz mezenkimal kök hücre
ASC	Astrofit
BMP	Kemik morfogolik proteini
BSP	Kemik sialo proteini
β	Beta
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik asit
CAR	CXCL12 retiküler hücreler
C/EBPβ	CCAAT/arttırıcı-bağlayıcı protein beta
CFU-F	Fibroblast koloni oluşturma potansiyeli
CD	Farklılaşma grubu (Cluster of Differentiation)
CySC	Kist kök hücresi
CPC	Kap hücreleri
DMEM F-12	Dulbecco's modified eagle medium: Nutrient Mixture F12
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DGCs	Farklılaşmış germ hücreleri
DTC	Distal uç hücre

ECM	Ekstrasellüler matriks
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EPC	Ependim hücre
FCS	Fötal buzağı serumu
FBS	Fötal sığır serumu
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
γ	Gamma
GMP	İyi üretim uygulamaları
GSC	Germ serisi kök hücre
H&E	Hematoksilin ve eosin
Hb	Hemoglobin
HDAC6	Histon deasetilaz 6
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HIF-1α	Hipoksi ile ilgili faktör 1 alfa
HKH	Hematopoetik kök hücreler
IBMX	İzobütil metil ksantin
ISCT	Uluslararası hücre tedavileri derneği
ITS	İnsülin- transferrin- selenöz asit
LSC	Leptin resptör perivasküler stromal hücre
miRNA	Mikro RNA
MKH	Mezenkimal kök hücre
mRNA	Haberci RNA

mL	Bir litrenin binde birine eşit hacim ölçüsü
µg	Kütlece bir gramın milyonda biri (1/1.000.000) (1×10^{-6})
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
NBs	Nöroblast
NSC	Nöral kök hücre
OCN	Osteokalsin
OPN	Osteopontin
P	Pasaj
pH	Bir çözeltinin asidik veya bazlık derecesini gösteren bir ölçü birimi
P/S	Penisilin-streptomisin
PBS	Fosfat tamponlu izotonik çözelti
PEC	Posterior hücre
PO₂	Oksijen basıncı
PPARγ	Peroksizom proliferator-aktifleştirici gamma
pre-miRNA	Öncül miRNA
pri-miRNA	Birincil miRNA
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen bileşenleri
Runx2	Runt ilgili transkripsiyon faktörü 2
SNO	İğ biçimli N ⁺ kaderin osteoblast
TBE	Tris/Borat/EDTA çözeltisi

TF	Transkripsiyon faktörü
TF	Terminal filaman
TGFβ-1	Transforme edici büyüme faktörü beta-1
VCAM-1	Vasküler hücre adhezyon molekülü-1
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü



ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Yıllara göre yapılan mezenkimal kök hücre kaynaklı klinik çalışmalar (Ullah ve ark., 2015'ten değiştirilerek alınmıştır.)	2
Şekil 1.2.	Mezenkimal kök hücrelerin klinik çalışmalardaki faz aşamaları (Squillaro ve ark., 2016'dan değiştirilerek alınmıştır.)	3
Şekil 1.3.	Mezenkimal kök hücrelerin farklı hücre soylarına farklılaşması (Erişim adresi www.rndsystems.com)	5
Şekil 1.4.	Osteojenik indüksiyonun zamana bağlı değişimi (Kulterer ve ark., 2007'den değiştirilerek alınmıştır.)	6
Şekil 1.5.	Adipojenik farklılaşmanın aşamaları (Chen ve ark., 2013'den değiştirilerek alınmıştır.)	7
Şekil 1.6.	Kondrojenik farklılaşmanın aşamaları (Schwarzbauer ve Singh, 2012'den değiştirilerek alınmıştır.)	8
Şekil 1.7.	Farklı kök hücre nişleri (Chen S ve ark., 2013'den değiştirilerek alınmıştır.)	10
Şekil 1.8.	Hematopoetik kök hücre nişi (Lataillade ve ark., 2008'den değiştirilerek alınmıştır.)	11
Şekil 1.9.	Yetişkin kök hücre nişinin bileşenleri (Lane ve ark., 2014'ten değiştirilerek alınmıştır.)	14
Şekil 1.10.	Dokulardaki farklı oksijen seviyeleri (Jez ve ark., 2015'den değiştirilerek alınmıştır.)	16

Şekil 1.11.	Hipoksinin transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel yolağı (Pocock, 2011'den değiştirilerek alınmıştır.)	19
Şekil 1.12.	miRNA'nın biyogenezi (He ve Hannon, 2004'den değiştirilerek alınmıştır.)	24
Şekil 1.13.	Genomik yerleşimlerine göre miRNA'lar (Hinske, 2009'dan değiştirilerek alınmıştır.)	25
Şekil 1.14.	miR-26a'nın osteojenik farklılaşmaya etkisi (Huang ve ark., 2013'ten alınmıştır.)	28
Şekil 1.15.	miRNA'lar mezenkimal kök hücrelerin kaderini belirlemektedir (Kang ve Hata, 2015'ten değiştirilerek alınmıştır.)	29
Şekil 1.16	miR-106a'nın osteojenik farklılaşmaya etkisi (Li ve ark., 2013'ten alınmıştır.)	30
Şekil 1.17.	miR-22'nin osteojenik farklılaşmaya etkisi (Huang ve ark., 2013'ten alınmıştır.)	31
Şekil 2.2.	p-Nitro fenil fosfatın ALP ile hidrolizlenme reaksiyonu	41
Şekil 3.1.	P8 'de insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin görüntüsü	45
Şekil 3.2.	İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizi sonuçları	46
Şekil 3.3.	İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin farklı soy görüntüleri	47

Şekil 3.4.	Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin normoksi ve hipoksi ortamda invert mikroskop görüntüleri	49
Şekil 3.5.	%20 ve %2 oksijen koşullarında CFU boyaması	50
Şekil 3.6.	İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 7.günde hipoksik ve normoksik ortam koşullarında akım sitometri analizi sonuçları	52
Şekil 3.6.Devam	İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 7.günde hipoksik ve normoksik ortam koşullarında akım sitometri analizi sonuçları	53
Şekil 3.7.	İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 28.günde hipoksik ve normoksik ortam koşullarında akım sitometri analizi sonuçları	54
Şekil 3.7.Devam	İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 28.günde hipoksik ve normoksik ortam koşullarında akım sitometri analizi sonuçları	55
Şekil 3.8.	Normoksik ortamda hem kontrol hem de osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin histokimya analizi bulguları (von Kossa boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)	58
Şekil 3.9.	Hipoksik ortamda hem kontrol hem de osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin histokimya analizi bulguları (von Kossa boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)	59
Şekil 3.10.	Hipoksik ve normoksik ortamda osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin karşılaştırmalı histokimya analizi bulguları (von Kossa boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)	60
Şekil 3.11.	Normoksik ortamda hem kontrol hem de osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin histokimya analizi bulguları (Alizarin kırmızısı boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)	61
Şekil 3.12.	Hipoksik ortamda hem kontrol hem de osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin histokimya analizi bulguları (Alizarin kırmızısı boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)	62

Şekil 3.13.	Hipoksik ve normoksik ortamda osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin karşılaştırmalı histokimya analizi bulguları (Alizarin kırmızısı boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)	63
Şekil 3.14.	Normoksik ortamda hem kontrol hem de osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin immünohistokimya analizi bulguları (BSP boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)	64
Şekil 3.15.	Hipoksik ortamda hem kontrol hem de osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin immünohistokimya analizi bulguları (BSP boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)	65
Şekil 3.16.	Hipoksik ve normoksik ortamda osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin karşılaştırmalı immünohistokimya analizi bulguları (BSP boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)	66
Şekil 3.17.	Normoksik ortamda hem kontrol hem de osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin immünohistokimya analizi bulguları (OC boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)	67
Şekil 3.18.	Hipoksik ortamda hem kontrol hem de osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin immünohistokimya analizi bulguları (OC boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)	68
Şekil 3.19.	Hipoksik ve normoksik ortamda osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin karşılaştırmalı immünohistokimya analizi bulguları (OC boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)	69
Şekil 3.20.	7., 14., 21. ve 28. gün in vitro örneklerinin Ca ²⁺ değerleri	70
Şekil 3.21.	7., 14., 21. ve 28. güne ait in vitro örneklerin ALP aktiviteleri	71
Şekil 3.22.	RNA örneklerinin AGE görüntüsü	72
Şekil 3.23.	Çalışmadaki RT-PCR örneği	73

- Şekil 3.24.** miR-106a'nın hipoksik ve normoksik ortamda günlere göre değişen ekspresyon düzeyi 75
- Şekil 3.25.** miR-148b'nin hipoksik ve normoksik ortamda günlere göre değişen ekspresyon düzeyi 75
- Şekil 3.26.** miR-26'nın hipoksik ve normoksik ortamda günlere göre değişen ekspresyon düzeyi 76
- Şekil 3.27.** miR-22'nin hipoksik ve normoksik ortamda günlere göre değişen ekspresyon düzeyi 76



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Osteojenik farklılaşmada kullanılan önemli belirteçler	6
Çizelge 1.2. İn vivo şartlarda farklı kök hücre nişlerinin bileşenleri	15
Çizelge 1.3. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasında miRNA'ların rolü	26
Çizelge 2.1. Hipoksik ve normoksik koşullar altında yapılan analizler	35
Çizelge 2.2. Akım sitometride kullanılan antikorlar	37
Çizelge 2.3. Ters transkripsiyon reaksiyon bileşenlerinin hazırlanması	43
Çizelge 2.4. Kullanılan problemlerin listesi	43
Çizelge 2.5. Primer master mix çalışma çözeltisinin hazırlanması	44
Çizelge 2.6. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun döngü koşulları	44
Çizelge 3.1. İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizi bulguları	46
Çizelge 3.2. Hipoksik ve normoksik koşullar altında yapılan analizler	48
Çizelge 3.3. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin normoksi ve hipoksi ortamında invert mikroskop görüntüleri	51
Çizelge 3.4. 7. ve 28. günde yapılan akım sitometri analizi bulguları	54

Çizelge 3.5. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin normoksik ve hipoksik ortamda osteojenik nesile farklılaşmış gruplarının invert mikroskop görüntüleri	57
Çizelge 3.6. RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri	72
Çizelge 3.7. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizi bulguları	74



1. GİRİŞ

1.1. Kök Hücreler

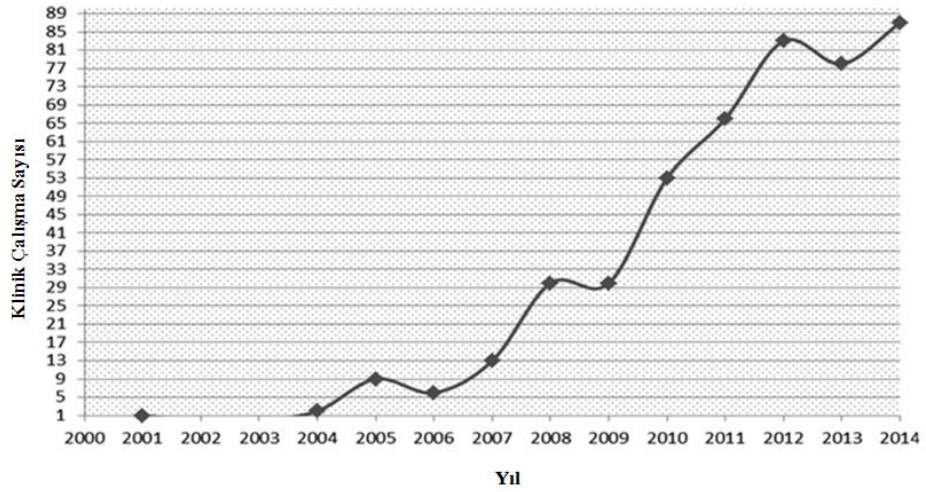
Kök hücreler, birçok dokuda bulunabilen ve gerektiğinde farklılaşarak dokuları oluşturma ya da tamir etme yeteneğine sahip embriyonik, fetal ve yetişkin dönemdeki farklılaşmamış hücrelerdir (Kolios ve Moodley, 2013). Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran birtakım özellikler vardır. Bu özellikler; kendi kendini yenileyebilme yeteneği, tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme ve tek bir hücreden köken alabilmeleridir (Kolios ve Moodley, 2013; Zuk ve ark., 2002).

Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Döllenmeden sonra oluşan hücre (zigot) tüm organizmayı oluşturacak genetik bilgiye ve potansiyele sahiptir. Hücrelerin sahip olduğu bu potansiyel totipotent olarak adlandırılır. Hücrenin totipotent özelliği döllenmeden sonraki 5. güne kadar devam etmektedir. Döllenmeden sonraki 5.günden itibaren hücreler blastosit denilen küresel bir şekil almaktadır. Blastosit içerisindeki hücreler, vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip olmalarına rağmen artık tek başlarına tüm organizmayı oluşturacak potansiyele sahip değildirler. Bu potansiyel ise pluripotent olarak adlandırılır. Embriyoda, blastokist aşamasından sonra gastrulasyon aşaması başlar ve germ tabakaları (ektoderm, mezoderm ve endoderm) oluşur. Bu tabakalara göç eden hücrelerin hangi tip hücrelere dönüşebilecekleri büyük ölçüde bellidir. Dolayısıyla, bu dönemdeki hücreler multipotent (multi: fazla, çok) potansiyel göstermektedir (Avasthi ve ark., 2008; Elçin, 2016a; Kolios ve Moodley, 2013).

Multipotent hücrelerin önemli temsilcileri, hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal kök hücrelerdir.

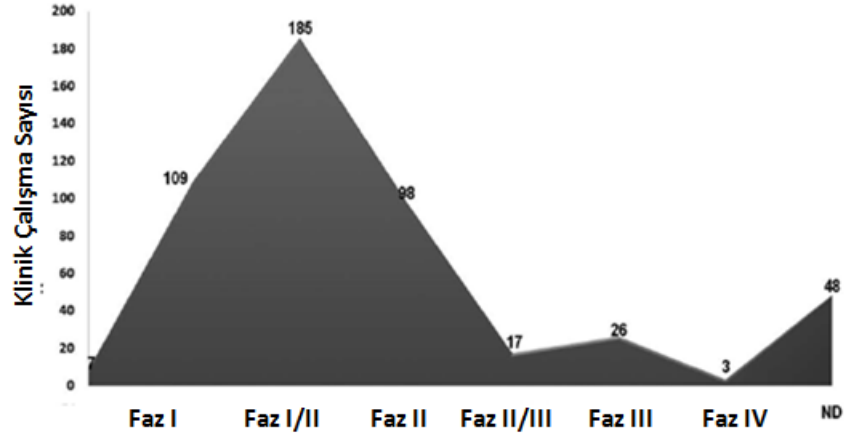
1.2. Mezenkimal Kök Hücreler

Embriyonik kök hücrelerin teratom¹ oluşturabilme özellikleri ve etik düzeyde yapılan tartışmalar, araştırmacıları yeni bir kök hücre kaynağı araştırmaya teşvik etmiştir. Mezenkimal kök hücreler, vücudumuzun tüm dokularından izole edilebilen, multipotent karakterde, fibroblastik yapıda olan kök hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler geçmişte genellikle kemik iliği stromasından elde edilmelerine karşın günümüzde başta adipoz doku olmak üzere, kordon kanı, kordon, plasenta vb. çok çeşitli dokulardan başarıyla elde edilebilmektedir. Hem izolasyonlarının kolay olması hem de kültür koşullarında birçok farklı soya farklılaşmaları bu hücreleri klinik çalışmalarda kullanışlı hale getirmiştir (Elçin, 2016b; Squillaro ve ark., 2016; Wei ve ark., 2013) (Şekil 1.1-1.2).



Şekil 1.1. Yıllara göre yapılan mezenkimal kök hücre kaynaklı klinik çalışmalar (Ullah ve ark., 2015'ten değiştirilerek alınmıştır).

¹ Teratom: doku ya da organ parçaları içeren, üç germ katmanının normal türevlerine benzeyen kapsüllü bir tümördür.



Şekil 1.2. Mezenkimal kök hücrelerin klinik çalışmalardaki faz aşamaları (Squillaro ve ark., 2016'dan değiştirilerek alınmıştır).

1.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Mezenkimal kök hücreler (MKH), ilk olarak 1867 yılında Cohnheim tarafından kemik iliğinde bulunup hematopoetik olmayan hücreler olarak tanımlanmıştır. Cohnheim yaptığı çalışmada bu hücrelerin fibroblast benzeri morfolojiye sahip olduklarını ve hasar durumunda doku bölgesine göç ettiklerini varsaymıştır. Friedenstein ve arkadaşları tarafından 1960 yılında kemik iliği kökenli hücrelerin izolasyonunun, kültürünün ve osteojenik farklılaşmanın yapılması kök hücre araştırmalarına yeni bir boyut kazandırmıştır. Yaptıkları çalışmada kemik iliği kökenli hücrelerin adhezyon yeteneği gösterdikleri, fibroblast benzeri hücre kolonisi oluşturdukları ve diğer hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahip oldukları ortaya konmuştur.

Önceleri, CFU-F (Colony forming unit fibroblast) ve “Kemik iliği stromal fibroblast”ları olarak adlandırılan bu hücreler daha sonra 1991 yılında Caplan tarafından mezenkimal kök/ stromal hücre olarak tanımlanmıştır (Baer ve Geiger, 2012; Kaveh ve ark., 2011 ve Kode ve ark., 2009).

Uluslararası Hücresel Tedaviler Derneği (ISCT) MKH'ler için temel kriterleri belirlemiřtir (Dominici ve ark., 2006). Buna göre MKH'ler;

1. Standart kültür koşullarında plastik yüzeylere yapışma özelliğine sahip olmalıdır.
2. İn vitro koşullarda osteojenik, kondrojenik ve adipojenik hücrelere farklılaşabilmelidir (multipotent karakter).
3. CD73, CD90 ve CD105 yüzey antijenlerini yüksek seviyede ifade etmelidir.
4. Hematopoetik soya ait yüzey antijenleri olan CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, c-kit ifade etmemelidir.

1.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Multipotent Farklılaşma Potansiyeli

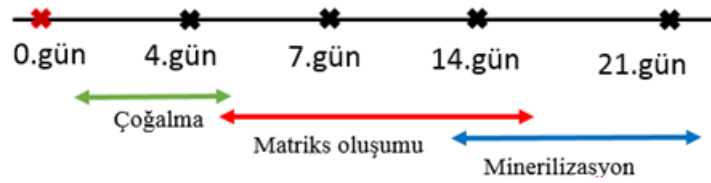
Hücrelerin yenilenmesi veya doku onarımları, kök ve öncül hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasıyla olmaktadır. MKH'ler kültür ortamında adipositlere, osteositlere, kondrositlere, tendona ve ilik stromasını içeren mezenkimal dokulara farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir (Şekil 1.3).

Çizelge 1.1. Osteojenik farklılaşmada kullanılan önemli belirteçler (Huang W ve ark., 2013'den değiştirilerek alınmıştır).

Belirteç	Olgunlaşmamış Osteoprogenitor	Olgun Osteoprogenitor	Preosteoblast	Farklılaşmış Osteoblast	Osteosit
ALP	-	+	++	+++	-
OC	-	-	-	-	+++
OPN	-/+	-/+	-	+	+++
Runx2	+	+	++	+++	+++
Osterix	--	--	++	++	?
Kollajen 1	-	-	++	++	-
BSP	-/+	++			

ALP: Alkalin fosfat; OC: Osteokalsin; OPN: Osteopontin; Runx2: Runt ilgili transkripsiyon faktörü 2; BSP: Kemik sialoprotein

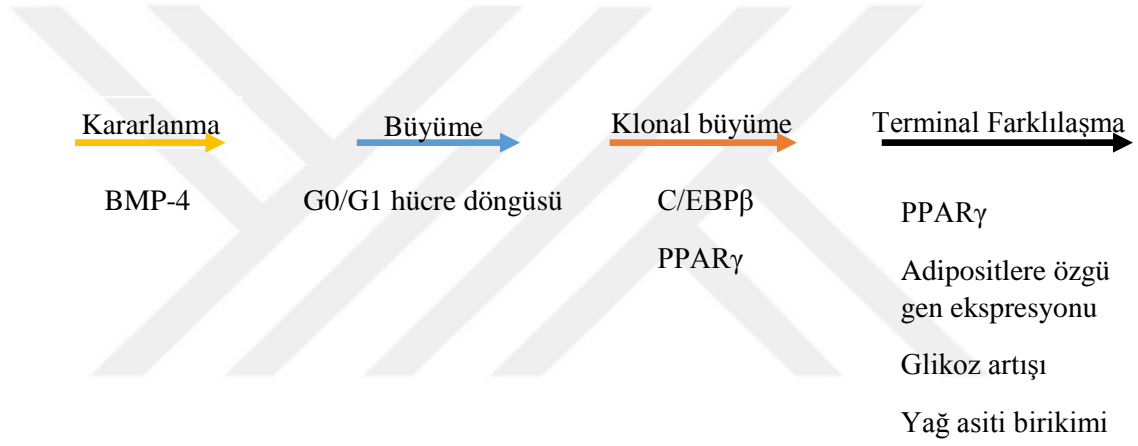
Osteojenik farklılaşmada kullanılan klasik yöntem, mezenkimal kök hücrelerin tek tabaka kültürlerini deksametazon, β -gliserofosfat ve askorbik asit ile 28 gün boyunca kültüre etmektir. Mezenkimal kök hücreler, osteoblastlara farklılaşırken fibroblast benzeri yapılarını değiştirerek kübik şekle dönüşmektedir. Hücreler arası matriks elemanlarından özellikle tip 1 kollajeni sentezlemektedirler. Çöküntü ve nodüller oluşturarak kemikleşmenin başlangıcı ortaya çıkmaktadır. Kemikleşme histolojik olarak Alizarin kırmızısı S ve Von Kossa boyaları ile tespit edilmektedir (Augello ve ark., 2010; Chamberlain ve ark., 2007).



Şekil 1.4. Osteojenik induksiyonun zamana bağlı değişimi (Kulterer ve ark., 2007'den değiştirilerek alınmıştır).

1.2.2.2. In Vitro Adipojenik Farklılaşma

Adipojenik farklılaşma çoğunlukla iki aşamadan oluşmaktadır (Şekil 1.5): Kararlanma ve terminal farklılaşma. Kararlanma aşamasında, yağ dokusunun stromal vasküler alanında bulunan pluripotent mezenkimal kök hücreler preadipositlere dönüşmektedir. Bu dönüşümde BMP (Kemik morfogenezik proteini) önemli rol oynamaktadır. Hücre kültür modellerinde terminal farklılaşma sürecinin başlaması için preadipositlerin yeterli hücre sayısına ulaşması (konfluent olması) beklenmektedir. Konfluent olan preadipositler uygun bir indüksiyon ile olgun adipositlere dönüşmektedir (Chen L ve ark., 2013; Romao ve ark., 2011).

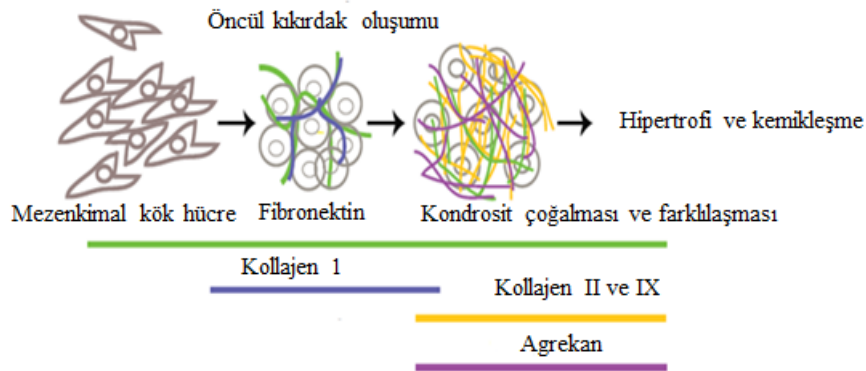


Şekil 1.5. Adipojenik farklılaşmanın aşamaları (Chen ve ark., 2013'den değiştirilerek alınmıştır).

MKH'lerin adipojenik farklılaşması için deksametazon, askorbik asit, izobütil metil ksantin (IBMX), insülin ve indometasin ile muamelesi gerekmektedir. Hücreler, FBS, IBMX, dexametazon, izobütil, indometasin ve antibiyotik ilave edilen yüksek DMEM'li glikoz kültür ortamında, 21 gün boyunca kültüre edilmektedir. Hücre içi biriken lipidler, histokimyasal olarak Nil kırmızısı, Oil kırmızısı boyaması ile tespit edilebilmektedir (Augello ve ark., 2010; Chamberlain ve ark., 2007).

1.2.2.3. In Vitro Kondrojenik Farklılaşma

Kondrojenik farklılaşma süreci, gevşek yapıda olan mezenkimal kök hücrelerin yapısal olarak toplanması ve yoğunlaşmasıyla başlamaktadır. Kemik morfogenik proteini (BMP) gibi faktörler, mezenkimal kök hücrelerin yoğunlaşma aşamasında önemli rol oynamaktadır. Kondrojenik farklılaşmanın bu erken aşamasında yoğunlaşmaya başlayan mezenkimal kök hücreler; tip II kollajen, N-kadherin, N-cam ve tenascin C gibi önemli ekstrasellüler matriks ve hücre adhezyon moleküllerini, bunun yanında en önemli transkripsiyon faktörü olan Sox9 'un sentezini gerçekleştirirler. Kondrositlere farklılaşmaya başlayan mezenkimal kök hücreler, tip II kollajen ve agrekan bakımından yüksek ECM üretmeye başlar. Kondrosit farklılaşmasını takiben hücreler hızlı bir şekilde iskelet elemanlarını oluşturmak için genişleyip, çoğalırlar. İskelet elemanlarının yakınında bulunan hücreler hipertrofik farklılaşma sürecine girerek olgunlaşmaya başlar. Hipertrofik farklılaşma aşamasında; kondrositlerin hücre boyutlarında artış olur, ECM yapısı (kollajen ve fibronektin) değişir ve kalsiyum tuzları ile buldukları çevrede mineralizasyon başlar. Bu aşamadan sonra kıkırdak damarlanmaya başlar ve ECM yapısı yıkılır. Hipertrofik kondrositler apoptosize uğrar. Osteoblast öncül hücreleri yeni oluşan dokuyu işgal ederek kemik oluşumunu başlatırlar (Zuscik ve ark., 2008; Quintana ve ark., 2009) (Şekil 1.6).

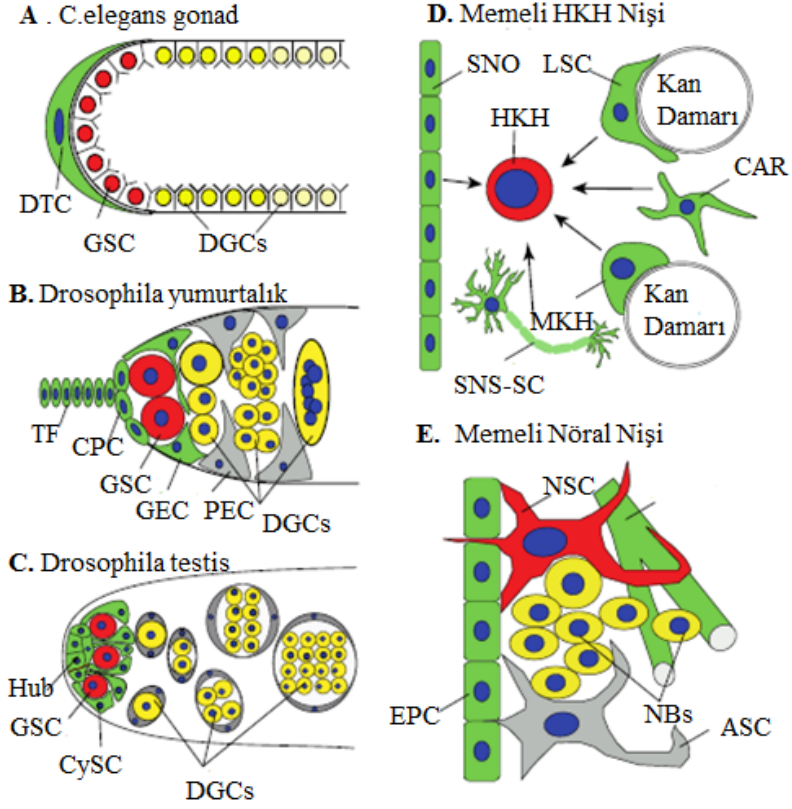


Şekil 1.6. Kondrojenik farklılaşmanın aşamaları (Schwarzbauer ve Singh, 2012'den değiştirilerek alınmıştır).

MKH'lerin kondrojenik farklılaşması için besiyerine ilave olarak deksametazon, askorbik asit, TGF β , BMP-6 ve ITS ile 21 gün muamelesi gerekmektedir. MKH'ler, kondrojenik farklılaşma sırasında fibroblast benzeri görünümülerinden küresel biçime dönüşürler. Hücreler kollajen tip 2'nin oluşturduğu ağısı ve bol miktarda matriks ile çevrelenir. Matriks içerisinde, proteoglikan çökelekleri ve yüksek moleköl ağırlıklı glikozaminoglikan makromoleküllerini de yer almaktadır. Kondrojenik farklılaşma histolojik olarak Alsiyan mavisi, Toliudin mavisi ve Safranin O ile tespit edilmektedir (Augello ve ark., 2010; Barry ve Murphy, 2004; Chamberlain ve ark., 2007).

1.3. Kök Hücrede Niş Kavramı

Doku ve organlarda yer alan kök hücreler; doku bütünlüğünün korunması, büyüme ve yenilenme gibi işlevsel birimlerde önemli rol oynamaktadır. Kök hücrelerin çevreleri ile yeterli iletişimi sürdürmesi, aynı zamanda doku yenilenmesi ve tamiri için gerekli fizyolojik uyarılara tepki vermesi için kayıp veya hasar gibi durumlardan mümkün olduğunca korunması gereklidir. Birçok dokuda koruma ve etkileşim arasındaki bu denge, kök hücreleri koruyan özel bir mikroçevre (niş) tarafından sağlanmaktadır (Wang ve Wagers, 2011). Niş adı verilen bu mikroçevre, kök hücre havuzunu korumakta, aynı zamanda doku homeostazını sağlamaktadır. Kök hücrelerin yanı sıra farklılaşmış hücrelerden, ekstrasellüler matriksten ve çözünebilir faktörlerden oluşan nişin birincil görevi, kök hücrelerin buldukları dokudaki fiziksel organizasyonunu sağlamaktır. İkincil görevi ise sessiz ve aktif kök hücreler arasındaki dengeyi sağlamaktır. Bu denge embriyonik gelişimde, doku yenilenmesinde, doku hasarında veya apoptozla kaybedilen hücrelerin yenilenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Nascimento ve ark., 2013). Kök hücre niş kavramı ilk defa 1978 yılında Schofield tarafından ortaya atılmıştır. Yapılan birçok çalışma ile omurgasız hayvanlarda ve memeli hayvanların organ sistemlerinde çeşitli moleköl sinyaller ile kök hücrelerin sessizliğini, farklılaşmalarını ve dokunun devamını sağlayan özel bir mikroçevrede bulunduğu gösterilmiştir (Rezza ve ark., 2014; Wager, 2012) (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Farklı kök hücre nişleri (Chen S ve ark., 2013'den değiştirilerek alınmıştır).

DTC: Distal uç hücre; DGCs: Farklılaşmış germ hücreleri; TF: Terminal filaman; CPC: kap hücreleri; GSC: Germ serisi kök hücre; PEC: Posterior hücre; CySC: Kist kök hücresi; SNO: İğ biçimli N^+ kaderin osteoblast; HKH: Hematopoetik kök hücre; CAR: CXCL12 retiküler hücreler; MKH: Mezenkimal kök hücreler; NSC: Nöral kök hücre; EPC: Ependim hücre; ASC: Astrozit; NBs: Nöroblast; LSC: Leptin resptör perivasküler stromal hücre

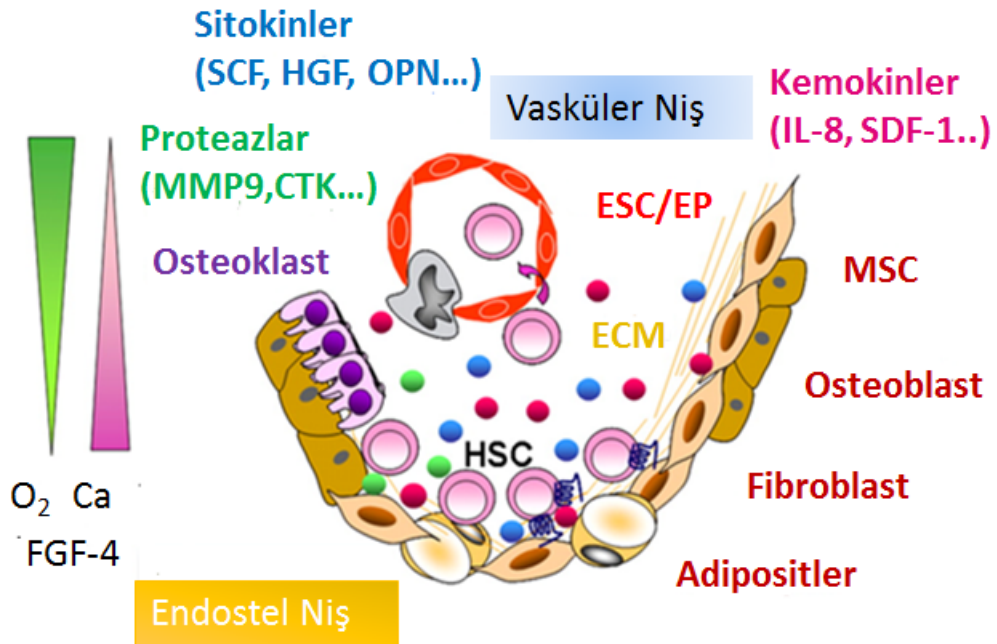
1.3.1. Yetişkin Kök Hücre Nişleri

1.3.1.1. Hematopoetik Kök Hücre Nişi

Yaşam boyunca hematopoetik kök hücreler (HKH) kemik iliğinde görevlerini sürdürmektedir. Bu hücrelerin kendini yenilemesi, hücre siklusunun G0 evresinde sessiz kalmaları, yapışmaları (adhezyonları), çoğalmaları, olgunlaşmaları, farklılaşmaya gitmeleri, mobilizasyon ve yerleşim (homing) gibi birçok karmaşık süreç, kemik iliğinde niş tarafından gerçekleştirilmektedir. Kemik iliğinde HKH'lerin yaşamını sürdürdüğü iki farklı niş bulunmaktadır (Şekil 1.8).

1. Endostel niş (osteoblastik niş): HKH'lerin öncül hücreleri endosteum ile yakın ilişki içerisinde olup burada lokalize olmaktadır. Bu lokalizasyonda en önemli etken osteoblastlardır. Endostel nişte en önemli görevleri üstlenen hücre gruplarının başında osteoblastlar gelmektedir. HKH'ler endostel nişte, G0 evresinde sessiz ya da uyku fazında durmaktadırlar. HKH'leri bu şekilde farklılaşmaya yönelmeksizin sadece kendilerini yenileyebildikleri bir halde tutan ana etmen CXCL12 /CXCL4 etkileşimidir. Bu etkileşim HKH havuzunun devamı için gereklidir. Kemik iliğindeki bir diğer önemli grup ise osteoklast hücreleridir. Bu hücreler CD34 (+) hematopoetik kök hücrelerden oluşurlar ve asıl görevleri kemik rezorpsiyonudur.

2. Vasküler niş (endotelial niş): Endotelial hücreler HKH'lere oksijen, büyüme faktörleri ve besince zengin bir ortam sağlamaktadır. Bu zengin ortam HKH'lerin yaşamalarını, çoğalmalarını ve farklılaşmasını mümkün kılmaktadır (Bydlowski ve ark., 2013 , Kosan ve Godman, 2016).



Şekil 1.8. Hematopoetik kök hücre nişi (Lataillade ve ark., 2008'den değiştirilerek alınmıştır).

1.3.1.2. Adipoz Kökenli Kök Hücre Nişi

Kök hücre ile yapılan ilk çalışmalarda hücre kaynağı olarak kemik iliği kullanılmıştır. MKH'i elde etmek için kemik iliğinin elverişli bir kaynak olduğu bilinmektedir.

Ancak MKH'in elde edilebilmesi için kemik iliği aspirasyonu işleminin invazif (vücut bütünlüğünü bozan) bir işlem olması, lokal anestezi altında hasta için rahatsızlık verici cerrahi bir aşama içermesi, kısıtlı miktarda hücre alınabilmesi, daha fazla hücre alabilmek için spinal veya genel anesteziye ihtiyaç duyulması ve elde edilen kök hücre sayısının aspiratta düşük miktarda bulunması gibi nedenler yenileyici tıp alanında kullanılmalarını zorlaştırmakta ve yeni MKH kaynakları arayışına neden olmaktadır. Adipojenik öncül hücreler 1976 yılında insan adipoz dokusundan da izole edilmiş olsa da, ilk olarak 2001 yılında adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler olarak tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. "Liposuction" yöntemiyle kolayca alınabilmesi, uzun süreli kültürlerde genetik ve morfolojik olarak daha stabil olması ve yüksek çoğalma kapasitesinin olması adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin son yıllarda alternatif bir kök hücre kaynağı olarak ön plana çıkmasını sağlamıştır (Elçin, 2016c; Bajek ve ark., 2016; Lindroos ve ark., 2011; Strioga ve ark., 2012 ve Zuk ve ark., 2001).

Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin kendini yenileme ve asimetric olmayan bölünmelerinin; hormonlar, ekstrasellüler matriks, büyüme faktörü gradientleri, hipoksi ve oksidatif stress gibi niş içerisindeki değişiklikler tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2014). Mikroçevrenin kök hücreleri nasıl koruduğunu ve davranışlarını nasıl etkilediğini anlamak için öncelikle kök hücrelerin nerede konumlandığını iyi bilmek gerekmektedir. Kök hücre nişlerini belirlemek ve karakterize etmek, kök hücrelerin son derece nadir bulunmalarından dolayı zorlaşmaktadır (Jones ve Wagers, 2008). Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin niş yapısı bu yüzden henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Bajek ve ark., 2016).

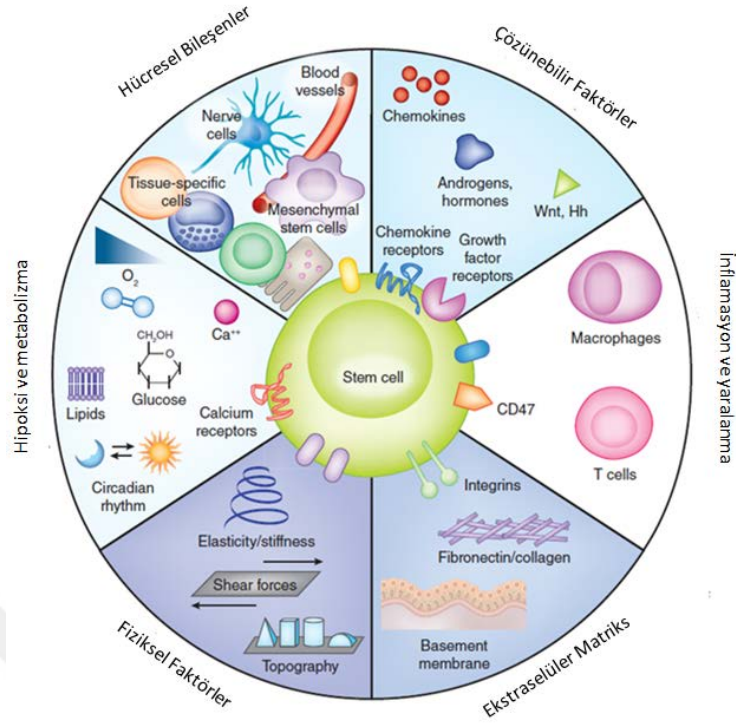
1.3.2. Yetişkin Kök Hücre Nişinin Yapısı ve Bileşenleri

Kök hücreler, organizasyonu ve yapıyı sağlayan ekstrasellüler matriks, biyokimyasal ve mekaniksel bileşenlerle çevrilmiştir (Şekil 1.9). Aynı zamanda, membran proteinleri ve çözünebilir faktörler aracılığıyla kısa süreli sinyalleri sağlayan destek hücreleri ile de ilişki içerisinde.

Uzun mesafeli sinyaller için kan damarlarıyla yakın ilişkide olan niş, sinir sisteminden gelen uyarılara da cevap verebilmektedir. Bu bileşenler grup halinde hareket ederek:

a) Asimetrik hücre bölünmesini uyararak kök hücre havuzunun dengede kalmasını sağlamaktadır.

b) Simetrik hücre bölünmesini uyararak stres veya hasar durumunda hücre büyümesini ve farklılaşmasını arttırmaktadır (Fernandes ve ark., 2013; Gattazzo ve ark., 2014).



Şekil 1.9. Yetişkin kök hücre nişinin bileşenleri (Lane ve ark., 2014'ten değiştirilerek alınmıştır).

Yetişkin kök hücre nişinin bileşenleri 5 kategoride incelenir:

1. Çözünabilir Sinyal Faktörleri: Büyüme faktörleri, sitokinler ve morfojenler gibi küçük proteinler *in vivo* ortamda kök hücrelerin fonksiyonlarını düzenleyen en önemli sinyal molekülleridir. Bu moleküllerden birçoğu çözünabilir ortamda kök hücrelerin kaderini uzun süreli etkileyebilmektedir. Wnt, hedgehog proteinleri, fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve kemik morfojenik proteinler gibi diğer önemli çözünabilir moleküller farklı türlerin nişlerinde bulunabilmektedir (Çizelge 1.2) (Fernandes ve ark., 2013; Zhang H ve ark., 2011).

2. Ekstraselüler Matris: Ekstraselüler matris molekülleri fiziksel destek sağlayan bir zemin oluşturarak kök hücrelerin belli bir yerde kalmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda hücre dışı ortamdan hücre içine sinyal iletiminde görev alarak kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma süreçlerine aracılık

etmektedir. Nişin en önemli yapısal proteinleri kollajenler, elastin, laminin ve fibronektindir (Fernandes ve ark., 2013; Gattazzo ve ark., 2014).

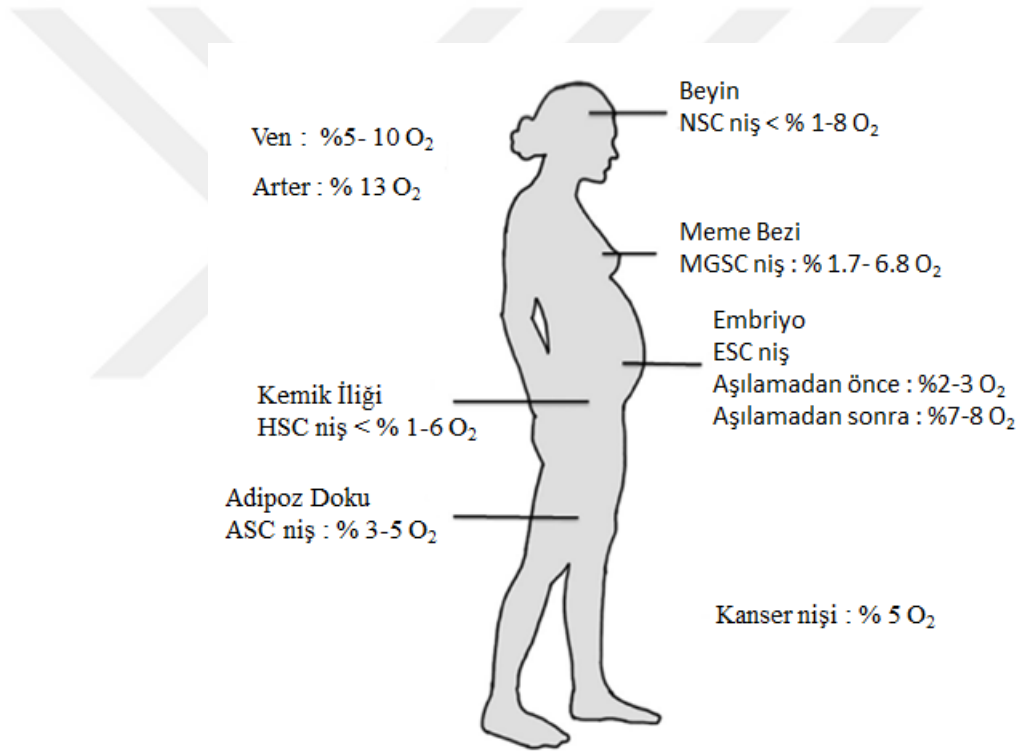
3. Hücre - Hücre Etkileşimi: Memeli kök hücre nişinin önemli bileşeni kök hücrelerin birbirleriyle ve çevresindeki hücreler ile geçit bölgesi veya adhezyon aracılığı ile oluşturdukları fiziksel temasıdır. Fiziksel temas homotipik ve heterotipik olmak üzere iki şekilde olmaktadır. Homotipik temas kök hücrelerin kendileri ile kurdukları temas iken, heterotipik temas kök hücrelerin komşu hücreler ile kurdukları temasıdır. Kök hücreler sıkı bağlantı bölgesi, geçit bölgesi, notch sinyalleşmesi ve adhezyonu sağlayan bölge aracılığıyla niş hücreleri ile ilişki kurmaktadır (Zhang H ve ark., 2011).

Çizelge 1.2. İn vivo şartlarda farklı kök hücre nişlerinin bileşenleri (Jones ve Wagers, 2008; Zhang H ve ark., 2011).

Kök Hücre	Tür	Yeri	Niş hücreleri	ECM	Çözünebilir Faktörler	Hücre- hücre etkileşimi
Germ kök hücresi	D.melanogaster	Testis, Yumurtalık	Hub/cap hücreleri	Temel membran	BMP, JAK-STAT yolakları	Geçit bölgesi, adhezyonu sağlayan bölge
Germ kök hücresi	C. elegans	Gonad	Distal tip hücreleri		Wnt yolağı	NOTCH sinyali
Nöral kök hücre	Memeli	Beyin	Endotelial hücre, astrosit	Tenascin C, N-sülfat, heparin sülfat, integrin	BMP yolağı, EGF, FGF 2 gibi büyüme faktörleri	Sıkı bağlantı bölgesi, adhezyonu sağlayan bölge, NOTCH sinyali
Hematopoetik kök hücre	Memeli	Kemik iliği	Osteoblast, osteoklast, mesenkimal progenitörler, retiküler hücreler, endotelial hücreler	Osteopontin integrin	Wnt yolağı, Oksijen	NOTCH sinyali

4. Fiziksel Faktörler (Mekaniksel Kuvvetler): Mekaniksel kuvvetler hücre bağlanması, yayılma, çoğalma, göç ve farklılaşma gibi fonksiyonları etkilemektedir. Nişin biyomekaniksel karakterini etkileyen mekaniksel kuvvetler sertlik (stiffness), kesme kuvveti (shear force) ve döngüsel gerilim (cyclic strain)'dir (Doğan ve ark., 2016; Zhang H ve ark., 2011).

5. Fizikokimyasal Çevre: Oksijen basıncı (pO_2) ve pH, kök hücre nişinin önemli bileşenleri arasındadır. *In vivo* ortamda hücrelerin oksijen seviyesini ölçmek zordur ve farklı yetişkin dokuların oksijen seviyeleri de birbirinden farklı olmaktadır (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Dokulardaki farklı oksijen seviyeleri (Jez ve ark., 2015 'den değiştirilerek alınmıştır.)

1.4. Düşük Oksijen Seviyesi (Hipoksi)

Oksijen, dokularda gerçekleşen hücresel işlevlerin devamını sağlayan, ATP'nin üretildiği glukoz metabolizmasında son elektron alıcısı olarak rol oynamaktadır. Moleküler oksijen, çok hücreli organizmaların büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan bir moleküldür. Memeliler, moleküler oksijenin yakalanması, bağlanması, taşınımı ve gönderilmesiyle doku düzeyinde oksijen dengesini korumak için fizyolojik mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu mekanizmaların en önemlisi düşük oksijen koşullarını (hipoksi) algılamak ve buna cevap vermektir (Giaccia ve ark., 2004).

Hipoksi, hücresel fonksiyonları etkileyen oksijenin kanda, hücrelerde ve dokulardaki eksikliğine bağlı gelişen fonksiyon bozukluğudur. Hipoksi, dört durumda gerçekleşmektedir (Chan ve Vanhoutte, 2013):

1. **Arteriyal (hipoksik) hipoksi:** Arteriyal kanın yetersiz oksijenasyonu ile oluşmaktadır. Arteriyal pO_2 'nin düşük olduğu tek hipoksi tipidir ve en sık gözlenen hipoksi çeşididir. Uyku apnesine sahip ve yüksek irtifaya çıkan kişilerde görülmektedir.
2. **Anemik hipoksi:** Fonksiyonel Hb miktarındaki yetersizlikten kaynaklanmaktadır. Hb'nin oksijen taşıma kapasitesi azalmaktadır. Karbonmonoksit, hidrojen sülfür, nitrit zehirlenmeleri ve akut masif kanamalarda görülür.
3. **Histotoksik hipoksi:** Dokuya yeterli oksijen ulaşmasına karşın hücreler, sitokrom oksidaz sistemini inhibe eden toksik maddeler nedeniyle oksijenden yararlanamaz.
4. **İskemik hipoksi:** Akciğerlerde pO_2 ve Hb konsantrasyonu normal olmasına rağmen, dokulara ulaşan oksijende azalma söz konusudur. Kalp yetmezliği ve damar tıkanıklığı sonucu ortaya çıkmaktadır.

Mezenkimal kök hücreler özellikle adipoz kökenli kök hücreler, düşük oksijen seviyesindeki bölgede (<%3-5) bulunmaktadır. Düşük oksijen seviyesi kök hücre mikroçevresi için önemli bileşenlerdendir ve kök hücrelerin özelliklerini devam ettirmeleri için gerekli sinyalleri sağlamaktadır. Kök hücreler mikroçevresinde düşük oksijen seviyesinde bulunmalarına rağmen genellikle %20-21'lik atmosferik oksijen ortamında kültüre edilmektedir. Adipoz kökenli kök hücreleri bulunduğu oksijen seviyesinden daha yüksek ortamda kültüre etmek, kök hücrelerin büyüme, farklılaşma, adhezyon yeteneklerini, büyüme faktörlerin salgılanması veya yenileyici potansiyellerini de etkileyebilmektedir (Chung ve ark., 2009; Kaewsuwan ve ark., 2012). Niş içerisinde hücrelerin düşük oksijen seviyelerinde bulunması kök hücrelere çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Bunlardan birisi düşük oksijen seviyesinde kök hücrelerin enerji metabolizmalarını aerobikten anaerobik metabolizmaya çevirmeleridir. Bu dönüşüm sayesinde hücrede ROS (reaktif oksijen bileşenleri) üretimi azalarak DNA hasarı düşük seviyeye indirilir. Hipoksi ayrıca farklı kök hücre sistemlerinde önemli moleküler mekanizmaları aktive etmektedir. Bu aktivasyonda rol oynayan en önemli transkripsiyon faktörü HIF-1 α 'dır. HIF-1 α , kök hücre havuzunu etkileyen birçok önemli genin aktivasyonundan sorumludur (Fernandes ve ark., 2013).

Hücreler ve dokular düşük oksijen koşullarını hızlı bir şekilde algılamak ve hemen cevap vermek zorundadır. Geçici olsa da oksijen azlığı, hücrede protein ve DNA hasarına yol açarak hücresel strese veya hücre ölümüne neden olabilmektedir. Hipoksiye verilen cevap hem transkripsiyonel hem de post-transkripsiyonel mekanizmaları kapsamaktadır (Hawkins ve ark., 2013; Pockock, 2011). Son zamanlarda yapılan çalışmalar standart HIF-1 yolunun yanı sıra, hipoksik yanıtları kontrol etmek için başka bir transkripsiyon yolağının var olduğunu göstermektedir. HIF-1 transkripsiyonel yolağı; oksijen seviyesi, anjiyogenez, nöronal gelişim, hücre sağ kalımı ve çoğalma gibi metabolik olayları düzenlemektedir. Bu düzenlemeye rağmen hücreler ve dokular HIF bağımlı ya da bağımsız gen düzenlenmesi için miRNA aracılı başka bir transkripsiyon mekanizmasına ihtiyaç duymaktadır(Şekil 1.11). Kulshreshtha ve arkadaşları (2008), yaptıkları çalışmada miRNA'ların hipoksik adaptasyonda önemli roller oynadığını ortaya çıkarmıştır.

1.4.1. Düşük Oksijen Seviyesinin Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler Üzerine Etkisi

Hücre kültürü çalışmalarında daha çok büyüme faktörlerinin, besin maddelerinin ve pH gibi özelliklerin hücreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kültür ortamında bu özelliklerden en az araştırılanı ise oksijen koşullarıdır. Bunun sebebi çalışmalarda atmosferik oksijenin hücre büyümesi için yeterli olduğunun düşünülmesidir (Mohyeldin ve ark., 2010). Buna rağmen 1958 yılında ilk kez düşük oksijen koşullarının mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkisine yönelik bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada düşük oksijen seviyesindeki hücrelerin atmosfer koşullarındaki oksijen seviyesine kıyasla daha fazla çoğaldığı tespit edilmiştir. Son yıllarda iyi üretim uygulamaları (GMP) ve hücre proliferasyonundaki standardize çalışmalar sonucunda hipoksinin, mezenkimal kök hücrelerin iyileşme, göç etme ve farklılaşma potansiyelleri için önemli bir düzenleyici olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar ile *in vitro* kültür şartlarında farklı kökenli mezenkimal kök hücreler için en uygun oksijen koşulları araştırılmaktadır (Amarin ve ark., 2013; Das ve ark., 2010). Bu bilgiler doğrultusunda hipoksik ortamda yapılan hücre kültürleri, insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin gerçek ortamlarını yansıtabilir ve çeşitli avantajlar (hızlı çoğalma ve kısa sürede istenilen hücre sayısına ulaşma vb.) sağlayabilir (Ma ve ark., 2009).

Düşük oksijen seviyesinin adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkisine yönelik yapılan çalışmalar aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Hücrelerin düşük oksijen seviyesinde kültüre edilmesinin hücrelerin çoğalma kapasitesini etkilediği yapılan birçok çalışmayla gösterilmiştir. Buravkova ve arkadaşları (2009), lipoaspirattan izole ettikleri mezenkimal stromal hücrelerini hem normoksik (% 20 O₂) hem de hipoksik (% 5 O₂) ortamda kültüre etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada hipoksik ortamda bulunan hücrelerin çoğalma kapasitelerinin normoksik ortama göre 2,9 kat arttığı gözlenmiştir.

Pilgaard ve arkadaşları (2009), % 1 oksijen seviyesinde insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin büyüme, koloni oluşturma (CFU) ve kondrojenik farklılaşma potansiyellerini araştırmıştır. Çalışmada hücrelerin, büyüme ve koloni oluşturma potansiyellerinin düşük oksijen seviyesinden olumlu yönde etkilendiği gösterilmiştir. Ayrıca % 1 oksijen seviyesinin hücre büyümesi ve anjiyogenez ile ilgili transkripsiyon faktörlerini arttırdığı belirlenmiştir. %1-5 arasındaki oksijen seviyesinin ADMKH'lerin çoğalma ve fonksiyonunu artırırken; hücrelerin morfolojisini, canlılığını ve immunfenotipik özelliklerini etkilemediği yapılan diğer çalışmalar ile de desteklenmiştir (Choi ve ark., 2014a; Choi ve ark., 2014b; Feng ve ark., 2014; Fotia ve ark., 2015a ; Kang ve ark., 2014; Pham ve ark., 2016 ve Valorani ve ark., 2012).

Hipoksi, hücrede HIF-1 (hipoksi ile ilgili faktör 1) transkripsiyon faktörünün ifadenmesini etkileyerek VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) ve HGF (hepatosit büyüme faktörü) salgılanmasını arttırmaktadır. Bu gibi büyüme faktörlerinin salgılanması, ADMKH'leri letal hipoksi gibi tehlikeli durumlardan koruyarak sağ kalımlarını desteklemektedir (Hsiao ve ark., 2013; Yue ve ark., 2013). Hipoksi ayrıca kemokinlerin ifadenmesini arttırarak adipoz mezenkimal kök hücrelerin mobilizasyon ve yerleşmesini sağlamaktadır (Rosova ve ark., 2008). Adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler, ekstrasellüler matriks proteinlerine yapışarak doku hasarı veya inflamasyon olan bölgeye göç etmektedir. Bu hücrelerin adhezyon yetenekleri de kültür koşullarındaki oksijen seviyesinden etkilenmektedir. Amos ve arkadaşları (2008), yaptıkları çalışmada AMKH'lerin normoksik ve hipoksik ortamda ECM proteinlerine yapışma hızını ölçmüştür. Çalışma sonunda hipoksik ortamda ADMKH'lerin vasküler hücre adhezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve intrasellüler adhezyon molekülü-1'e yapışma hızının arttığı gözlenmiştir.

Mezenkimal kök hücrelerin yenileyici tıpta kullanılmasının önemli bir nedeni de birçok soya farklılaşabilme yetenekleridir (Elçin, 2003). Yapılan çalışmalarla adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin çeşitli soylara farklılaşma potansiyellerinin hipoksik kültür şartlarında arttığı veya azaldığı gösterilmiştir.

Malladi ve arkadaşları (2006), yaptıkları çalışmada hem normoksik (% 20 O₂) hem de hipoksik (% 2 O₂) ortam koşullarında adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin osteojenik ve kondrojenik farklılaşmasını incelemişlerdir. Çalışma, *in vitro* kondrojenik farklılaşma TGFβ-1 katkılı üç-boyutlu kültür şartlarında gerçekleştirilmiştir. Normoksik ortamda mikrokütle çapı günlere göre giderek azalmıştır. Hipoksi ortamda ise gözle görünür bir fark olmamıştır. Bu şaşırtıcı bir sonuç değildir çünkü yağ doku *in vivo* ortamda daha az oksijen seviyesinde bulunduğundan belki de %2 oksijen seviyesi adipoz dokunun fiziksel ortamını göstermiş olabilir. Çalışmada mikrokütlenin çoğalmasını analiz etmek için DNA miktarı ölçülmüştür. DNA miktarının normoksik ortama kıyasla hipoksi ortamda daha fazla olduğu ve günlere göre de azaldığı görülmüştür. Bu da üç boyutlu kültür ortamında kondrogenez sürerken apoptoz olayının başladığını söylemektedir. Kıkırdağa ait ECM proteini olan tip 2 kollajen ile immunohistokimyasal olarak boyanan mikroküteller de hipoksik ortamda normoksik ortama göre daha az boyama saptanmıştır. Kıkırdak doku avasküler bir yapıda olup endokondral kemikleşme sürecinde hipoksik ortam koşullarına maruz kalmaktadır. Çalışmanın çarpıcı sonuçlarından birisi de hipoksik ortamda kondrojenik farklılaşmanın azalmasıdır. Osteojenik farklılaşma ise osteojenik besiyerine ilave olarak retionik asit ve vitamin D ile gerçekleştirilmiş olup kemikleşme alkalın fosfataz aktivitesi ve mineralizasyon ile gösterilmiştir. Yapılan analizler sonucunda osteojenik farklılaşmanın da ciddi şekilde azaldığı belirtilmiştir. Merceron ve arkadaşları (2009), yaptıkları çalışmada adipoz mezenkimal kök hücreleri % 5 ve % 20 oksijen ortamında kültüre etmişlerdir. Kondrojenik farklılaşmaya özgü belirteçlerin ifadesi artarken, osteojenik farklılaşmaya özgü osteokalsin ifadesinde, mineralizasyonunda ve alkalın fosfataz aktivitesinde (ALP) düşüş gözlenmiştir. Valorani ve arkadaşları (2012), yaptıkları çalışmada adipoz kökenli mezenkimal kök hücreleri yedi gün boyunca hipoksik ortamda kültüre etmişlerdir. Yedinci günün sonunda tekrar normoksik ortam koşullarına dönmüşlerdir. Sonuç olarak, adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin normoksik ortamda başlatılan kültür şartlarına kıyasla üç soy hattına farklılaşmasında artış olduğu gözlenmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada ise %2 oksijen şartlarında kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları inhibe olurken, kondrojenik farklılaşmanın arttığı gözlenmiştir. Bu sonuçların,

hipoksi ortamında ifadesi artan HIF-1a geniyle ilişkisi olduğu düşünülmektedir (Choi ve ark., 2014b).

1.5. miRNA

Mikroribonükleik asitler (miRNA'lar) bitki ve hayvanlarda bulunan, ortalama 18-25 nükleotid uzunluğunda küçük, protein kodlamayan düzenleyici RNA molekülleridir. Lee ve arkadaşları tarafından 1993 yılında *C. elegans*'ta postembriyonik gelişim döneminde, *lin-4* ve *let-7* RNA'ları keşfedilmiştir. Çeşitli küçük RNA molekülleri 2001 yılında bitki ve memelilerde keşfedilmiş ve miRNA adını almıştır (Sato ve ark., 2011; Van Rooij, 2011). İlk keşfedildiği tarihten bu yana 3000 miRNA tanımlanmış ve insan genomunda en az 300 miRNA tespit edilmiştir. miRNA genlerinin sayısal olarak 1000'in üzerinde olduğu tahmin edilmektedir ve %30'unun insan genomunu düzenlediği düşünülmektedir. Memeli mRNA'sının yaklaşık %40-50'sinin translasyon aşamasında miRNA'lar tarafından düzenlenebileceği düşünülmektedir (Chen J ve ark., 2014).

1.5.1. miRNA biyogenezi

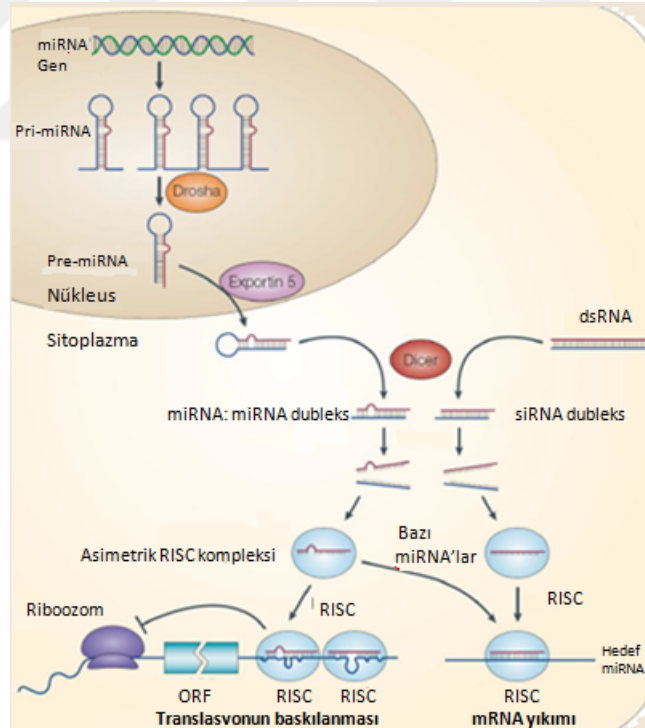
miRNA oluşumu birbirini izleyen birçok basamaktan oluşmaktadır. Bu basamaklar transkripsiyon, pri-miRNA (birincil miRNA), pre-miRNA (öncü miRNA) ve dizi seçilimidir (Şekil 1.12).

i. **Transkripsiyon basamağı:** miRNA genleri; protein kodlamayan genlerden, protein kodlayan genlerin intron bölgelerinden veya bağımsız miRNA genlerinden RNA polimeraz II veya III tarafından transkripte olurlar. miRNA gen transkripsiyonu yaklaşık 500-3000 baz uzunluğundaki pri-miRNA ile başlamaktadır.

ii. **Pri-miRNA basamağı:** Pri-miRNA, mRNA transkripti gibi poli A ve cap kuyruğuna sahip saç tokası şeklindedir. Çekirdekte bulunan pri-miRNA, RNaz III enzim ailesinin endonükleazı olan DGCR8 kompleksi tarafından yaklaşık 70 baz uzunluğundaki pre-miRNA'ya dönüştürülür.

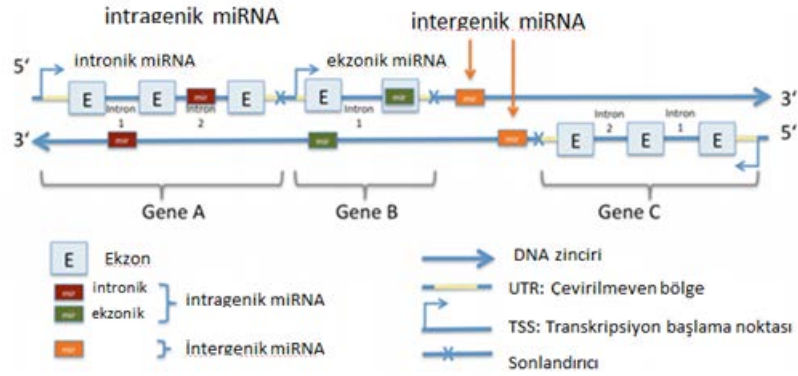
iii. **Pre-miRNA basamağı:** Pre-miRNA molekülü, çekirdekten sitoplazmaya eksportin 5 ve RAN-GTP ile taşınır. Sitoplazmada pre-miRNA'lar, RNaz III enzim ailesinden Dicer ve TRBP/Laquacious kompleksi tarafından saç tokası şekillerini kaybederek çift zincirli yapıya dönüşürler. Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu da başlatır.

iv. **Dizi seçilimi basamağı:** Dicer, pre-miRNA'nın sap-ilmliğini kestikten sonra, miRNA: miRNA çiftinden sadece birisi RISC kompleksine dâhil olmaktadır. RISC kompleksinin içinde yer alan RNaz olan argonaute'un etkisiyle bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olan seçilip komplekse dahil edilir. Bu iplik kılavuz iplik (*guide strand*) olarak adlandırılır. Diğer iplik, anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır, RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. Mikro RNA'lar, aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra, ya argonaute proteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar (Kapinas ve Delany, 2011; Taipaleenmaki ve ark., 2012).



Şekil 1.12. miRNA'nın biyogenezini (He ve Hannon, 2004'den değiştirilerek alınmıştır).

Genomik yerleşimlerine göre miRNA'lar ikiye ayrılmaktadır. İntergenik (gen içi) miRNA'lar buldukları genin aynı zinciri üzerine yerleşmektedir. İntragenik (gen arası) miRNA'lar ise protein kodlayan genler arasına yerleşmektedir (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Genomik yerleşimlerine göre miRNA'lar (Hinske, 2009'dan değiştirilerek alınmıştır).

1.5.2. Gen ekspresyonunun miRNA tarafından düzenlenmesi

Post-transkripsiyonel gen ekspresyonunun miRNA tarafından düzenlenmesi iki mekanizmaya bağlı olarak gerçekleşir. Bu mekanizmalar; mRNA (haberci RNA) yıkımı veya protein sentezinin durdurulmasıdır (Şekil 1.12). Protein sentezinin durdurulması (translasyonel baskı), miRNA-RISC kompleksinin hedef mRNA üzerinde 3'UTR bölgesine bağlanması ile olur. Nadiren de olsa protein sentezinin durdurulması, miRNA-RISC kompleksinin 5'UTR bölgesine bağlanması ile de gerçekleşir (Bartel, 2004; Lytle ve ark., 2007).

1.5.3. miRNA ve Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması

Genetik ve epigenetik değişikliklerin sistematik analizi, mikrodizin tabanlı tekniklerin uygulanması ile kullanılabilir hale gelmiştir. Bu yaklaşımlar translasyon ve transkript aşamasında kök hücrelerin davranışlarını anlamada yardımcı olmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile miRNA'nın multipotent kök hücrelerin farklılaşmasını düzenlediğini göstermesi büyük ilgi uyandırmıştır. Yapılan çalışmalar miRNA'ların hücre proliferasyonunda ve farklılaşmasında önemli rol oynadıklarını göstermiştir. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasında miRNA'ların rolüne yönelik çalışmalar ise Çizelge 1.3'de detaylı bir şekilde gösterilmiştir (Chen J ve ark., 2014).

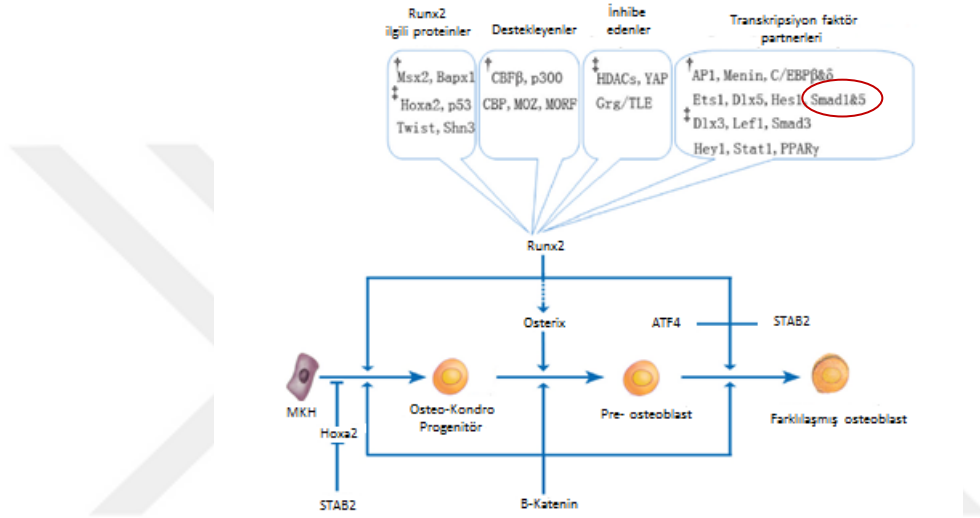
Çizelge 1.3. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasında miRNA'ların rolü (Chen J ve ark., 2014'ten değiştirilerek alınmıştır.)

Farklılaşma	miRNA	Hedef Gen	Etkisi
Osteojenik farklılaşma	miR-26a	SMAD1	Osteogenez baskılanması
	miR-100	BMPR2	Osteogenez baskılanması
	miR31	BMPR2	Osteogenez baskılanması
	miR-17-5p/miR-106a	BMPR2	Osteogenez baskılanması
	miR-486-5p	SIRT1	Osteogenez baskılanması
	miR-196a	HOXC8	Osteogenez indüklenmesi
	miR-218	SFRP2 DKK2	Osteogenez indüklenmesi
	miR-22	HDAC6	Osteogenez indüklenmesi
	miR-148	Runx2 OCN	Osteogenez indüklenmesi
Kondrojenik farklılaşma	miR-194	Sox5	Kondrogenizin baskılanması
Nöronal farklılaşma	miR-133b	IGF-IR	Nörogenezin baskılanması
	miR-125a-3p	IGF2	Bilinmiyor
Adipojenik farklılaşma	miR-17-5p/miR-106a	BMPR2	Adipogenez indüklenmesi
	miR-486-5p	SIRT1	Adipogenez baskılanması
	miR-22	HDAC6	Adipogenez baskılanması
	miR-21	TGFBR2	Adipogenez indüklenmesi
	miR-30a/miR-30d	Runx2	Adipogenez indüklenmesi
	Rno-miR-31	PIK3C ₂ A C/EBP α	Bilinmiyor
	Rno-miR-326	RASSF1 AAK1	Bilinmiyor
	miR-138	EID-1	Adipogenez baskılanması
	miR-27b	PPAR γ	Adipogenez baskılanması
	miR-27a/b	PHB	Adipogenez baskılanması
	miR-363	E2F3	Adipogenez baskılanması

MikroRNA'lar, kök hücrelerin farklılaşmasında büyük bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar mikroRNA'ların bilinen sinyal yolları ile farklılaşmayı engellediğini veya arttırdığını göstermiştir. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin osteojenik ve adipojenik farklılaşmasını veya ikisi arasındaki dengeyi sağlamada görev aldığı bilinen miRNA'lar aşağıda detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

- **hsa-miR-26a**

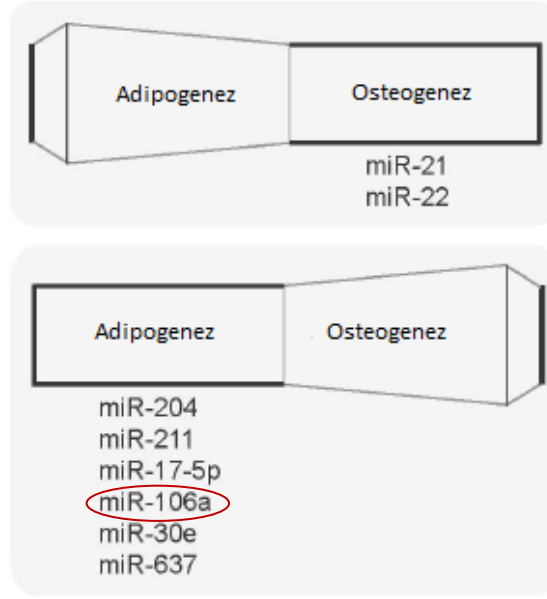
miR-26a, adipoz mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması sırasında, BMP sinyal yolağını düzenleyen Smad1 transkripsiyon faktörünü inhibe etmektedir (Şekil 1.14). Aynı zamanda alkalın fosfataz, osteokalsin, osteopontin ve tip 1 kollajeni gibi osteoblastik belirteçleri de inhibe etmektedir (Luzi ve ark., 2008).



Şekil 1.14. miR-26a'nın osteojenik farklılaşmaya etkisi (Huang W ve ark., 2013'ten değiştirilerek alınmıştır).

- **hsa-miR-106a**

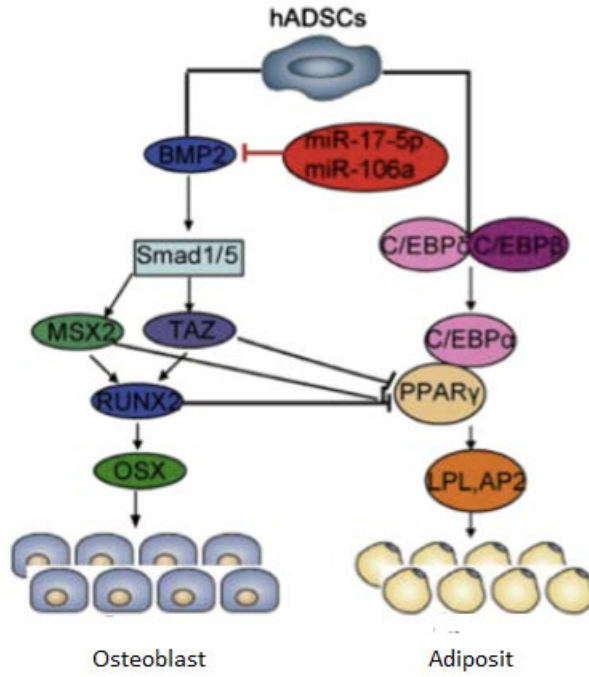
Mezenkimal kök hücreler birden çok soy hattına dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Bu farklılaşmada hangi soyu seçeceği birçok sinyal yolağı tarafından belirlenmektedir. Adipojenik ve osteojenik farklılaşma, Runx2 ve PPAR γ ile birlikte miRNA'lerden da etkilenmektedir. miR-106a osteojenik –adipojenik dengede görev almaktadır (Şekil 1.15). Osteogenezde ekspresyonu azalırken adipojenik farklılaşmada ekspresyonu artmaktadır (Kang ve Hata, 2015).



Şekil 1.15. miRNA'lar mezenkimal kök hücrelerin kaderini belirlemektedir (Kang ve Hata, 2015'ten değiştirilerek alınmıştır).

Li ve arkadaşları (2013), yaptıkları çalışmada yağ dokusundan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma sürecinde 740 miRNA'yı RT-PCR ile incelemiştir. Yapılan çalışma sonucunda şu sonuçlar ortaya çıkmıştır:

- miR-106a'nın osteojenik nesile farklılaşmada ekspresyon seviyesinin azaldığı fakat adipojenik farklılaşmada ise arttığı gözlenmiştir.
- miR-106a'nın hedef geninin BMP2 olduğu belirtilmiştir (Şekil1.16). miR-106a, BMP2'nin 3'UTR bölgesinden bağlandığında mRNA seviyesi değişmezken protein seviyesinde azalma kaydedilmiştir. Bu da miRNA'nın translasyondan sonra etki ettiğini göstermiştir.

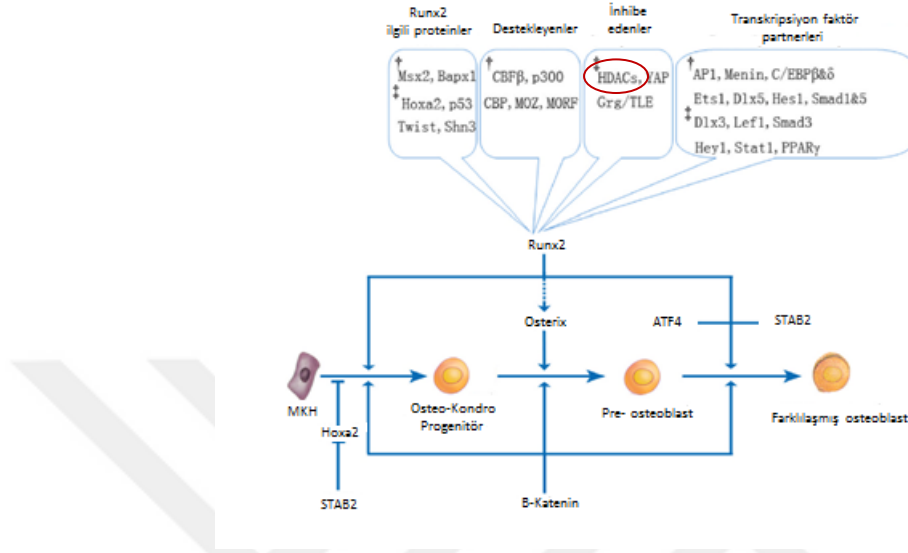


Şekil 1.16. miR-106a'nın osteojenik farklılaşmaya etkisi (Li ve ark., 2013'ten alınmıştır).

- **hsa-miR-22**

Huang S ve arkadaşları (2012), yaptıkları çalışmada, miR-22'nin adipojenik ve osteojenik farklılaşma arasındaki dengede rol oynadığını göstermiştir. Bu dengede adipogenez baskılanmakta, osteogenez ise uyarılmaktadır (Şekil 1.15). Yapılan çalışmada yağ damlacıklarının birikimi azalmış, adipojenik transkripsiyon faktörleri ve ilgili gen ifadesinde azalma gözlenmiştir. Bunun aksine miR-22 osteojenik farklılaşmayı pozitif yönde etkilemiştir. Alkalın fosfat aktivitesi, osteojenik transkripsiyon faktörleri ve matriks mineralizasyonunu artmıştır. miR-22'nin adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelere transfeksiyonu, HDAC6 mRNA ekspresyonunu değiştirmemekle birlikte HDAC6 protein ekspresyonunu arttırmıştır (Şekil 1.17). Bu da miRNA'nın post-transkripsiyonel seviyede etki ettiğini göstermektedir. HDAC farklılaşmaya, kromatin yapısını düzenleyerek ve TF'lerin aktivitesini azaltarak etki etmektedir. HDAC'ın inhibisyonu Runx2 aktivitesini uyararak osteoblast olgunlaşmasını arttırmaktadır.

Bu çalışmada ise HDAC6'nın adipojenik farklılaşmada ifadesinin arttığı, fakat osteojenik farklılaşmada ifadesinin azaldığı gösterilmiştir.



Şekil 1.17. miR-22'nin osteojenik farklılaşmaya etkisi(Huang W ve ark., 2013'ten alınmıştır).

- **hsa-miR-148b**

Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması; genomik değişim veya translasyonun baskılanması gibi hücredeki genetik materyalin modifikasyonunu içerir ve uzun süre kök hücre ve doku mühendisliği uygulamaları için araştırma konusu olmuştur (Bianco ve Robey, 2001; Elçin, 2003). *In vivo* ortamdaki endojenik genetik manipülasyon tekniklerinin ilerlemesi, araştırmacıların spesifik büyüme ve transkripsiyon faktörlerinin regülasyonunu uyarmasına izin vermektedir. Bununla birlikte yüksek dozda ekzojenik rekombinant faktörlerin de benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir (Bonadio, 2000). Liao ve arkadaşları (2014), yaptıkları çalışmada endojen transfeksiyon ile insan adipoz kaynaklı kök hücreleri hem BMP-2 hem de miR-148b ile muamele ettiklerinde *in vitro* ortamda osteojenik belirteçlerin ekspresyon seviyelerinde artış olduğunu tespit etmişlerdir (Liao ve ark., 2014; Walmsley ve ark., 2016). miR148b ile yapılan transfeksiyon çalışmaları osteojenik farklılaşmada rol oynadığını kanıtlar niteliktedir.

1.6. Çalışmanın Amacı

Hücreyel tedaviler kapsamında, kök hücrelerin *in vitro* çoğaltılma ve farklılaştırma işlemlerinin gerçekleştirildiği ortamın oksijen düzeyine bağlı olarak, hücre çoğalma dinamiğinde, elde edilen hücreyel ürünün özelliklerinde ve transplantasyon sonrası etkinlik düzeyi bakımından farklı sonuçlara ulaşıldığı rapor edilmektedir. Bu çalışmada, insan yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin hipoksik (~%2) ve normoksik (~%20) şartlar altında ve osteojenik ortamda osteoblastlara farklılaşma düzeylerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada osteojenik farklılaşma, gen/miRNA ifadesi düzeyinde takip edilerek AMKH'lerin osteojenik nesile yönlendirilmesinde etkili olanlar arasından seçilen miRNA'ların ifade profilleri kültür ortamındaki oksijen miktarına bağlı olarak incelenmiştir.

1.7. Çalışmanın Hipoteziyle İlgili Sorular

1. Düşük oksijen koşullarının osteojenik farklılaşmaya ne yönde bir etkisi olmuştur?
2. Düşük oksijen ve normal ortam koşulları, osteojenik farklılaşmada rol oynadığı düşünülen miRNA'ların ekspresyon seviyesini nasıl etkilemiştir?
3. Seçilen miRNA'lar osteojenik farklılaşmanın hangi evresinde rol oynamaktadır?

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Gereçler

Bu tezde, önceden etik kurul izni (01.03.2010, 08-129 AÜTF) ile temin edilen atık yağ dokusundan izole edilip çoğaltılmış ve fazlası dondurulmuş bulunan mezenkimal kök hücreler kullanıldı. Hücre kültürü çalışmalarında, hücrelerin ekilip çoğaltıldığı steril doku kültür kapları (Corning, ABD), besiyeri olarak DMEM F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12; Lonza, ABD), besiyeri katkısı olarak L-glutamin (Sigma, ABD), penisilin-streptomisin (P/S; Sigma, ABD) ve fetal sığır serumu (FBS) (Sigma, ABD), hücrelerin pasajlanması işleminde ise tripsin/EDTA çözeltisi (Sigma, ABD) kullanıldı. Çalışmaların tamamı laminar akışlı steril kabinde (K system IVF Workstation L226) yapıldı ve hücre kültürleri 37°C, %5 CO₂, %95 nem ortamını sağlayan karbondioksitli inkübatörde (Heracell 150i®, ABD) gerçekleştirildi. İnsan yağ dokusundan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasında besiyeri olarak DMEM LG (Lonza, ABD), besiyeri katkısı olarak L-askorbik asit (Sigma, ABD), β-gliserofosfat (Sigma, ABD) ve deksametazon (Sigma, ABD) kullanıldı. Düşük oksijen seviyesinde gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında, oksijen seviyesi %2'ye kalibre edilmiş karbondioksitli inkübatör (Heracell 240®, ABD) kullanıldı. İnsan yağ dokusundan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin morfolojik yapılarının görüntülenmesi inversiyon mikroskobu (Zeiss, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir.

In vitro çalışmalarda belirlenen zaman noktalarında alkalen fosfataz aktivitesinin ölçümünde QuantiChrom Alkaline Phosphatase Assay Kit (DALP-250, Belçika), kalsiyum içeriğinin belirlenmesinde Quantichrom Calcium Assay Kit (DICA-500, Belçika) kullanıldı. Dalga boyuna göre yapılan spektrofotometrik ölçümlerde SpectraMax M5 model (Molecular Devices, ABD) mikropilaka okuyucu kullanıldı.

Histolojik çalışmalar için 8-hazneli slaytlar (Sigma, ABD) ile hematoksilin-eosin (H&E) (Sigma, ABD), von Kossa ve Alizarin kırmızısı (AR-S) (Sigma, ABD) boya ları kullanıldı. İmmünohistokimya çalışmaları için poliklonal-antikor-osteokalsin ve poliklonal-antikor-kemik sialo proteini (Enzo Biochem, ABD) kullanıldı. Hücreler ışık mikroskobu ile görüntülendi (Leica, ABD).

Agaroz jel elektroforezinde Biorad marka jel tankı ve güç kaynağı kullanıldı. Mikro RNA çalışmalarında alınan hücrelerin RNA içeriğinin korunmasında RNAlater® (Ambion, ABD) çözeltisi kullanıldı. Hücrelerden RNA izolasyonu için High Pure RNA izolasyon kiti (Roche, ABD), cDNA izolasyonu ve eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, için miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (Exiqon, ABD) kullanıldı. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, LightCycler®480 Real-Time PCR Sistemi (Roche, ABD) ile gerçekleştirildi.

2.2. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültüre Edilmesi

Önceki çalışmalardan izole edilip, çoğaltılıp dondurulan(%10 DMSO ve serum) insan mezenkimal kök hücreleri standart yöntemlerle çözülüp kültüre alındı. Dondurulmuş hücreleri içeren kriyo tüpleri önceden 37°C'ye kadar ısıtılmış su dolu beherin içine konuldu ve hücre süspansiyonunun çözünmesi sağlandı. Hücre süspansiyonu alınarak içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik tüplere aktararak santrifüj edildi (1500 rpm'de 5 dk). Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Yıkama işleminden sonra hücreler %10 FBS ile penisilin-streptomisin içeren DMEM F-12 besiyeri içerisinde yeniden süspanse edilerek 37°C, %5 CO₂, %90 nem içeren ortam şartlarında inkübe edildi. Üç günlük hücre kültürünün ardından substrata (yüze ye) yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı. Takip eden günlerde besiyeri haftada üç kere değiştirildi. Kültürü devam eden insan adipoz mezenkimal kök hücreleri, %80 bolluğa ulaştığında tripsin işlemine alındı. Bu işlemde, kültür kaplarındaki vasat uzaklaştırıldıktan sonra, tripsinin serum tarafından inhibisyonunu engellemek için kültür kabı 5 mL steril PBS ile yıkandı. Kültür kaplarına (T75 flask) 3 mL %0,05

Tripsin-0,53 mM EDTA, 12 mL tripsin inhibitörü eklenerek 5-10 dakika inkübatörde bekletildi.

Hücrelerin kültür kabının yüzeyinden kalkması sağlandı. Hücre süspansiyonu kültür kabından alınarak içerisinde 1 mL serum bulunan tüpe aktarıldı ve tripsin inhibe edildi. Hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 5-7 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine besiyeri (tam vasat) eklenerek pipetleme yapılarak homojen bir hücre süspansiyonu elde edildi. Hücre kültür kabına yüzeyi ıslatmak amacıyla 7 mL tam vasat konuldu. Üzerine 1 mL hücre süspansiyonu konularak kültürü yapıldı. Kontrol grubu olarak insan adipoz kök hücreleri 37°C, %5 CO₂, %90 nem sağlayan inkübatörde %75-80 bolluğa ulaşıncaya kadar kültüre edildi. Kültürü yapılan insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon analizleri için akım sitometri ve soy analizi yapıldı. Düşük oksijen seviyesinde (hipoksi) kültürün sürdürülmesi için oksijen seviyesi ayarlanan CO₂ inkübatörü kullanıldı. İnkübatörün oksijen seviyesi % 2 seviyesine azot gazı ilave edilerek düşürüldü. Hipoksik ortamda kültürü yapılan hücrelerin karakterizasyon analizleri normoksik ortam ile karşılaştırılarak yapıldı. Yapılan çalışmalar Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Hipoksik ve normoksik koşullar altında yapılan analizler

<i>% 20 oksijen koşulları</i>	<i>% 2 oksijen koşulları</i>
Karakterizasyon çalışmaları CFU analizi Akım sitometri analizi	Karakterizasyon çalışmaları CFU analizi Akım sitometri analizi
Kemik hücresine farklılaştırma İmmüno/histokimya çalışmaları Ca ⁺² tayini ALP tayini	Kemik hücresine farklılaştırma İmmüno/histokimya çalışmaları Ca ⁺² tayini ALP tayini
miRNA analizi RNA izolasyonu cDNA sentezi ve RT-PCR	miRNA analizi RNA izolasyonu cDNA sentezi ve RT-PCR

2.2.1. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon analizleri Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT)'nin MKH'leri tanımlamak için belirlediği üç temel özelliğe göre yapıldı (Dominici ve ark., 2006).

2.2.1.1 Farklılaştırma Çalışmaları

Yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin uygun farklılaştırma ortamlarında kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabildiğini göstermek amacıyla tohumlanan kök hücrelerin istenilen hücre yoğunluğuna gelmeleri sağlandı. 1 gün sonrasında ise osteojenik farklılaşması için besiyeri olarak düşük glikoz içeren DMEM, besiyeri katkısı olarak 50 µg/mL askorbik asit; 10 mM β-gliserofosfat; 10⁻⁸ M deksametazon kullanıldı. Adipojenik farklılaşma için besiyeri olarak yüksek glikoz içeren DMEM, besiyeri katkısı olarak 0,45 mM IBMX; 10⁻⁷ mM deksametazon; 0,1 U/mL insülin kullanıldı. Kondrojenik farklılaşma için besiyeri olarak yüksek glikoz içeren DMEM, besiyeri katkısı olarak %1'lik ITS çözeltisi (5 µg/mL insülin, 5 µg/mL transferrin, 5 µg/mL selenöz asit); 50 µg/mL askorbik asit; 10⁻⁷ mM deksametazon; 10 ng/mL TGF-β₃; 50 ng/mL BMP6; %1 esansiyel olmayan a.a kullanıldı.

2.2.1.2 CFU analizi

Mezenkimal kök hücrelerin bir diğer özelliği olan koloni oluşturma potansiyellerini incelemek amacıyla CFU analizi yapıldı. %70-80 bolluğa ulaşan hücreler tripsine edildi. Tripsinizasyon aşamasından sonra toplanan hücreler 6'lık kültür kuyucuklarına 100/ 1000/ 10000 adet olacak şekilde ekildi.

Hücreler iki takım olmak üzere hem hipoksik hem de normoksik ortamda 14 gün boyunca kültürü yapılarak %0,5'lik kristal viyole ile 10 dk. boyandı.

2.2.1.3. Akım sitometri analizi

Hücrelerin immünofenotiplendirilmesi için akan hücre ölçer tekniği kullanıldı. Farklı oksijen seviyesinde, Pasaj 8’de bulunan hücreler 7. ve 28. günde tripsine edilerek kaldırıldı. Hücrelerin kaldırılmasından sonra hücre sayımı/hücre canlılığı değerlendirmesini takiben 2 saat içerisinde farklı floresan işaretleyicilere bağlı CD29, CD73, CD133, HLA-DR, CD90, CD105, CD34, lin ve CD31 yüzey antikoları ile 15 dk inkübe edildi (Çizelge 2.2). İnkübasyon sonrası tüplere 1.500 µl FCS-PBS eklenerek santrifüjde yıkama yapıldı. Yıkanan örneklerin supernatanları pipetleme ile uzaklaştırıldı. Pelletlerin üzerine 500 µl FCS-PBS ilave edilerek örnekler okuma yapmak üzere cihaza yerleştirildi. Üç lazerli 10 renk dedektörü bulunan Becman Coulter Navios FCM cihazında her örnekten 10,000 veri toplanarak (önceden belirlenmiş sabit ayarlarda) kaydedildi. Veriler Kaluza yazılımı kullanılarak analiz edildi.

Çizelge 2.2. Akım sitometride kullanılan antikolar

ANTIKOR RENGİ	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	APC	750	PB
Antikorlar	CD29	CD73	HLA-DR	CD90	CD105	CD34	LIN	CD31
Antikorlar	CD29	CD133	HLA-DR	CD90	CD105	CD34	LIN	-

2.3. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kemik Hücrelerine Farklılaştırılması

İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin hem normoksik hem de hipoksik ortamda kültürü gerçekleştirildi. Hücreler bolluk noktasına gelene (konfluent) kadar %10 FBS ile penisilin-streptomisin içeren DMEM F-12 besiyerinde bekletildi. 6.günde konfluent olan hücrelerden kemik hücreleri oluşturmak için besiyeri, %10 FCS, 100 µL/ml penisilin-streptomisin, 50 mg/ml askorbik asit, 10 mM β-gliserofosfat, 10⁻⁸ M deksametazon, %1 esansiyel-olmayan amino asit stok çözeltisi içeren DMEM- LG besiyeri ile değiştirildi.

Bu besiyerlerinden 7.,14., 21. ve 28. günlerde hücre örnekleri alındı. Alınan hücre örnekleri Ca^{+2} , ALP ve mikroRNA analizleri için kullanıldı. Belirli zaman aralıklarında (7., 14., 21., 28. günlerde) osteojenik farklılaşmanın invert mikroskop görüntüleri alındı. Osteojenik farklılaşma histokimyasal (Alizarin kırmızısı ve Von Kossa) ve immünohistokimyasal (OCN, BSP) boyamalar yapılarak incelendi.

2.3.1. Histokimya Çalışmaları

In vitro deneylerde kullanılan örnekler belirli zaman noktalarında histoloji analizleri için %2,5'lük gluteraldehit çözeltisi ile tespit edildi. Hücreler Alizarin kırmızısı S (AR-S) ve von Kossa ile boyanıp ışık mikroskopunda incelendi.

2.3.1.1. Von Kossa boyaması

Von Kossa boyaması hücrelerin hücre dışı matrislerinde biriken kalsiyumun belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır.

Von Kossa boyaması için örnekler, 8 hazneli kültür kaplarında çoğaltıldı.

1. Çoğalan hücrelerin üzerine %5'lik $AgNO_3$ konuldu ve 20 dk. karanlık ortamda muamele edildi.
2. Gümüş nitrat döküldükten sonra hücreler saf su ile dikkatlice yıkandı.
3. Bir sonraki aşamada hücreler 5g Na_2CO_3 : 75 mL saf su: 25 mL formalin çözeltisi ile 2dk. muamele edildi ve saf su ile dikkatlice yıkandı.
4. Hücreler, 2 dk 5 g sodyumtiyosülfat ile fiksasyon yapıldı.
5. Fiksasyon aşamasından sonra hücreler saf su ile dikkatlice yıkandı.
6. 2-3 dk hemotoksin ile muamele edildi.
7. Işık mikroskobu altında görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

2.3.1.2. Alizarin kırmızısı (AR-S) boyaması

Alizarin kırmızı boyaması için hücreler, 8 hazneli kültür kaplarında çoğaltıldı. Alizarin kırmızı boyası, 2 g AR-S/100 mL distile su ile hazırlandı.

1. Örnekler %70-80'lik alkolde ıslatıldı.
2. Alkol aşamasından sonra örnekler saf su ile yıkandı.
3. Hazırlanan Alizarin kırmızı boyası örneklerin üzerini kaplayacak şekilde konuldu ve 5 dk. bekletildi.
4. Süre sonunda alkolle yeniden yıkama yapıldı.

2.3.2. İmmünohistokimya Çalışmaları

In vitro deneylerde 8 hazneli kültür kaplarında çoğaltılan hücreler, 7 günlük periyotlarla % 2,5'lük gluteraldehit içerisinde tespit edildi. İmmünohistokimyasal boyama için izlenen protokol aşağıda verilmiştir.

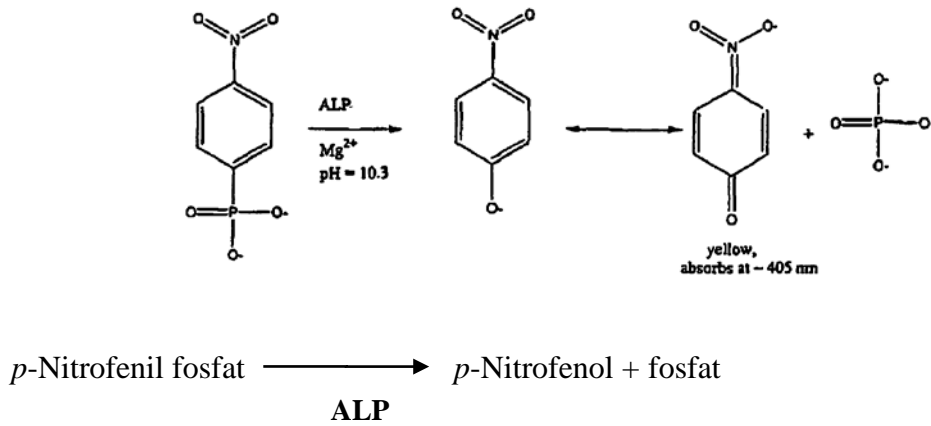
1. Örnekler saf su ile yıkandı.
2. 10 dk. "hidrojen peroksidaz blok" ile muamele edildi.
3. Saf su ile dikkatlice yıkandı.
4. 5 dk boyunca "ultra V blok" ile inkübe edildi.
5. %1'lik FBS içeren PBS ile 1:100 oranında seyreltilmiş çözelti ile hazırlanmış primer antikorla oda sıcaklığında 3 saat inkübe edildi.
6. Saf su ile dikkatlice yıkandı.
7. Biotin işaretli "Poliklonal sekonder antikor" ile 10 dk. inkübe edildi.
8. Saf su ile dikkatlice yıkandı.
9. "Streptavidin peroksidaz" ile 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.
10. Saf su ile dikkatlice yıkandı.
11. 5-20 dk. boyunca "AEC Kromojen-AEC substrat" karışımı ile inkübe edildi.
12. Saf su ile dikkatlice yıkandı.
13. Mikroskop görüntüleri alındı.

2.3.3. Kalsiyum Tayini

Belirlenen zaman noktalarında (7., 14., 21., 28. günlerde) besiyerlerinden alınan örneklerin kalsiyum katyonu (Ca^{+2}) miktarı, QuantiChrom™ Calcium Assay Kiti (DICA-500, Belçika) kullanılarak 612 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik ölçümlerle belirlendi. Test fenol-sülfon ftalein'in serbest kalsiyum ile mavi renkli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Renk yoğunluğu doğrudan örneklerdeki kalsiyum konsantrasyonu ile orantılıdır. Spektrofotometrik ölçümlerde SpectraMax M5 model (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) mikro-plaka ölçer kullanıldı.

2.3.4. Alkalin fosfataz aktivitesi

ALP aktivitesi hücre kültür sistemlerinde osteoblastlar için erken tanı aracı olarak kullanılmaktadır. Kültürden toplanan besiyerinde alkalin fosfataz aktivitesi QuantiChrom Alkaline Phosphatase Assay Kit (DALP-250, Belçika) kullanılarak ölçüldü. Test, Şekil 2.2'de verilen p-nitro fenil fosfatın ALP ile hidrolizlenme reaksiyonundan oluşan sarı rengin 405 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Spektrofotometrik ölçümlerde SpectraMax M5 model (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) mikro-plaka ölçer kullanıldı.



Şekil 2.2. p-Nitrofenil fosfatın ALP ile hidrolizlenme reaksiyonu

2.4. Mikro RNA analizi

İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin miRNA analizi için belirlenen zaman dilimlerinde (7., 14., 21., 28. günlerde) hücreler tripsinlenerek üzerine 100 µL RNeasy[®] lysis reagent eklendi ve pellet pipetleme ile dağıtıldı. Önce +4°C'deki buzdolabına konularak gece boyunca bekletildi; 16-18 saat sonrasında örnekler -80°C'ye ayarlı derin dondurucuya kaldırıldı.

2.4.1. RNA İzolasyonu

Hücrelerdeki RNA izolasyonu High Pure RNA izolasyon kiti ile gerçekleştirildi. Aşağıdaki protokol izlendi.

- -80°C'deki dondurucudan alınan örnekler çözüldükten sonra 10.000 rpm'de 5 dk santrifüje edildi. Santrifüj sonrası supernatant kısım döküldü.
- 200 µL PBS eklenerek hücre pelleti süspansiyon edilerek DNA'nın çözülmesi sağlandı.
- 400 µL lizis bağlama tamponu eklendi ve 15 sn vortekslendi.
- Örnekler, *high pure* filtreli tüplere aktarıldı. Filtreli tüp iki kısımdan oluşmaktadır. Örnekler filtreli tüpün üst kısmına pipetlendi. Alt kısımda ise toplama tüpü bulunmaktadır.
- 8000xg'de 15 sn santrifüje edildi. Santrifüj aşamasından sonra filtreli tüp toplama tüpün içerisinden çıkartıldı. Toplama tüpünde biriken supernatant döküldü. Filtreli tüp tekrardan toplama tüpünün içerisine yerleştirildi.
- Her örnek için 90 µL DNaz I inkübasyon tamponu ve 10 µL DNaz I eklendi. 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon aşamasından sonra 500 µL yıkama tamponu I filtreli tüpe aktarıldı. 8000xg'de 15 sn santrifüje edildi. Santrifüj sonrası altta toplanan supernatant döküldü. RNA'lar filtreli kısımda toplandı.

- 500 µL yıkama tamponu II eklendi ve 8000xg'de 15 sn santrifüje edildi. Toplama tüpündeki süpernatant döküldü.

- 200 µL yıkama tamponu eklendi ve yüksek devirde 2 dk santrifüje edildi.

- Toplama tüpü çıkartıldı ve filtreli tüp temiz 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı.

- Üzerine 50-100 µL elüsyon tamponu eklendi ve 8000xg'de santrifüj edildi.

Alt tarafta kalan mikrosantrifüj tüpünde RNA toplandı.

Elde edilen RNA'ların miktar ve saflık oranlarını analiz etmek için Nanodrop (Thermo Sci, ABD) ile ölçüm yapıldı.

2.4.2. RNA miktarı ve saflığının belirlenmesi

RNA'nın miktarı ve saflığı spektrofotometre (Nanodrop ND-1000) ile ölçüldü. A260/A280 oranının 1,8-2,2 aralığında olması RNA'nın saf olduğunu göstermektedir.

2.4.3. Agaroz jel elektroforezi

Elde edilen RNA'ların bütünlüğü ve kalitesi, yoğunluğu %2 'lik olan agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

Hazırlanan jel için 2 gr agaroz tartılarak 1 X TBE içinde çözüldü. Etidyum bromür'den 5 µL konularak iyice karıştırıldı. 1 µl örnek ve 5 µL yükleme boyası eklenerek 70V'da 2 saat yürütüldü.

2.4.4. cDNA sentezi

cDNA izolasyonu ve eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, için miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (Exiqon, ABD) kullanıldı. RNA örnekleri 5 ng/μL olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile 1:80 oranında seyreltildi. Reaksiyon koşulları Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Ters transkripsiyon reaksiyonu bileşenlerinin hazırlanması

<i>Bileşen</i>	<i>Miktar</i>
5X reaksiyon tamponu	2 μL
Örnek	7 μL
Enzim mix	1 μL
Total RNA	10 μL

Reaksiyon çözeltisi yavaşça pipetlendi. 42 °C'de 60 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra ters transkripsiyonların inaktifleşmesi için 95°C'de 5 dk ısıtıldı. Soğutulması 4°C'de gerçekleştirildi. Yapılan bu işlemler BioRad Thermal Cycler T100'de gerçekleştirildi. Cihazdan alınan örnek tüpleri daha sonra qRT-PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere -20 °C'deki dondurucuya kaldırıldı.

2.4.5. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

cDNA örnekleri 1:80 oranında seyreltildi (5 μL örneğe 395 μL nükleaz içermeyen su eklenir). Primer master mix çalışma çözeltisinin hacimleri (Çizelge 2.5) örnek sayısına göre değişmektedir.

Çizelge 2.4. Kullanılan primer/probların listesi

primer/ problar	Referans Genler
Hsa-miR-106-5p	U6
Hsa-miR-26a-5p	SNORD38B
Hsa-miR-148b-3p	
Hsa-miR-22-5p	

Çizelge 2.5. primer master mix çalışma çözeltisinin hazırlanması

<i>Bileşen</i>	<i>Miktar</i>
PCR master mix	5 µL
PCR primer mix	1 µL
Dilue edilmiş RNA örnekleri	4 µL
Total hacim	10 µL

Karışım hazırlandıktan sonra 6 µL kullanılan problardan ve 4 µL örneklerden alınarak 96-kuyulu reaksiyon kabının her bir kuyusuna toplamda 10 µL olacak şekilde eklendi. Optik yapışkan film ile plakanın üstü kapatıldı. Plaka, LightCycler®480 Real-Time PCR System (Roche, ABD) cihazına yerleştirildi. Reaksiyon koşulları çizelge 2.6’da gösterilmektedir.

Çizelge 2.6. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun döngü koşulları

Polimeraz aktivasyonu/Denatürasyonu	95 °C 10 dk
Amplifikasyon	45 amplifikasyon döngüsü 95 °C 10 sn 60 °C 1 dk
Erime eğrisi	Hayır

Deney protokolünün sonlanması ardından sonuçlar, cihazın yazılımında bulunan programlar doğrultusunda analiz edildi.

2.4.6. İstatistiksel Analiz

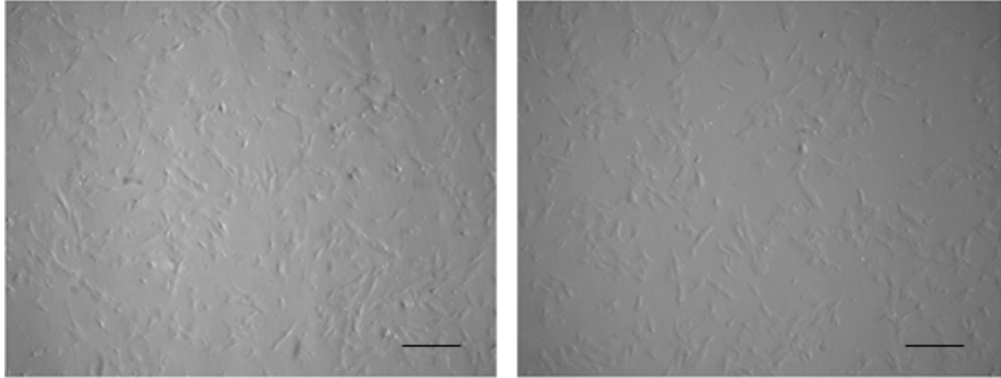
Tüm deneysel çalışmalar üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve ortalama±standart sapma şeklinde verildi. Örneklerin anlamlılık düzeylerinin belirlenebilmesi amacıyla “t testi” kullanıldı. Minimum güven düzeyleri %95 (p<0,05) olarak belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Önceden (01.03.2010, 08-129 AÜTF) etik kurul izni ile temin edilen atık yağ dokusundan izole edilip çoğaltılmış ve fazlası dondurulmuş hücrelerin, mezenkimal hücre olma kriterlerini sağladığının belirlenmesi için soy analizi ve akım sitometri tekniği kullanıldı.

İlk olarak hücrelerin kültür koşullarındaki hücresel morfolojisi invert mikroskobu ile incelendi. Tüm hücrelerin içinde büyütüldükleri kabın tabanına yapışarak fibroblastoid hücre morfolojisi gösterip, 7-10 gün içerisinde çoğaldıkları gözlemlendi (Şekil 3.1).

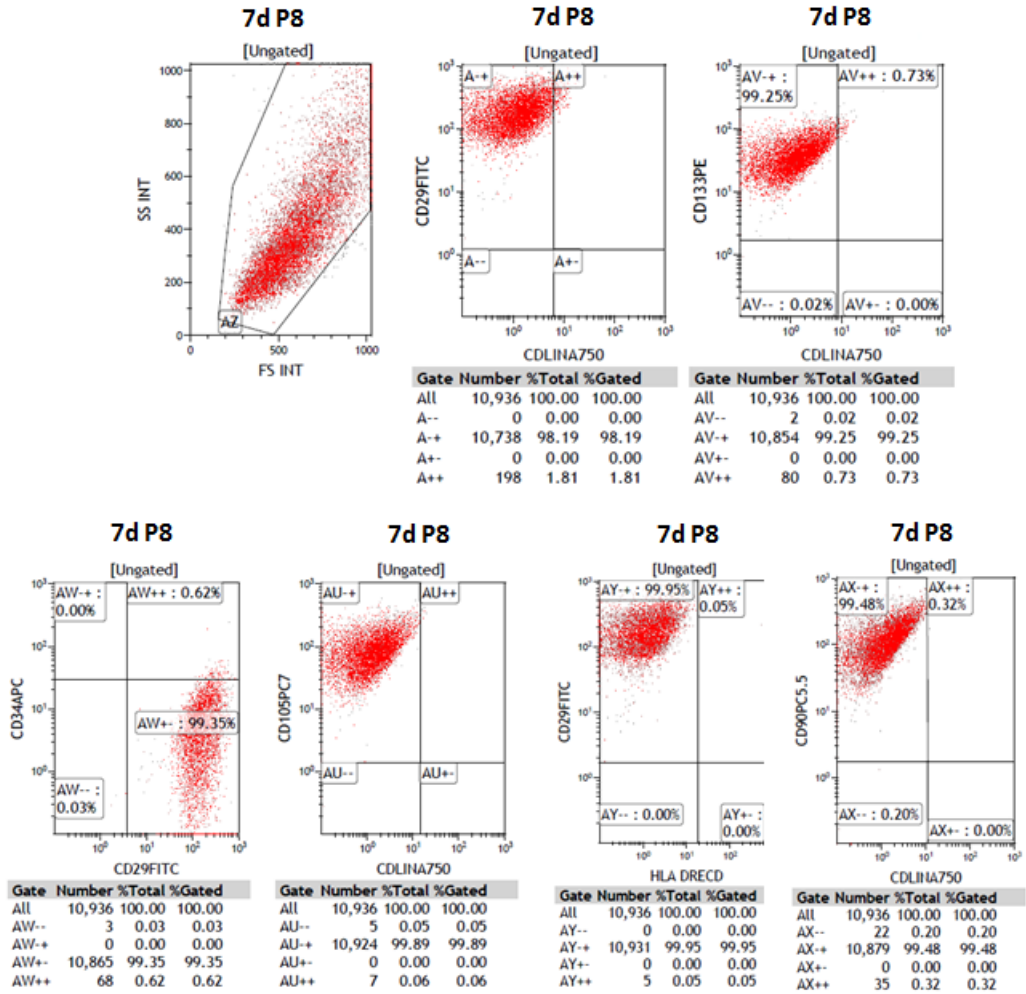


Şekil 3.1. P8 'de insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin görüntüsü (Boyut çubuları = 100µm)

Aynı hücreler ile gerçekleştirilen akım sitometri analizi sonrasında, hücrelerin adipoz kaynaklı kök hücre olma kriterlerinde belirtilen yüzey molekül belirteçlerinden CD29, CD73, CD105, CD90 ve CD133'ü pozitif olarak eksprese ettiği; CD31, CD34, Lin ve HLADR eksprese edilmediği görüldü (Çizelge 3.1, Şekil 3.2).

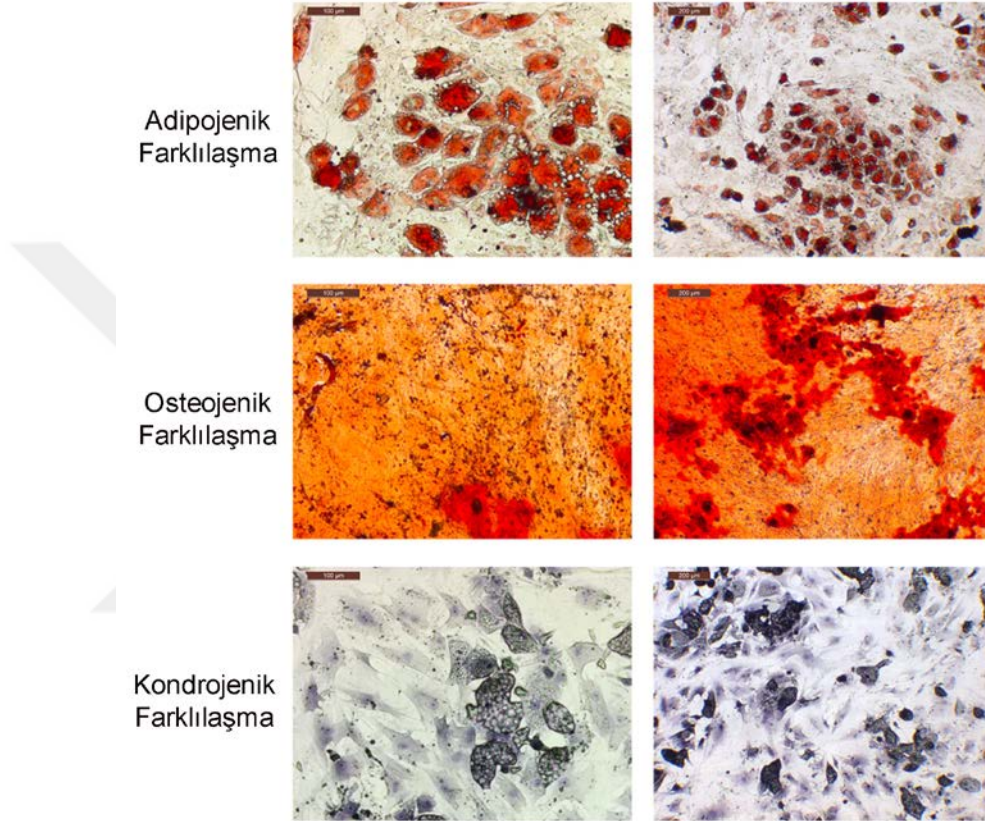
Çizelge 3.1. İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri sonuçları

ANTİJEN	% POZİTİFLİK	YORUM
CD29	98,19	POZİTİF
CD73	99,82	POZİTİF
CD133	99,25	POZİTİF
CD90	98,99	POZİTİF
CD105	99,74	POZİTİF
CD34	0,62	NEGATİF
LIN	1,47	NEGATİF
CD31	1,98	NEGATİF
HLA-DR	0,03	NEGATİF



Şekil 3.2. İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analiz sonuçları

Son olarak kültürü yapılan hücreler *in vitro* koşullarda osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyelleri bakımından değerlendirildi. Hücrelerin, 7-28 günlük farklılaşma ortamında kültüre edilmeleri sonrasında etkin bir şekilde osteojenik, kondrojenik ve adipojenik yönde farklılaştığı invert mikroskobu ile görüntülendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin farklı soy görüntüleri (Adipojenik boyama: Oil-O kırmızısı, osteojenik boyama: Alizarin kırmızısı; kondrojenik boyama: Safranin O)

Yapılan çalışmalar doğrultusunda kültürü yapılan insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT) tarafından belirlenmiş kriterleri sağladığı gösterildi.

3.2. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Normoksi ve Hipoksi Ortamında Yapılan Analizleri

Çalışmanın bu aşamasında belirli yoğunluğa ulaşan (%70-80 bolluğa) mezenkimal kök hücreler, hem normoksi (%20 O₂) hem de hipoksi (%2 O₂) koşullarında kültüre edildi. Her iki koşulda gerçekleştirilen analizler Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Hipoksik ve normoksik koşullar altında yapılan analizler

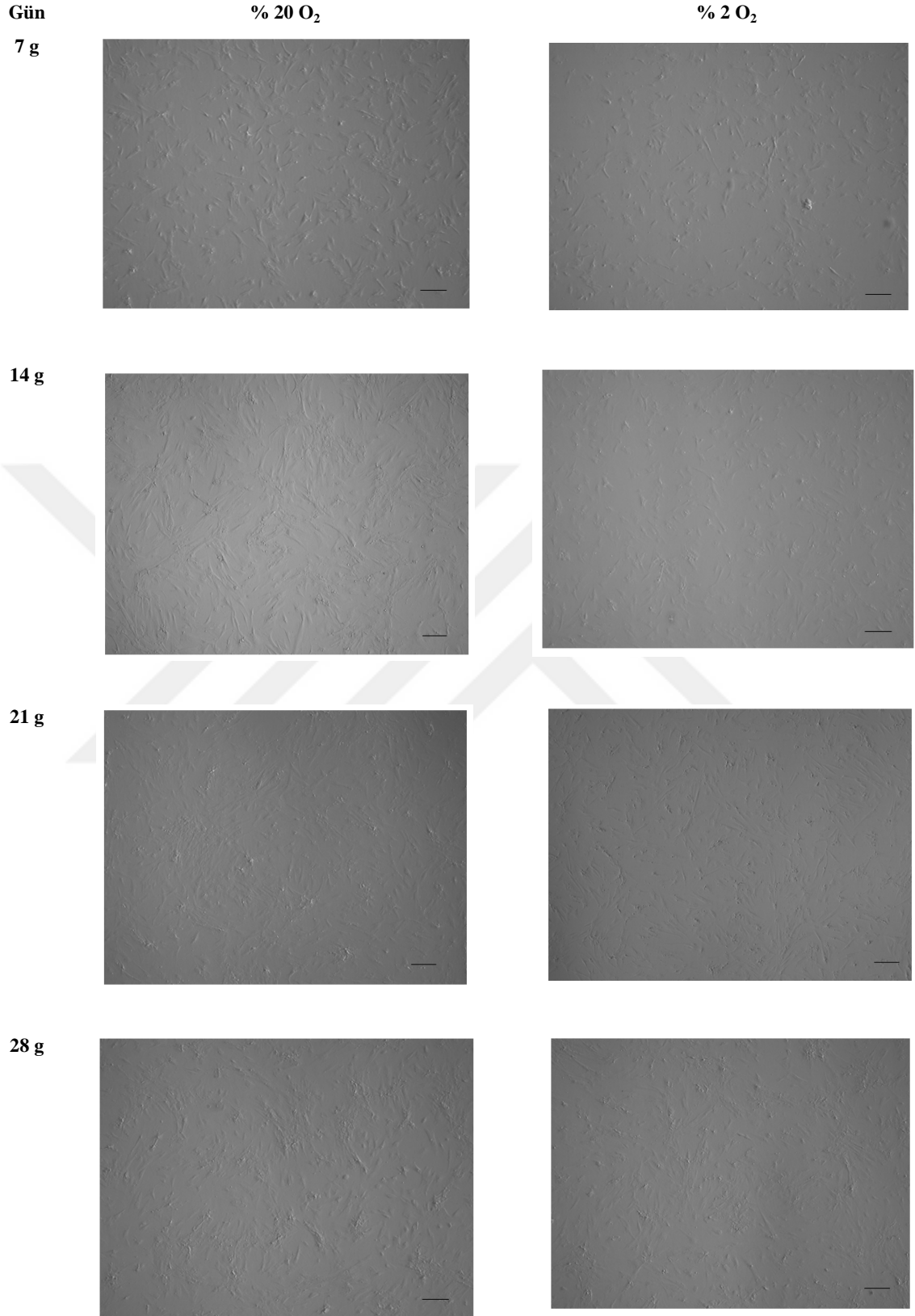
<i>% 20 oksijen koşulları</i>	<i>% 2 oksijen koşulları</i>
Karakterizasyon çalışmaları <ul style="list-style-type: none">İnvert mikroskop görüntüleri<ul style="list-style-type: none">CFU analiziAkım sitometri analizi	Karakterizasyon çalışmaları <ul style="list-style-type: none">İnvert mikroskop görüntüleri<ul style="list-style-type: none">CFU analiziAkım sitometri analizi
Kemik hücresine farklılaştırma <ul style="list-style-type: none">İnvert mikroskop görüntüleriİmmüno/histokimya çalışmaları<ul style="list-style-type: none">Ca tayiniALP tayini	Kemik hücresine farklılaştırma <ul style="list-style-type: none">İnvert mikroskop görüntüleriİmmüno/histokimya çalışmaları<ul style="list-style-type: none">Ca tayiniALP tayini
miRNA analizi <ul style="list-style-type: none">RNA izolasyonucDNA sentezi ve RT-PCR	miRNA analizi <ul style="list-style-type: none">RNA izolasyonucDNA sentezi ve RT-PCR

3.2.1. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklı Oksijen Koşullarında Karakterizasyon Çalışması

3.2.1.1. İnvert mikroskobu bulguları

İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin düşük oksijen seviyesinde (%2 O₂) karakteristik özelliklerini koruyup koruyamadığını anlamak için ilk olarak morfolojik özellikleri invert mikroskobu ile incelendi.

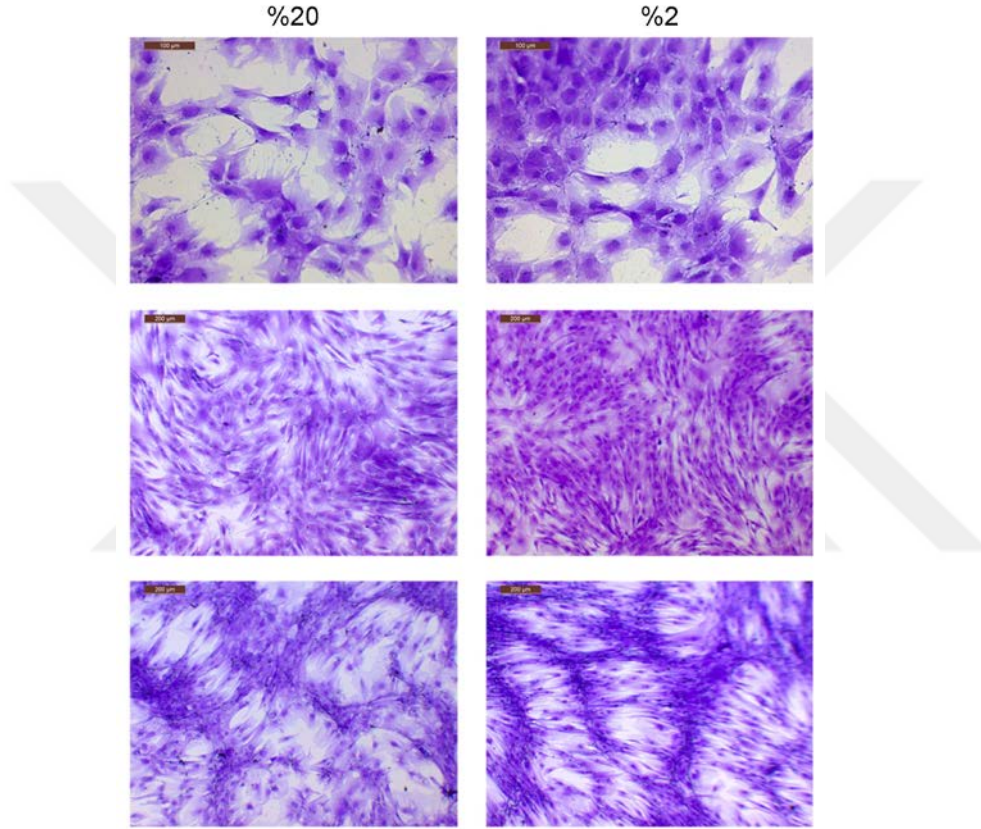
28 gün boyunca kültüre edilen hücrelerin fibroblast benzeri morfolojilerini hem normoksi hem de hipoksi ortamda koruduğu gözlemlendi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin normoksi ve hipoksi ortamda invert mikroskop görüntüleri (Boyut çubukları = 100µm)

3.2.1.2. CFU bulguları

İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin düşük oksijen seviyesindeki koloni oluşturma özellikleri CFU analizi ile incelendi. Yapılan çalışmada farklı oksijen seviyelerinde bulunan adipoz mezenkimal kök hücrelerin koloni oluşturma potansiyelleri bakımından bir fark görülmedi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. %20 ve %2 oksijen koşullarında CFU boyaması (CFU boyaması: Kristal viyole)

Farklı oksijen seviyesindeki hücrelerin koloni sayım sonuçları (hücre/cm²) ölçüldü:

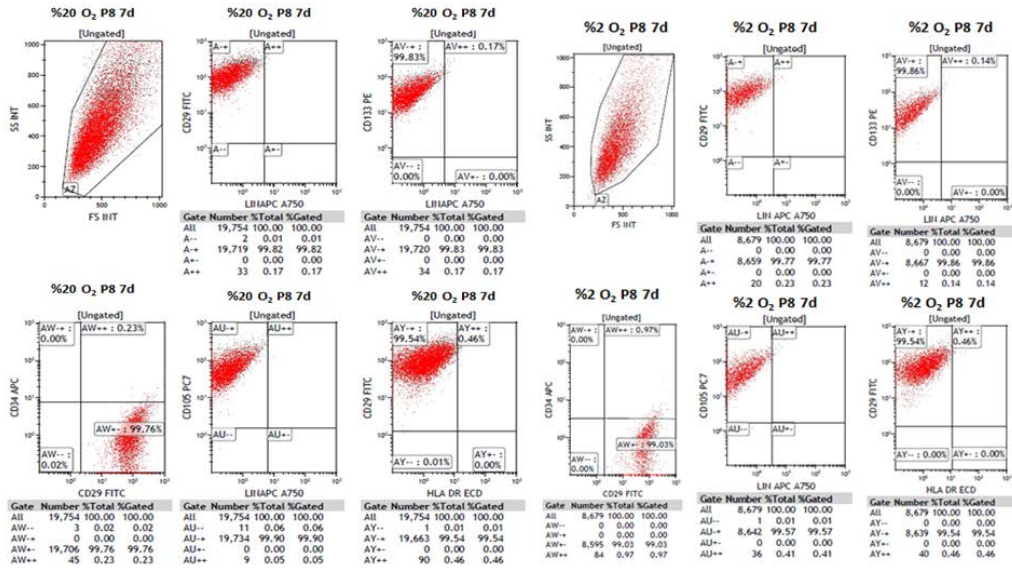
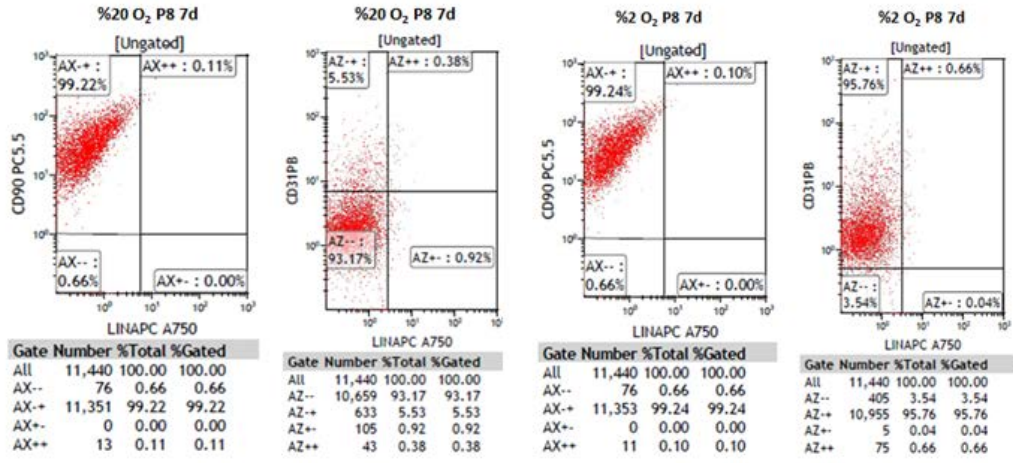
Oksijen Seviyesi	7.gün Koloni Sayısı	14.gün Koloni Sayısı	21.gün Koloni Sayısı	28.gün Koloni Sayısı
% 20 O ₂	325	850	1055	1370
% 2 O ₂	450	900	1065	1400

3.2.1.3. Akım sitometri bulguları

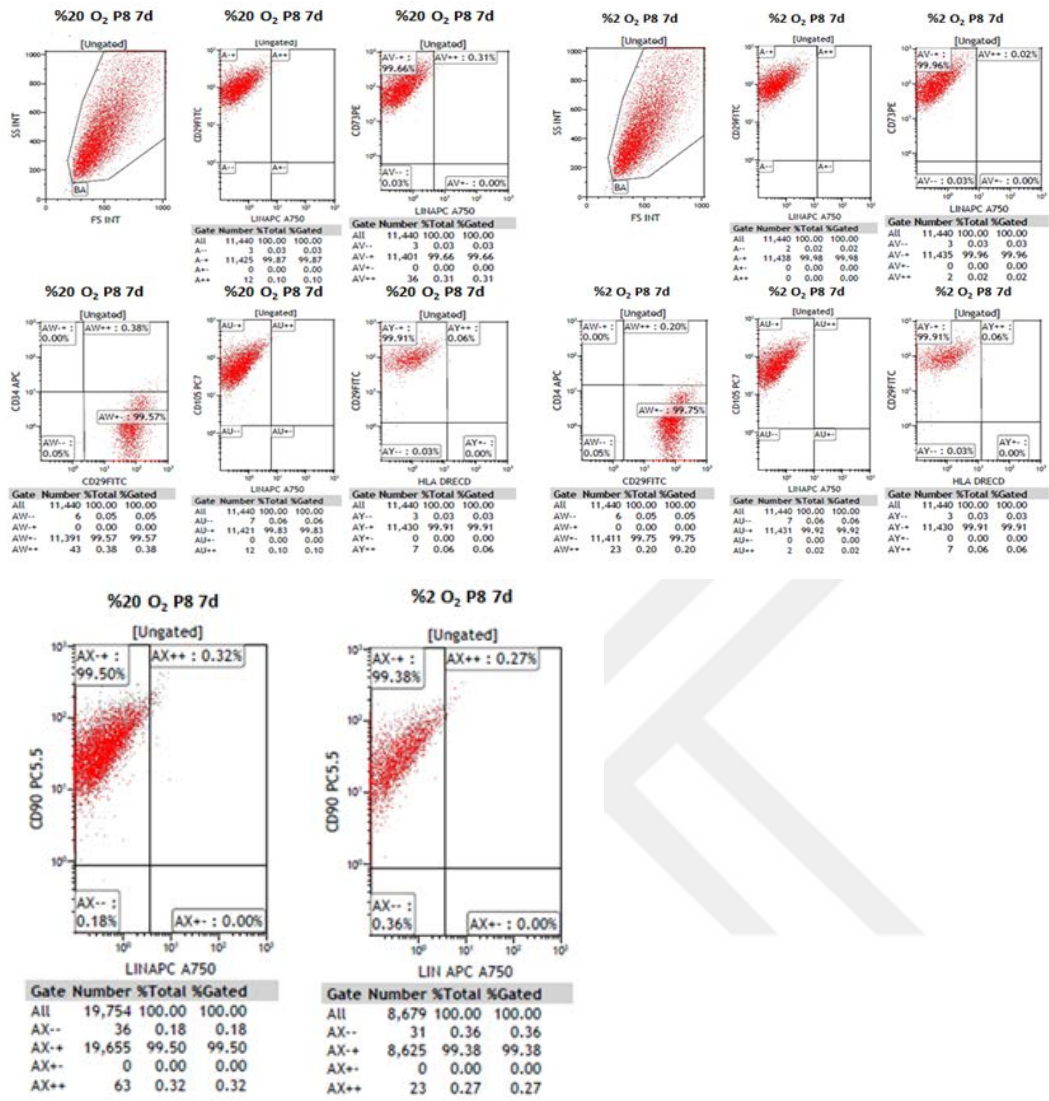
Yağ dokudan izole edilen ve farklı oksijen seviyelerinde (%2 O₂ -%20 O₂) kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin yüzey molekül belirteçleri akım sitometri ile ölçüldü (Çizelge 3.3-3.4). hADMKH'ler yüzey molekül belirteçlerinden CD29, CD73, CD105, CD90 ve CD133'ü pozitif olarak eksprese ederken; CD31, CD34, Lin ve HLADR ekspresyonu görülmedi. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin farklı oksijen seviyelerinde aynı yüzey belirteçlerini benzer oranlarda eksprese ettiği gözlemlendi (Çizelge 3.3, Şekil 3.6, Çizelge 3.4, Şekil 3.7).

Çizelge 3.3. İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 7.günde hipoksi ve normoksi ortam koşullarında akım sitometri sonuçları

ANTİJEN	% POZİTİFLİK		YORUM
	%20 O ₂	%2 O ₂	
CD29	99,87	99,98	POZİTİF
CD73	99,66	99,96	POZİTİF
CD133	99,83	99,86	POZİTİF
CD90	99,22	99,24	POZİTİF
CD105	99,83	99,92	POZİTİF
CD34	1,43	3,36	NEGATİF
LIN	0,31	0,27	NEGATİF
CD31	0,38	0,66	NEGATİF
HLA-DR	0,46	0,46	NEGATİF



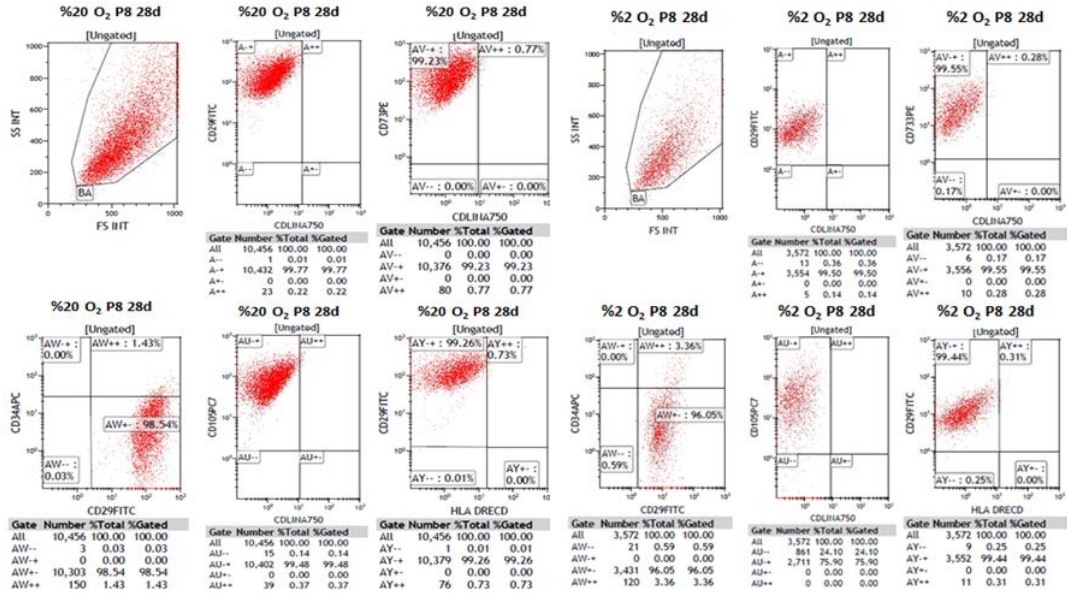
Şekil 3.6. İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 7.günde hipoksik ve normoksik ortam koşullarında akım sitometri analiz sonuçları



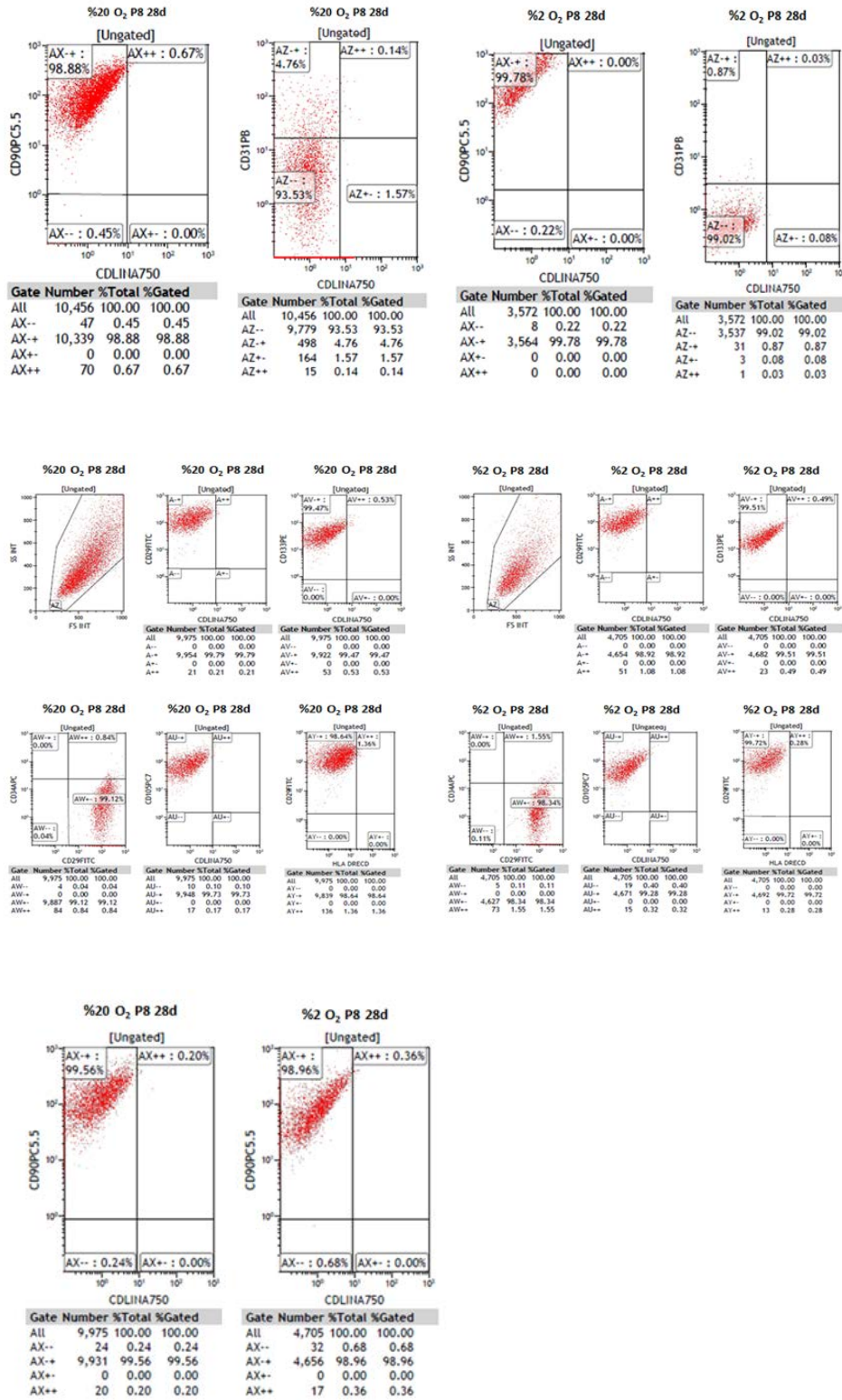
Şekil 3.6.Devam. İnsan yağ doku kaynaklı mezankimal kök hücrelerin 7.günde hipoksik ve normoksik ortam koşullarında akım sitometri analiz sonuçları

Çizelge 3.4. İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 28.günde hipoksi ve normoksi ortam koşullarında akım sitometri analizi sonuçları

ANTİJEN	% POZİTİFLİK		YORUM
	%20 O ₂	%2 O ₂	
CD29	99,77	99,50	POZİTİF
CD73	99,23	99,55	POZİTİF
CD133	99,47	99,51	POZİTİF
CD90	98,88	99,78	POZİTİF
CD105	99,48	75,90	POZİTİF
CD34	1,43	3,36	NEGATİF
LIN	0,17	0,36	NEGATİF
CD31	0,14	0,03	NEGATİF
HLA-DR	0,73	0,31	NEGATİF



Şekil 3.7. İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 28.günde hipoksik ve normoksik ortam koşullarında akım sitometri analiz sonuçları



Şekil 3.7. Devam. İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 28.günde hipoksik ve normoksik ortam koşullarında akım sitometri analiz sonuçları

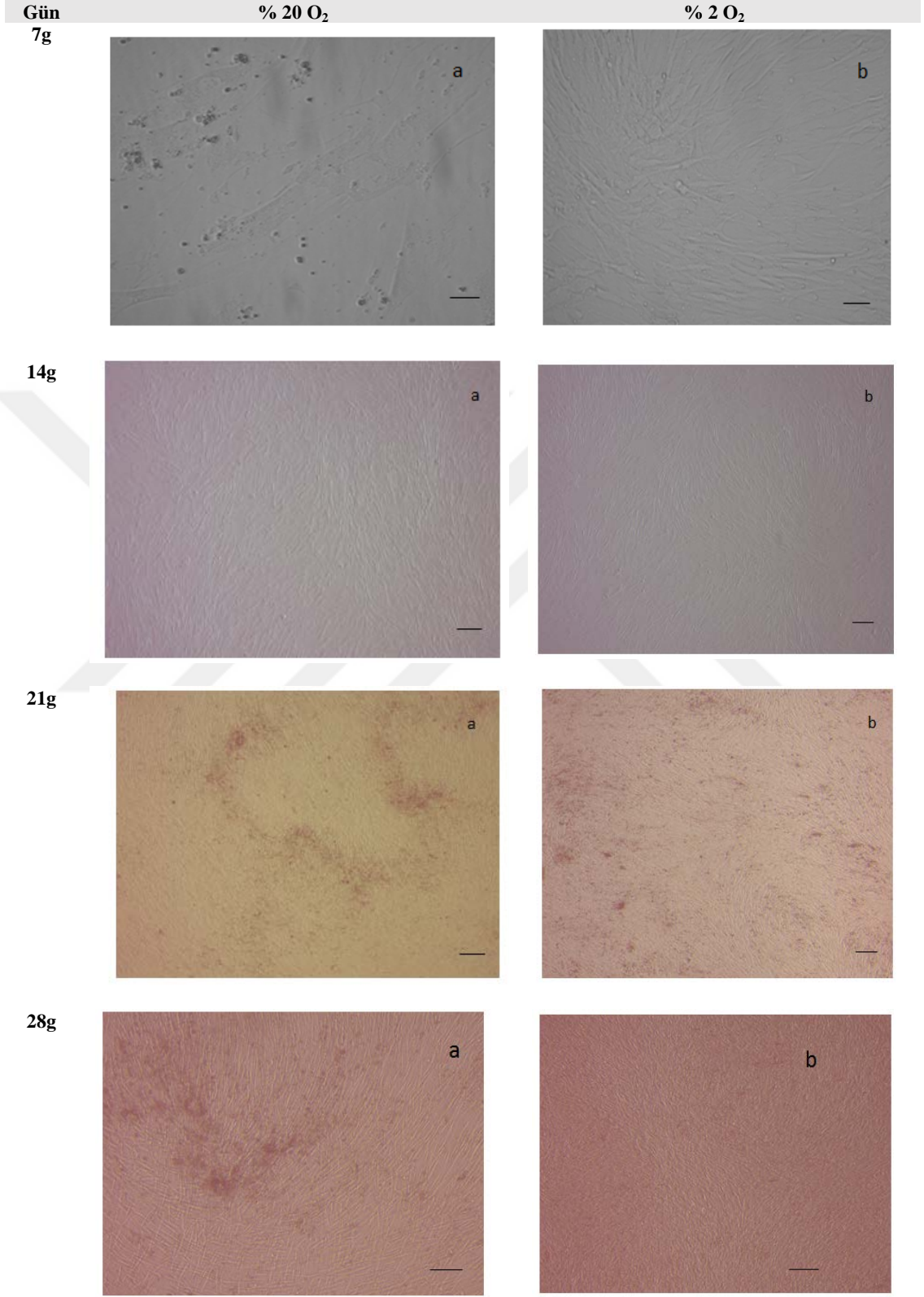
3.2.2. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kemik Hücrelerine Farklılaştırılması

3.2.2.1. İvert mikroskop bulguları

Kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin belirlenen zaman aralıklarında (7., 14., 21., 28. gün) osteojenik indüksiyon gruplarının invert mikroskop görüntüleri alındı. İvert mikroskop görüntülerinde her iki ortamda da 21.günden itibaren kalsiyum fosfat kristallerinin oluşmaya başladığı gözlenmiştir (Çizelge 3.5).



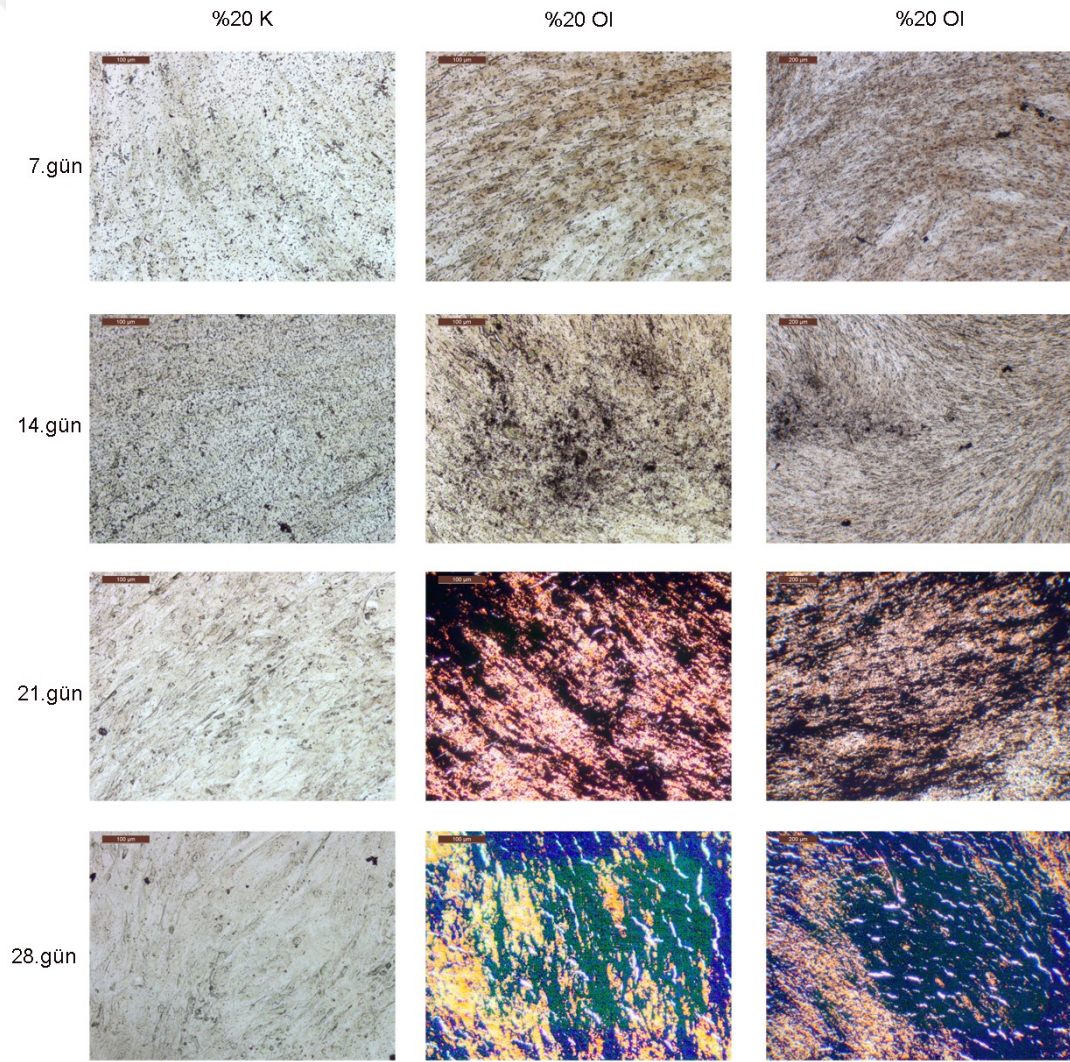
Çizelge 3.5. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrenin normoksi ve hipoksi ortamda osteojenik nesile farklılaşmış gruplarının invert mikroskop görüntüleri (Boyut çubukları = 100µm)



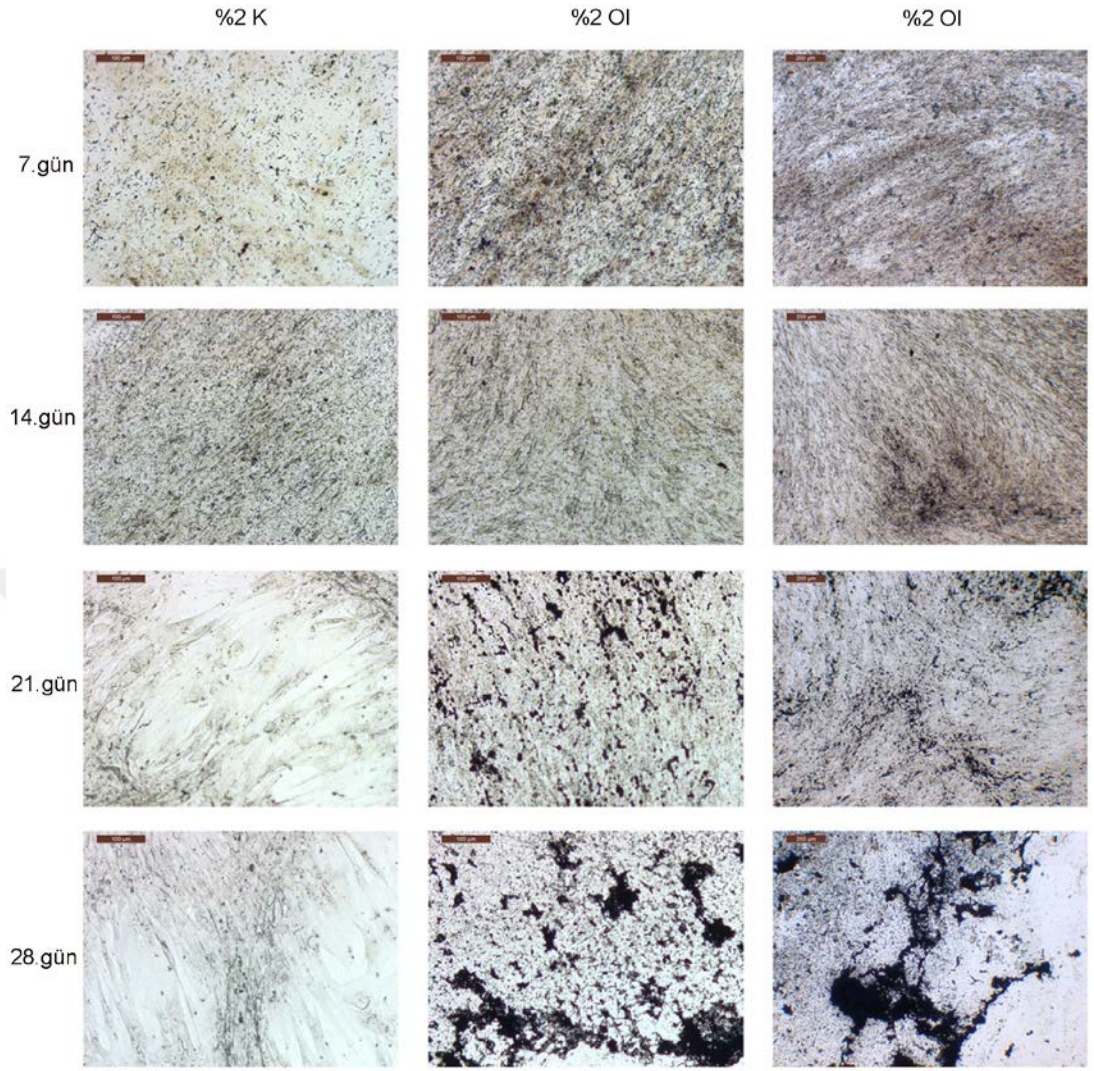
3.2.2.2. Histokimya bulguları

3.2.2.2.1. Von Kossa boyaması

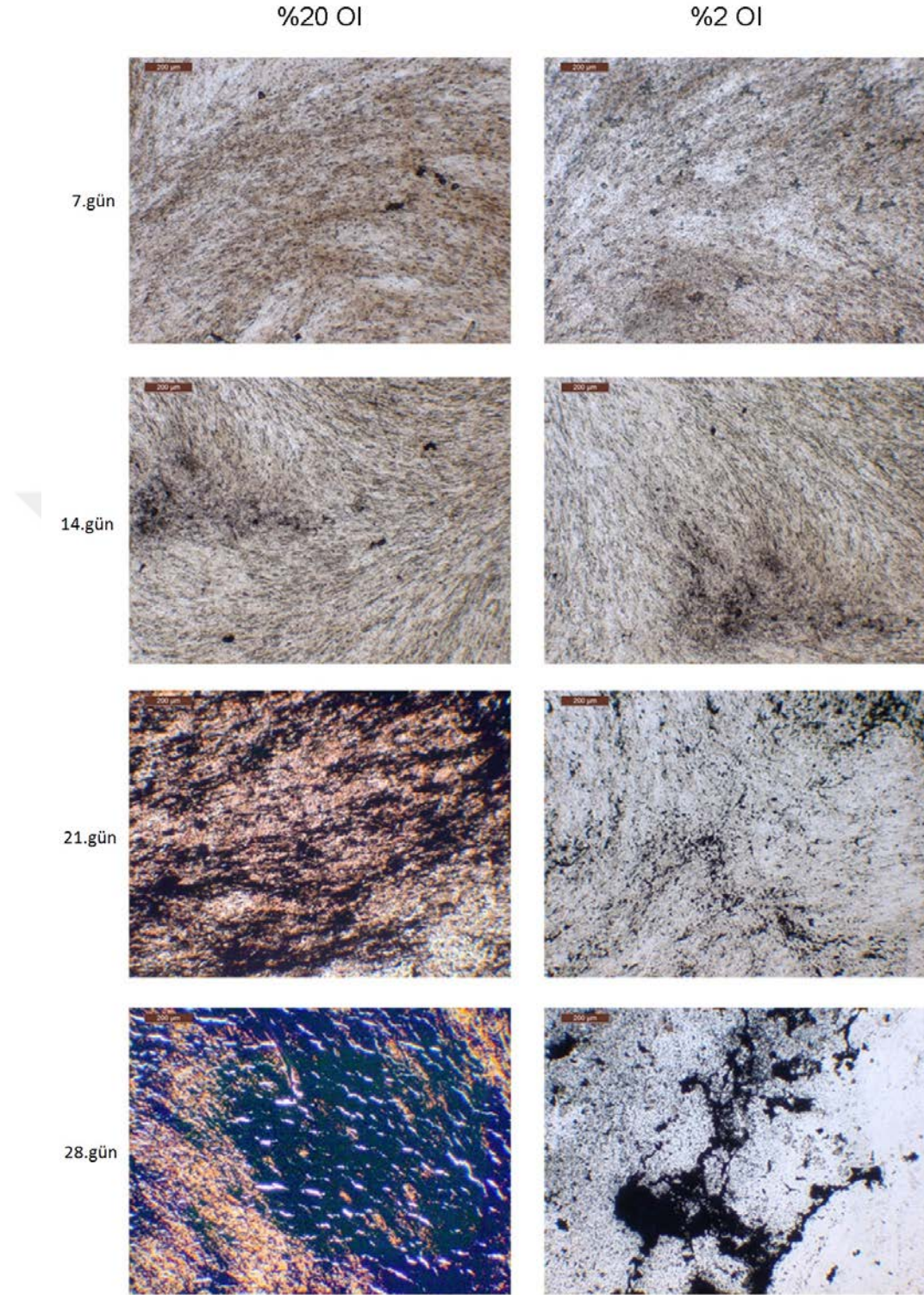
Von Kossa boyaması, asidik ortamda gümüş iyonlarının fosfat ile reaksiyona girdiği bir çökelme reaksiyonudur. Bu doğrultuda hücreler gümüş nitrat çözeltisi ile muamele edildi. Osteojenik farklılaşmaya bağlı olarak hücreler tarafından biriktirilen kalsiyum fosfatın metalik gri renginde boyandığı ışık mikroskopu ile tespit edilmiştir (Şekil 3.8, Şekil 3.9). Her iki ortamda da pozitif boyanma görülse de Şekil 3.10'da görüldüğü üzere hipoksik ortamda daha az boyanma gözlenmiştir.



Şekil 3.8. Normoksik ortamda hem kontrol hem de osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin histokimya bulguları (von Kossa boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)



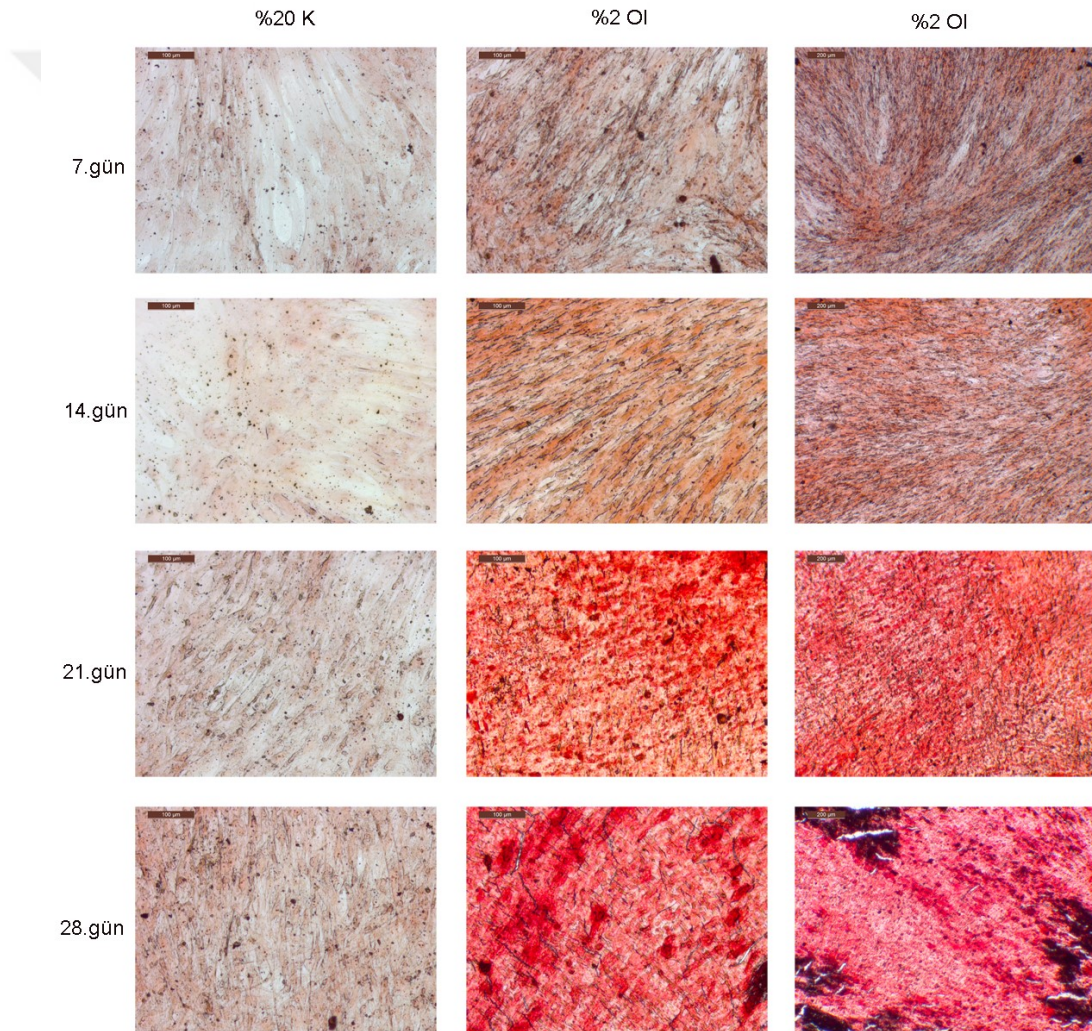
Şekil 3.9. Hipoksik ortamda hem kontrol hem de osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin histokimya bulguları (von Kossa boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)



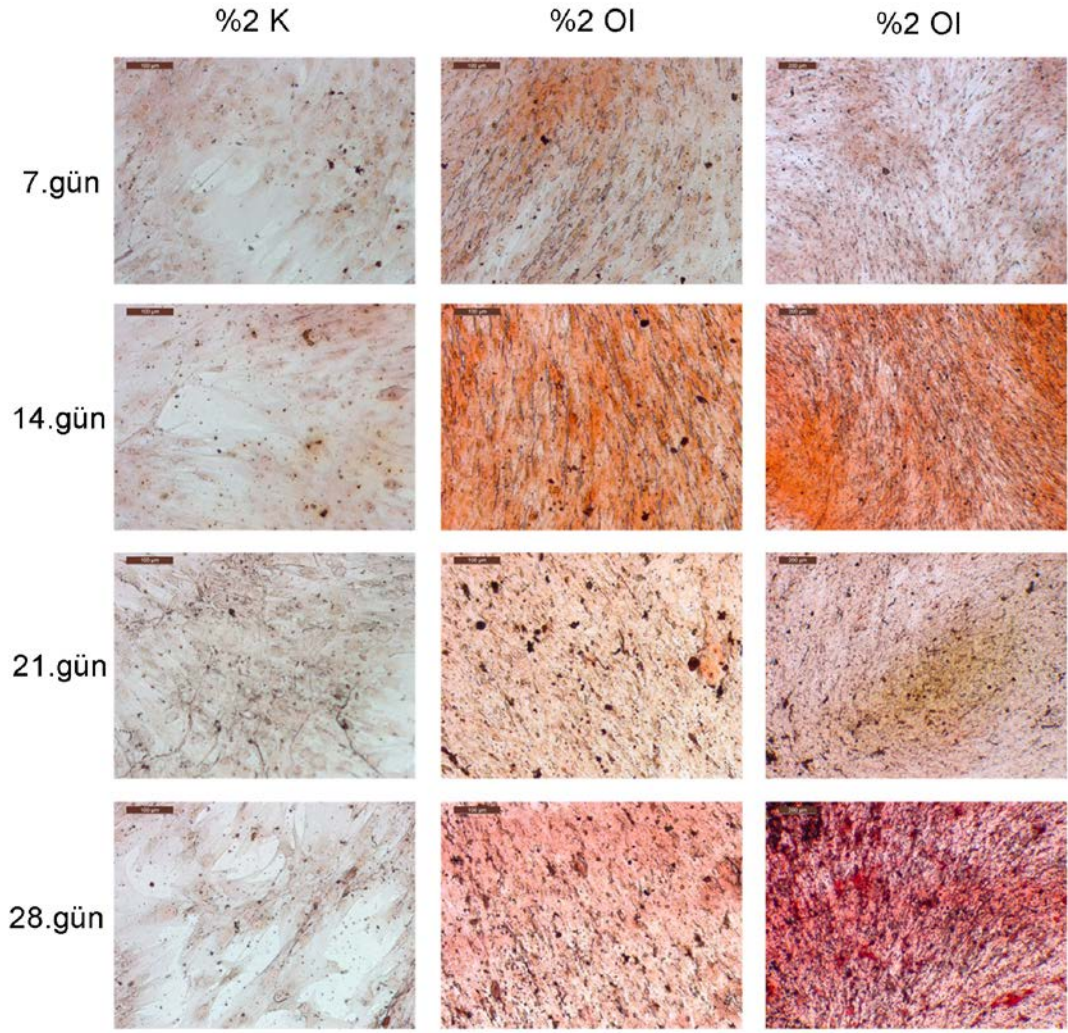
Şekil 3.10. Hipoksik ve normoksik ortamda osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin karşılaştırmalı histokimya bulguları (von Kossa boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)

3.2.2.2. Alizarin kırmızısı boyaması

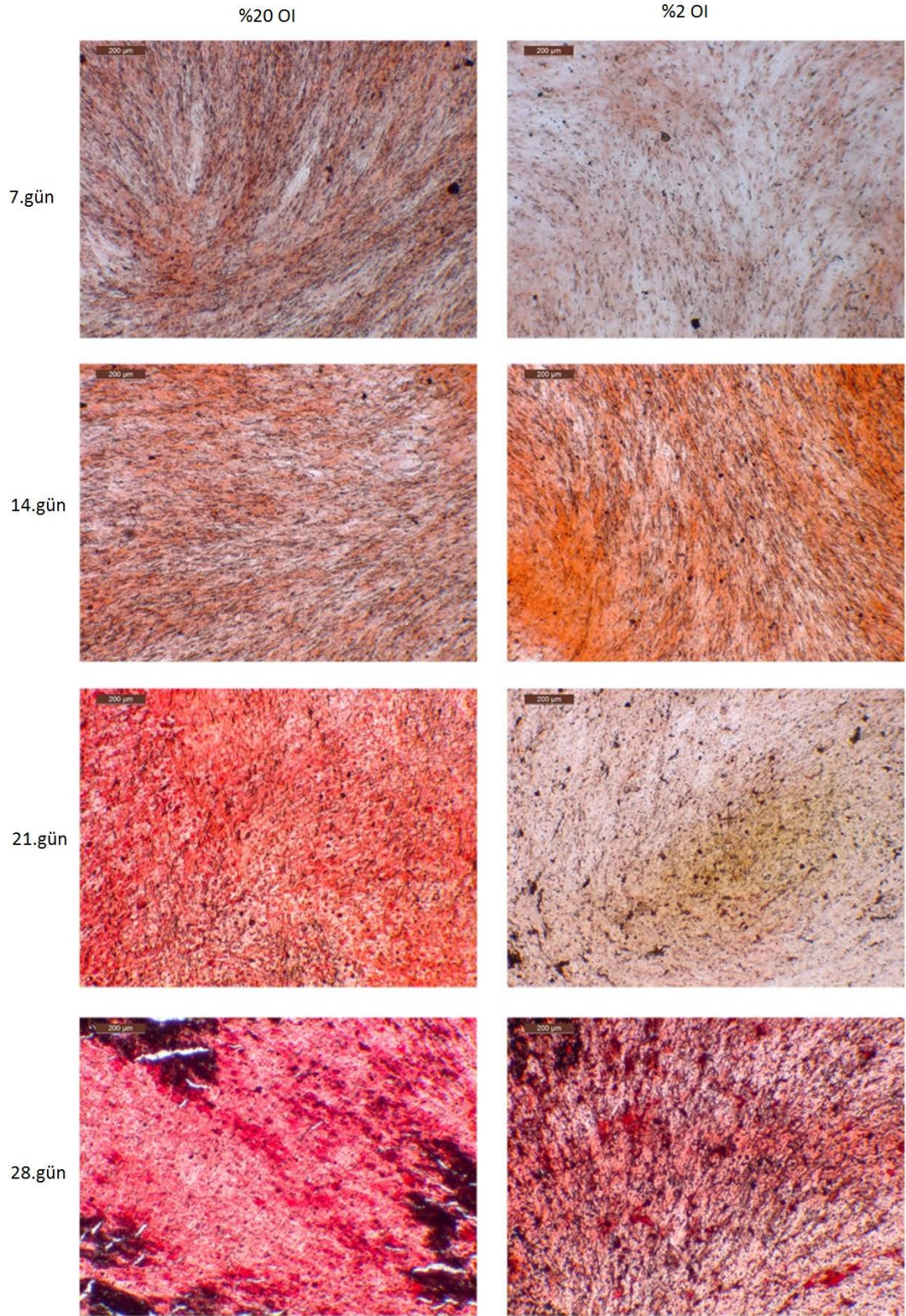
İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmaya bağlı olarak ileri evrede ekstrasellüler matriks oluşumu ve kalsiyumdan zengin mineral depolarını belirlemek için hücreler alizarin kırmızısı ile boyandı. Farklılaşan hücrelerde kalsiyum birikimine bağlı olarak hücrelerin turuncu-kırmızı renkte boyandığı tespit edilmiştir (Şekil 3.11, Şekil 3.12). Her iki ortamda da pozitif boyanma görülse de Şekil 3.13’de görüldüğü üzere hipoksik ortamda daha az boyama gözlenmiştir.



Şekil 3.11. Normoksik ortamda hem kontrol hem de osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin histokimya bulguları (Alizarin kırmızısı boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)



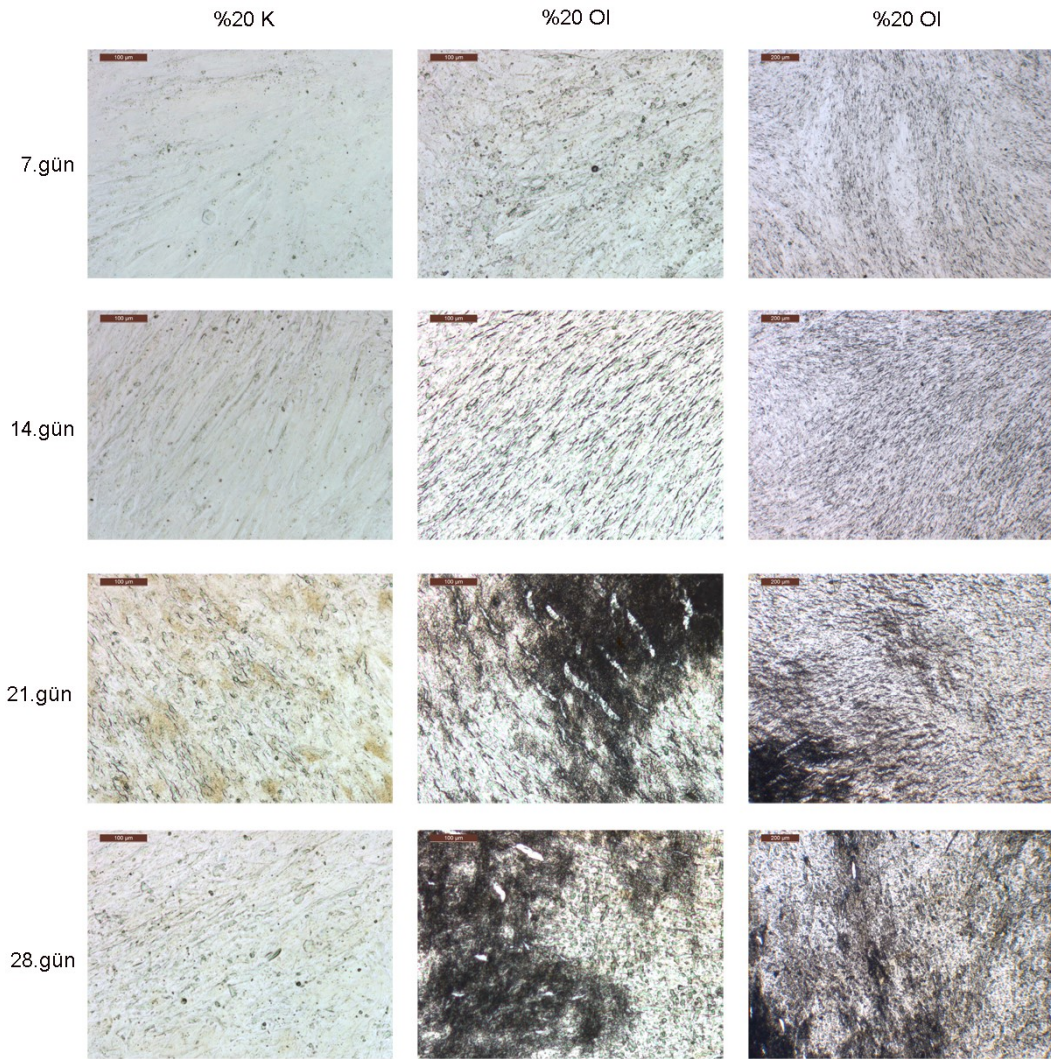
Şekil 3.12. Hipoksik ortamda hem kontrol hem de osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin histokimya bulguları (Alizarin kırmızısı boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)



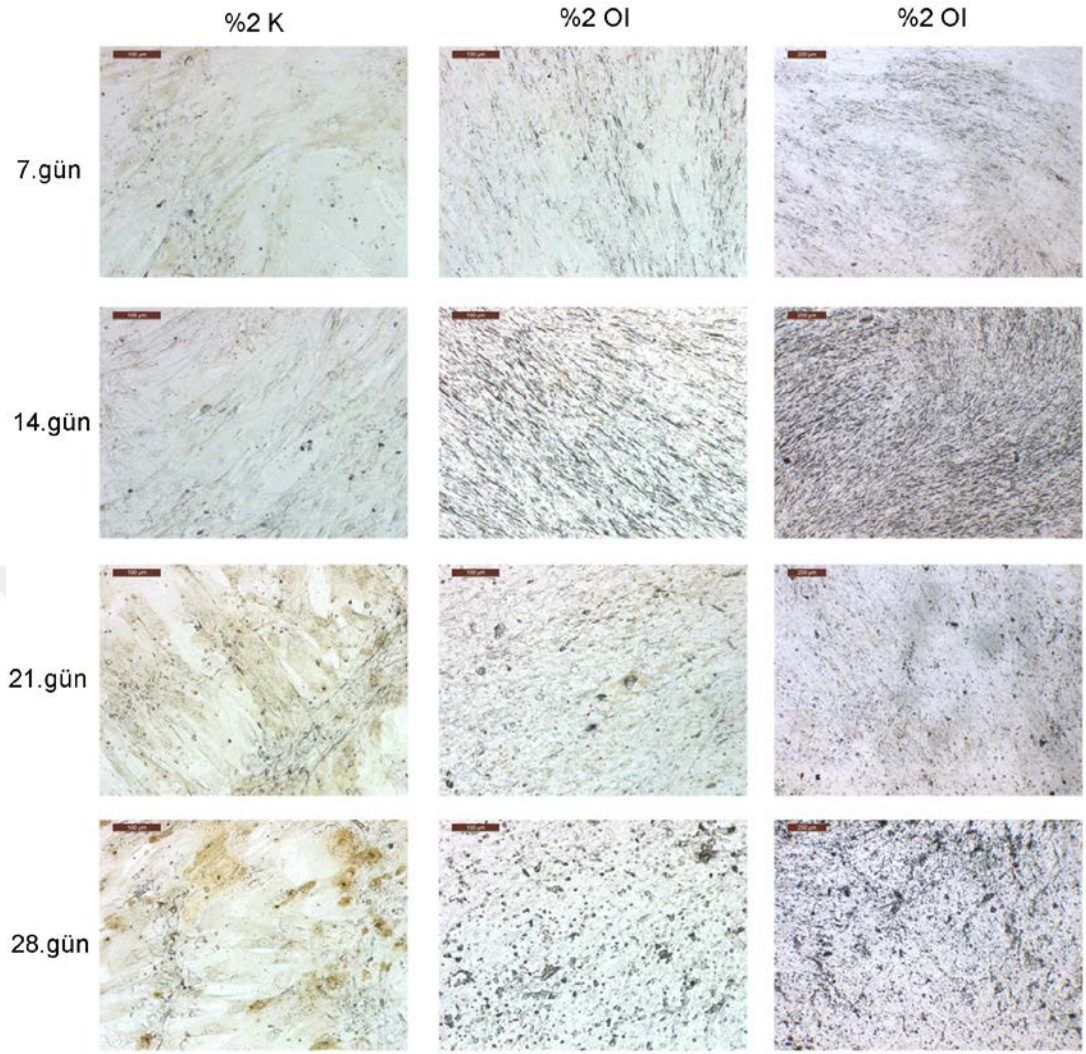
Şekil 3.13. Hipoksik ve normoksik ortamda osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin karşılaştırmalı histokimya bulguları (Alizarin kırmızısı boyaması) (Boyut çubukları: 100-200 µm)

3.2.2.3. İmmünohistokimya bulguları

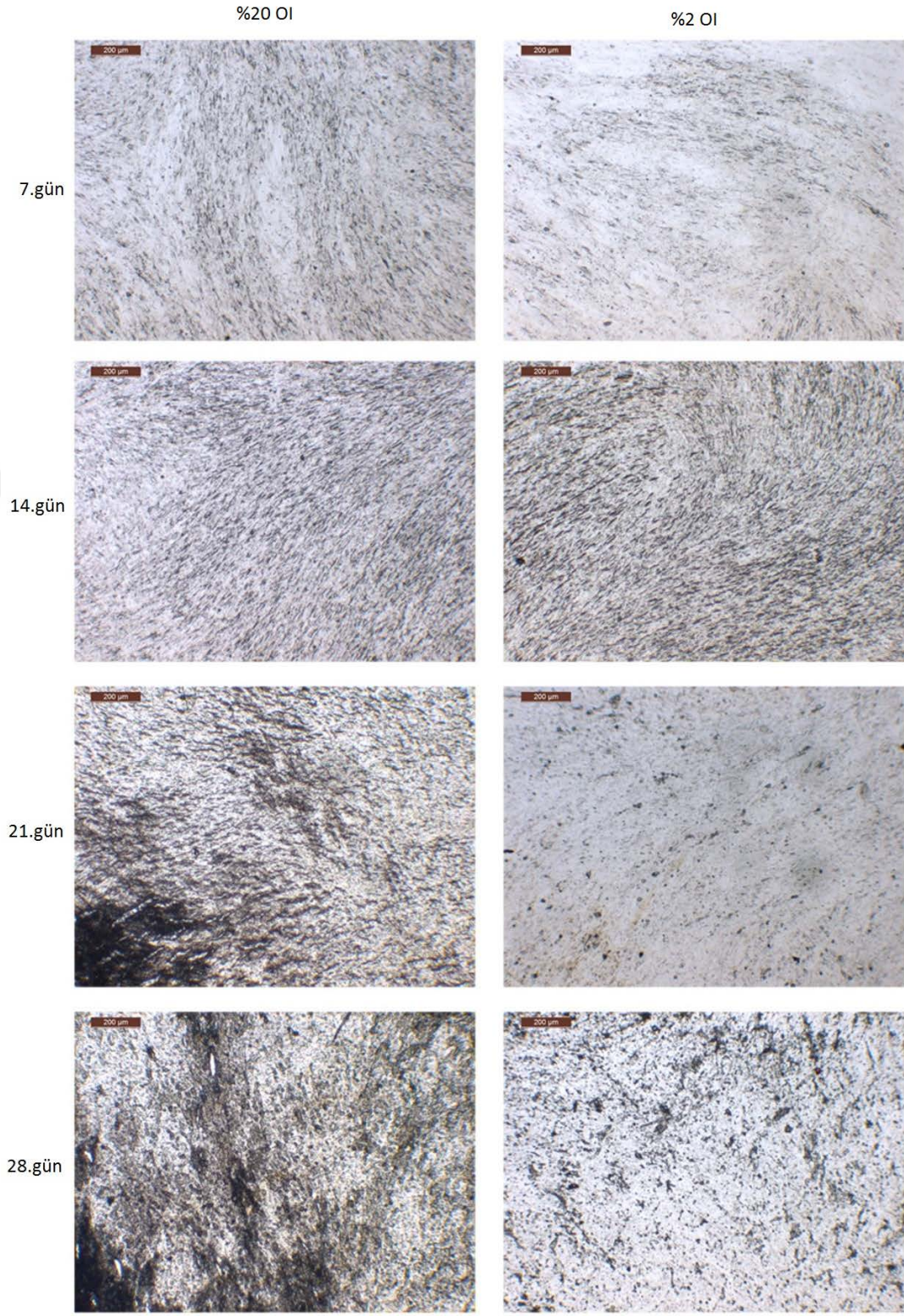
İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasının immunohistokimyasal analizi, önemli kemikleşme belirteçlerinden osteokalsin (OC) ve kemik sialo proteini (BSP) antikorları ile gerçekleştirildi. Kemik sialo protein ve osteokalsin geç evre belirteçlerindedir. Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16 ve Şekil 3.17, Şekil 3.18, Şekil 3.19’da görüldüğü gibi normoksik ortamda hipoksik ortama kıyasla 21. ve 28.günde etkin bir boyama gözlenmiştir.



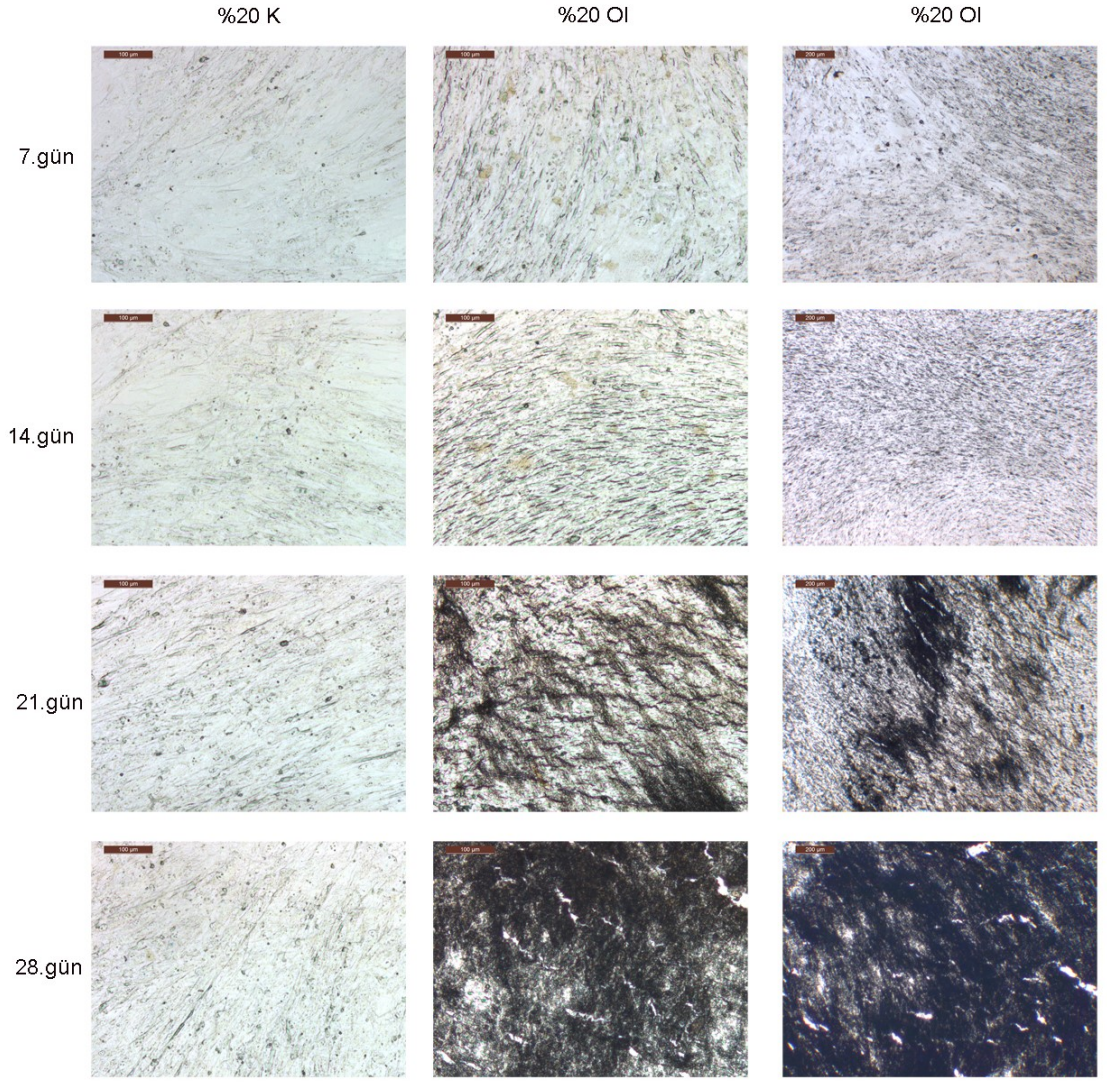
Şekil 3.14. Normoksik ortamda hem kontrol hem de osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin immunohistokimya bulguları (BSP boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)



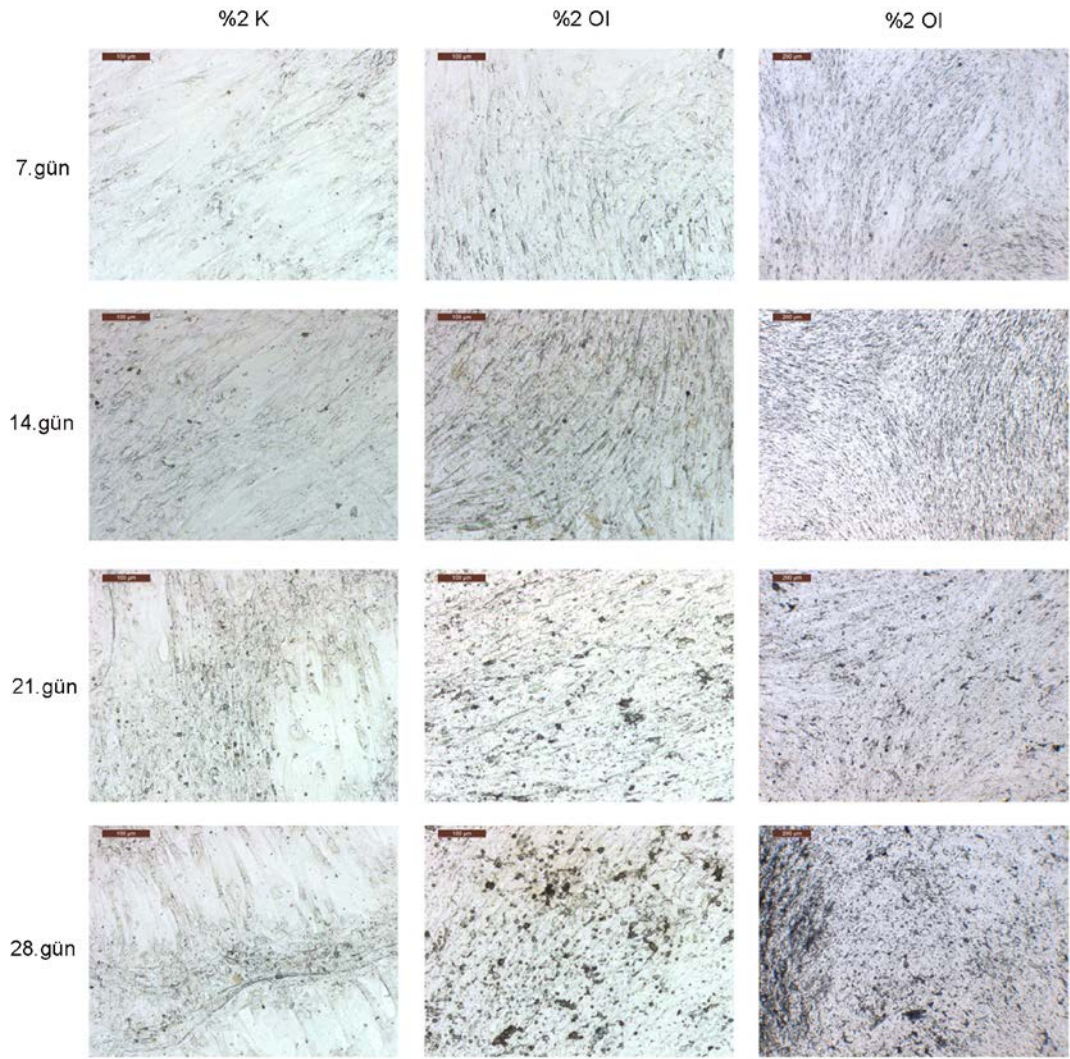
Şekil 3.15. Hipoksik ortamda hem kontrol hem de osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin immünohistokimya bulguları (BSP boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)



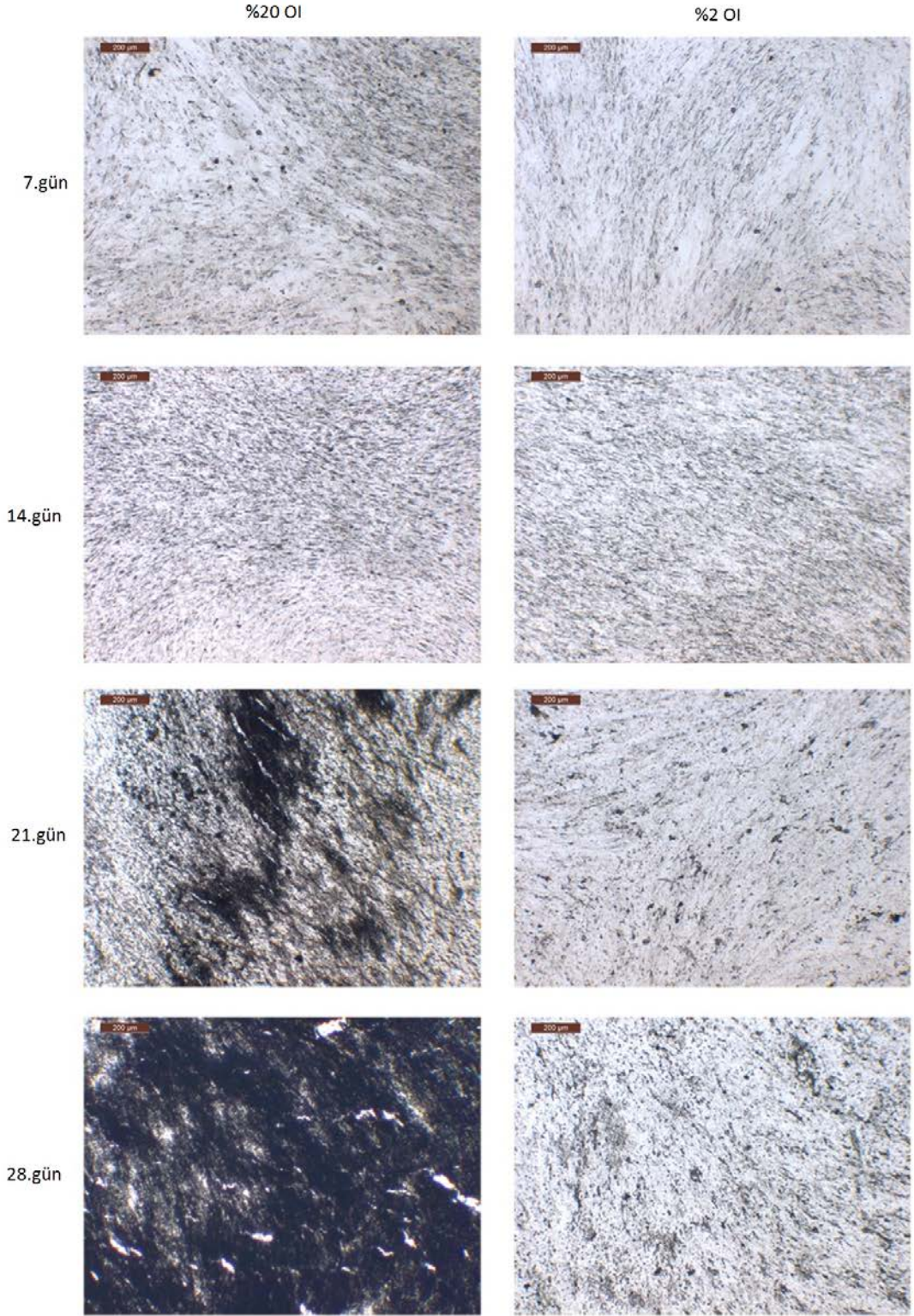
Şekil 3.16. Hipoksik ve normoksik ortamda osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin karşılaştırmalı immünohistokimya bulguları (BSP boyaması) (Boyut çubukları: 100-200 µm)



Şekil 3.17. Normoksik ortamda hem kontrol hem de osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin immünohistokimya bulguları (OC boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)



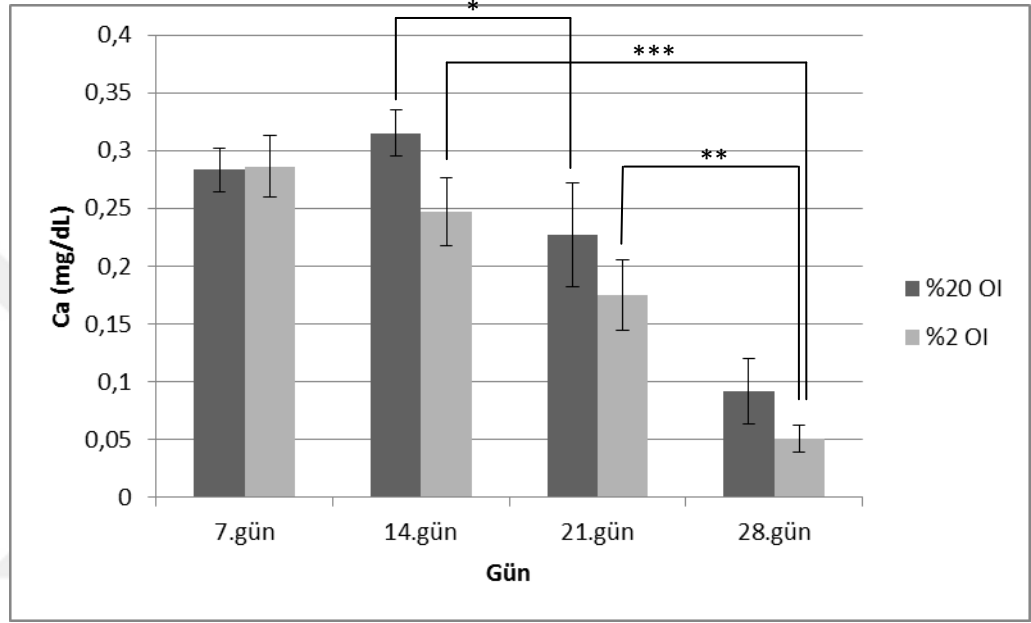
Şekil 3.18. Hipoksik ortamda hem kontrol hem de osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin immünohistokimya bulguları (OC boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)



Şekil 3.19. Hipoksik ve normoksik ortamda osteojenik nesile farklılaştırılan hücrelerin karşılaştırmalı immünohistokimya bulguları (OC boyaması) (Boyut çubukları:100-200 µm)

3.2.2.4. Kalsiyum analizi bulguları

Deney kiti içerisindeki kalsiyum standardı ve çalışma çözeltileri kullanılarak 612 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik ölçümlerle bir kalibrasyon eğrisi elde edildi. Yapılan ölçümlerden elde edilen kalsiyum değerleri Şekil 3.21’de verilmiştir.



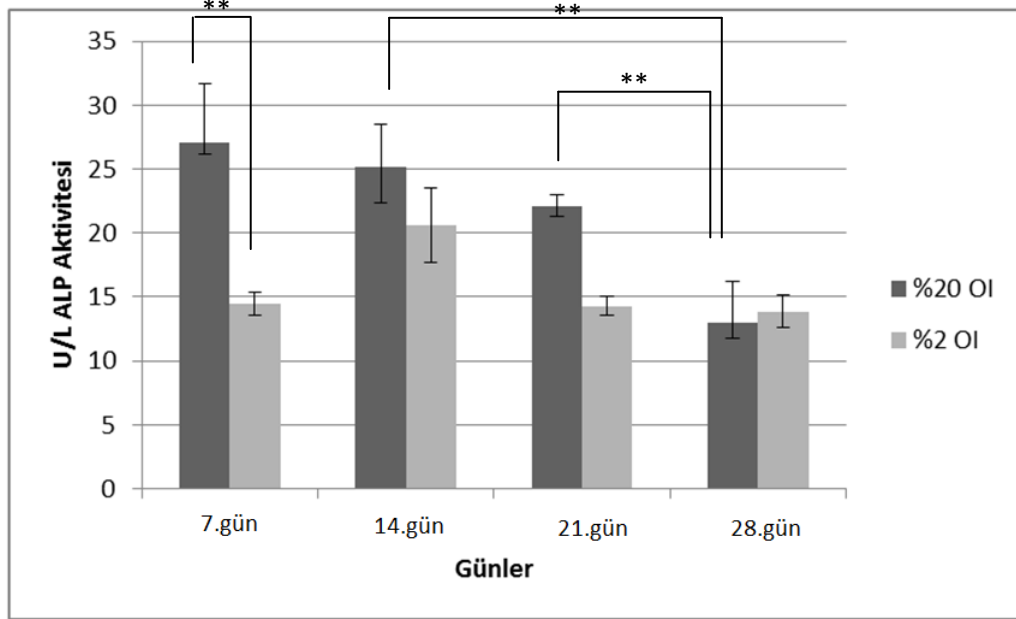
Şekil 3.20. 7., 14., 21. ve 28. gün *in vitro* örneklerinin Ca^{2+} değerleri ($p < 0,05$)

3.2.2.5. ALP aktivitesi bulguları

Kültürün 7., 14., 21. ve 28. günlerinde alınan örneklerin 0. ve 4. dakikalarda 405 nm’de ölçümleri alındı (ODÖRNEK0 ve ODÖRNEK4). Testte tartazin standartı kullanıldı ve aktivite hesaplanmasında aşağıda verilen hesaplamada kullanıldı.

$$\text{ALP Aktivitesi} = \frac{\text{OD örnek (t4)} - \text{OD örnek (t0)} \times \text{Reaksiyon hacmi}}{\text{OD kalibratör} - \text{OD su} \times \text{Örnek hacmi} \times t4} \times 35,3$$

Yapılan ölçümlerden elde edilen alkalen fosfataz analizi sonuçları Şekil 3.21’de verilmiştir.



Şekil 3.21. 7., 14., 21. ve 28.gün *in vitro* örneklerinin ALP aktiviteleri (p<0,05)

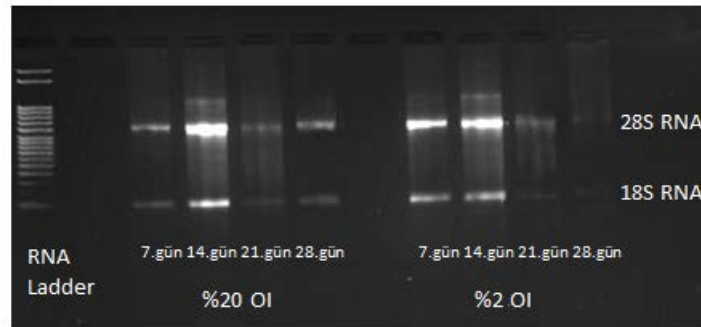
3.2.3. miRNA Analizi

3.2.3.1. RNA Sentezi Bulguları

Hem hipoksik hem de normoksik ortamda osteojenik besiyerine kültüre edilen örneklerin RNA izolasyonu High Pure RNA İzolasyon kitindeki protokole göre gerçekleştirilmiş ve Nanodrop ile konsantrasyon ve saflıkları analiz edilmiştir (Çizelge 3.6). Ayrıca örnekler %2'lik agaroz jelde yürütülerek RNA bütünlükleri incelenmiştir (Şekil 3.22). miRNA çalışmaları için örnekler çalışılabilir kalitede ve konsantrasyonda elde edilmiştir.

Çizelge 3.6. RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri

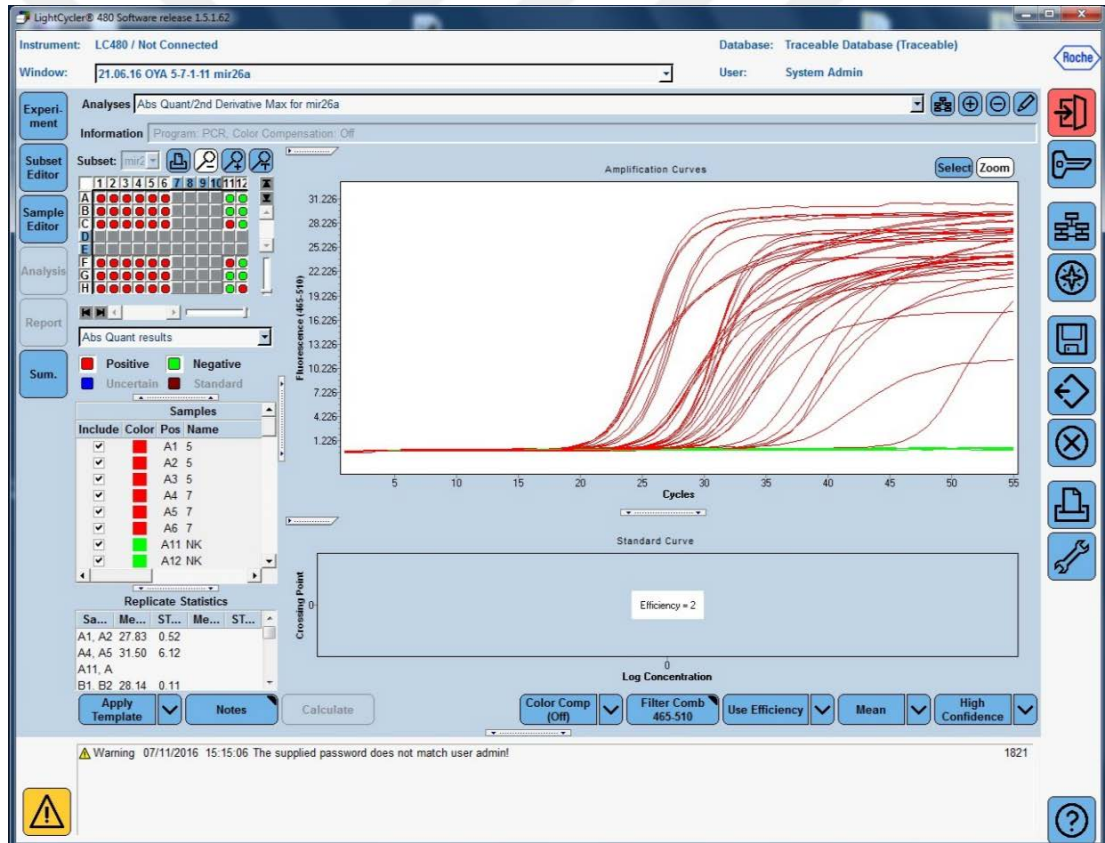
Örnekler	RNA miktarı	A260/A280
7.gün %20 OI	146,5 ng/µl	2,08
14.gün %20 OI	784,4 ng/µl	2,0
21.gün %20 OI	236,6 ng/µl	1,97
28.gün%20 OI	47,6 ng/µl	1,75
7.gün %2 OI	569,2 ng/µl	2,07
14.gün %2 OI	708,2 ng/µl	2,0
21.gün %2 OI	236,2 ng/µl	2,05
28.gün %2 OI	191,8 ng/µl	2,0



Şekil 3.22. RNA Örneklerinin %2 'lik agaroz jel görüntüsü

3.2.3.2. RT-PCR Bulguları

İnsan adi poz kökenli mezenkimal kök hücrelerin hem hipoksi hem de normoksi ortamda kültüre edilen örneklerden RNA izolasyonundan sonra miRCURY LNA kit kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda 1:80 oranında dilue edilen cDNA'lar kullanıldı. Hipoksik koşullarda normoksik koşullara göre ifadesi değişen miRNA'ları tanımlamak için üçlü biyolojik tekrarlı örnekler çalışıldı. miRNA'ların ifade seviyesi 96 kuyulu plakada Roche Light Cycler 480 platformunda profillendirilmiştir. Çalışmadaki PCR reaksiyonlarından bir örnek Şekil 3.23'de gösterilmiştir.



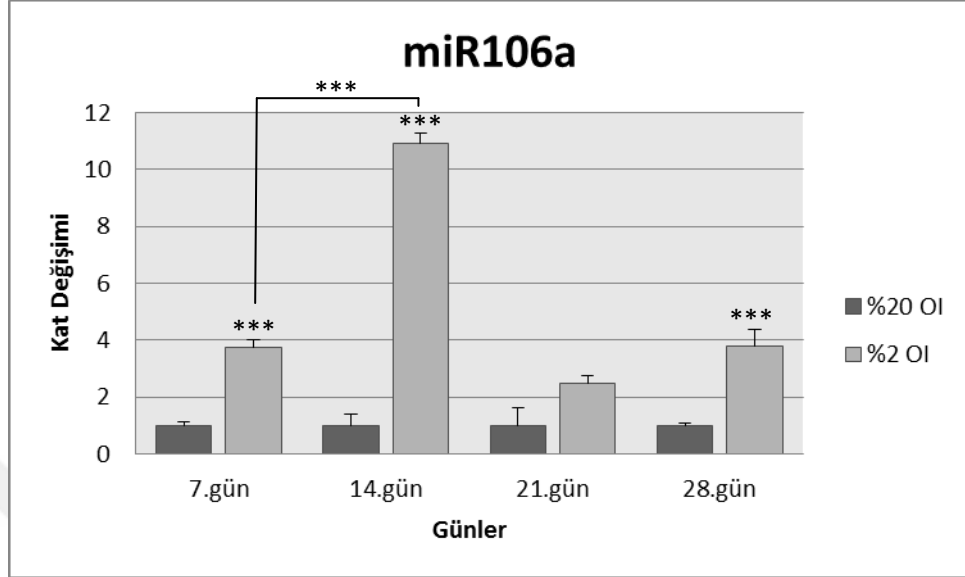
Şekil 3.23. Çalışmadaki RT-PCR örneği

Üçlü biyolojik tekrarlı veriler yazılımda birleştirilerek analiz edilmiştir. Analiz dosyasında her bir deneyden gelen CT değerleri görülmektedir. Eş zamanlı PCR yapılan tüm miRNA değişim değerleri için artış ve azalışlar $\Delta\Delta CT$ analizi ile belirlenmiştir. Çizelge 3.7’de normoksik ortama göre hipoksik ortamda artan miRNA ifadeleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. QRT-PCR sonuçları

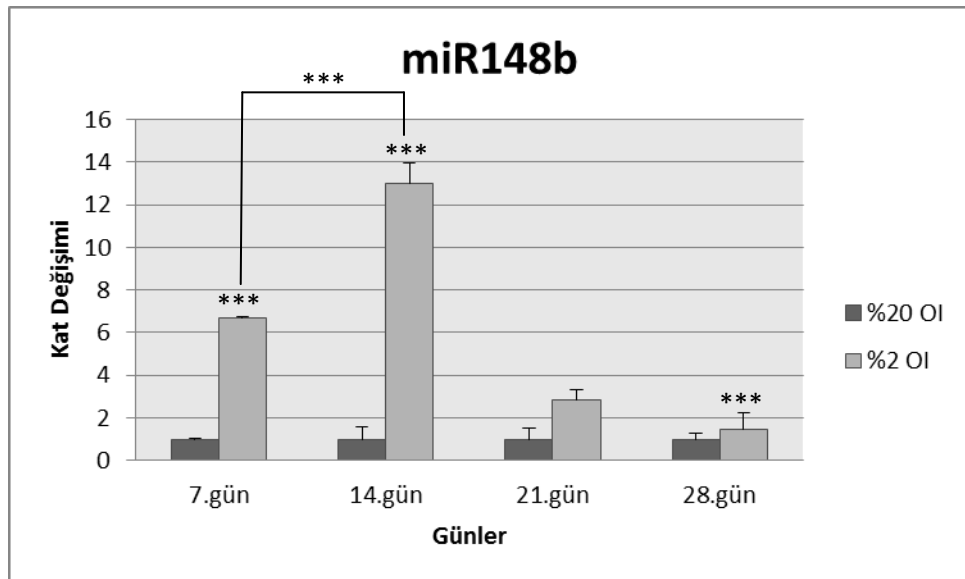
Örnekler	Günler	$2^{-\Delta\Delta CT}(\text{hedef/kontrol})$
miR106a	7	3,759
	14	10,912
	21	2,479
	28	3,814
miR148b	7	6,68
	14	12,99
	21	2,84
	28	1,453
miR26a	7	0,081
	14	409,5
	21	5,43
	28	5,303
miR22	7	0,0101
	14	11,99
	21	1,815
	28	0,403

miR-106a'nın normoksi ortama kıyasla hipoksik ortamdaki günlere göre bağlı ekspresyon düzeyleri verilmiştir (Şekil 3.24).



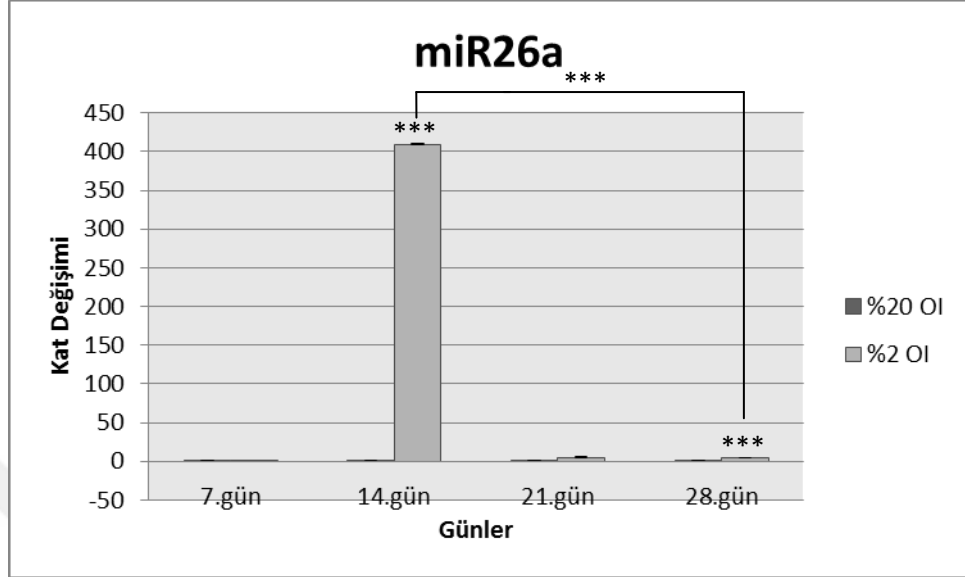
Şekil 3.24. miR-106a'nın hipoksik ve normoksik ortamdaki günlere göre değişen ekspresyon düzeyi (***: p<0,05)

miR-148b'nin normoksi ortama kıyasla hipoksik ortamdaki günlere göre bağlı ekspresyon düzeyleri verilmiştir (Şekil 3.25).



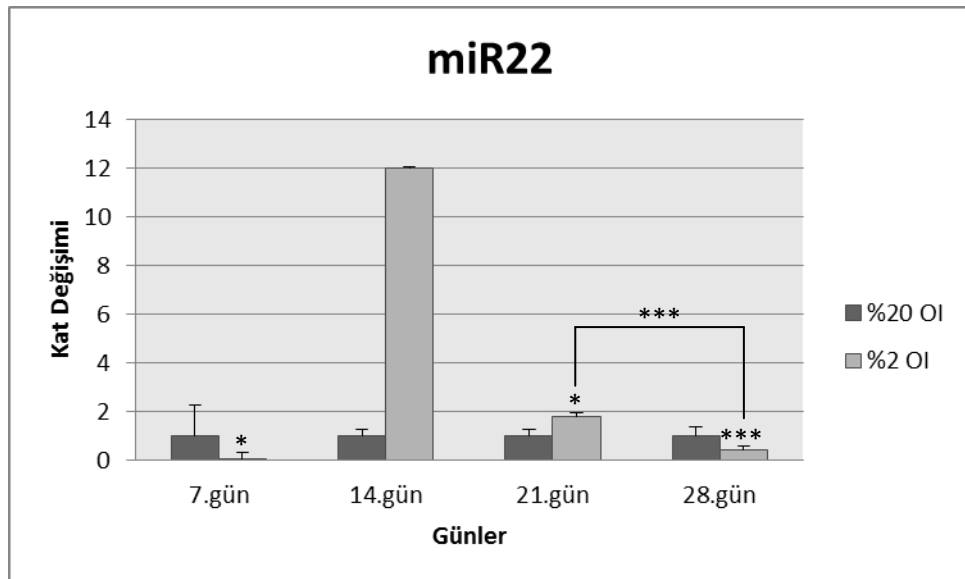
Şekil 3.25. miR-148b'nin hipoksik ve normoksik ortamdaki günlere göre değişen ekspresyon düzeyi (***: p<0,05)

miR-26'nın normoksi ortama kıyasla hipoksik ortamdaki günlere göre bağlı ekspresyon düzeyleri verilmiştir (Şekil 3.26).



Şekil 3.26. miR-26'nın hipoksik ve normoksik ortamdaki günlere göre değişen ekspresyon düzeyi (***: p<0,05)

miR-22'nin normoksi ortama kıyasla hipoksik ortamdaki günlere göre bağlı ekspresyon düzeyleri verilmiştir (Şekil 3.27).



Şekil 3.27. miR-22'nin hipoksik ve normoksik ortamdaki günlere göre değişen ekspresyon düzeyi (***: p<0,05)

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin hipoksik (~%2) ve normoksik (~%20) şartlar altında ve osteojenik ortamda osteoblastlara farklılaşma düzeylerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, osteojenik farklılaşma gen/miRNA ifadesi düzeyinde takip edilerek AMKH'lerin osteojenik nesile yönelmesinde kültür ortamındaki oksijen miktarına bağlı olarak ifadesi azalan ve artan miRNA'ların belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmada öncelikle, önceki çalışmalardan izole edilip çoğaltılan insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (01.03.2010, 08-129 AÜTF) standart yöntemlerle çözülüp kültüre alındı. Kültürü devam eden mezenkimal kök hücreler %80 bolluğa ulaştığında tripsinize edildi. Tripsinizasyon aşamasından sonra kültür kaplarına tekrar ekilen hücrelerin karakterizasyon analizi, Uluslararası Hücre Tedavi Derneği (ISCT)'nin MKH'leri tanımlamak için bildirmiş olduğu 3 özelliğe göre yapıldı (Dominici ve ark., 2006). Yapılan çalışma sonucunda adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin literatüre uyumlu bir şekilde standart kültür koşullarında plastik yüzeylere yapışma ve iğsi yapıda fenotipik özellik gösterdiği, in vitro koşullarda osteojenik, kondrojenik ve adipojenik hücrelere farklılaşabildiği ve CD29, CD73, CD133, CD90 ve CD105 yüzey antijenlerini yüksek seviyede ifade ederken hematopoetik soya ait yüzey antijenleri olan CD31, CD34, Lin ve HLADR antijenlerini ifade etmediği gösterilmiştir.

Kültürü devam eden adipoz mezenkimal kök hücreler belirli bir hücre yoğunluğuna ulaştıkları zaman kontrol grubunda ve osteojenik farklılaşma grubunda bulunan hücreler hem normoksik (%20 O₂) hem de hipoksik (%2 O₂) ortamda kültüre edildi. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin kültüre edildiği oksijen seviyesi değişse de fibroblastik morfolojilerini, immunfenotiplerini değiştirmediği, hem yapılan çalışmayla hem de literatürdeki diğer çalışmalarla desteklenmiştir (Choi ve ark., 2014a; Choi ve ark., 2014b; Feng ve ark., 2014; Fotia ve ark., 2015a; Kang ve ark. 2014; Pham ve ark., 2016; Valorani ve ark., 2012).

Mezenkimal kök hücrelerin diğer karakteristik özelliği olan koloni oluşturma özellikleri (CFU-F), literatürlere paralel olarak %2 O₂ oksijen koşullarında incelendiğinde normoksik ortama kıyasla herhangi bir fark bulunmamıştır. Bu da hipoksi koşullarında mezenkimal kök hücrelerin “köklülük” özelliklerini koruduğunu göstermektedir (Roemeling-van Rhijn M ve ark., 2013; Choi ve ark., 2015; Merceron ve ark.,2009).Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda hipoksi ortamda kültüre edilen insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin karakteristik özelliklerinde herhangi bir değişme olmadığı gözlemlendi.

Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması üç aşamadan oluşmaktadır. Bunlar; hücre çoğalması, matriks olgunlaşması ve matriks mineralizasyonudur (Huang ve ark., 2007). *In vitro* koşullarda matriks olgunlaşması ve mineralizasyonu hücrelerin yeterli sayıya ulaşmalarından sonra besiyerine osteojenik büyüme faktörlerini ilave ederek sağlanmaktadır. İlk aşamada 1-4 gün arasında hücre sayısında artma görülür. Bu aşamada birçok hücre içi matriks proteinleri (TGF- β , fibronektin vb.) tespit edilmektedir. Matriks olgunlaşması alkalen fosfataz ekspresyonu ile karakterize edilmektedir. ALP aktivitesi hücrelerde erken osteogenezde (5-14.gün) yüksek seviyede tespit edilir ve osteositler olgunlaşana kadar aktivitesi devam eder (Aubin, 2001; He ve ark., 2010; Thibaul ve ark., 2010). Alkalen fosfatazın kalsiyum bağlayarak, serbest fosfat üreterek ve mineralizasyon inhibitörlerini yıkarak organik matriks mineralizasyonunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Alkalen fosfataz seviyesindeki artış 14.günden itibaren giderek düşmeye başlar. Son aşama olan matriks mineralizasyonunda hücreler 14-28.günde yüksek seviyede osteokalsin, kemik sialo protein ve osteopontin gibi proteinleri ifade ederler ve mineralizasyon tamamlandığında hücrede kalsiyum depolanması gerekli boyamalar ile görünür hale getirilir (Hoemann ve ark., 2009; Huang ve ark., 2007; Birmingham ve ark., 2012). Literatürdeki çalışmalara paralel olarak yapılan tez çalışmasında %20 ve %2 oksijen koşullarında ALP aktivitesi 14.günde en yüksek seviyesine çıkmış; diğer günler aktivitesi giderek azalmıştır. ALP'nin kalsiyum bağlama ve kolaylaştırıcı özelliğinden dolayı kalsiyum aktivitesi de ALP'ye paralel bir artış ve düşüş göstermiştir.

Osteojenik nesile farklılaşma alizarin kırmızısı ve von Kossa boyaları ile histokimyasal olarak görünür hale getirildi. Çalışma sonucunda von Kossa boyaması ile kalsifiye ECM salgılanması siyah-gri nodüller olarak görülmekte; kalsiyumdan zengin mineral depoları ise Alizarin kırmızısı boyaması ile kırmızı-turuncu görünmektedir. Osteojenik farklılaşmada hücreler, her iki oksijen koşullarında da pozitif boyanmıştır. Fakat kalsiyum birikiminin hipoksizde daha az olduğu gözlenmiştir. Yapılan histokimya boyamaları diğer literatürler ile paralel sonuçlar göstermektedir (Choi ve ark., 2014b; Merceron ve ark., 2009; Malladi ve ark., 2006; Valorani ve ark., 2012). Osteokalsin ve kemik sialo protein sıkı bir şekilde hidroksiapatite bağlanma özelliğinden dolayı genellikle osteojenik farklılaşmada belirteç olarak kullanılmaktadır. Hem osteojenik hem de adipojenik farklılaşma besiyerinin bileşeni olan deksametazondan ve β -gliserofosfatın varlığından dolayı, kültüre edilen hücrelerde osteokalsin ve kemik sialo protein ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Köllmer ve ark., 2013). İmmunohistokimyasal analiz ise osteokalsin ve kemik sialo proteini antikor boyaması yapılarak incelendi. Çalışmamızın sonucunda osteokalsin ve kemik sialoprotein hücrelerde her iki oksijen koşullarında da pozitif boyanmıştır. Fakat ileri evre belirteçleri olan bu antikorların boyanması hipoksik ortamda azalma göstermiştir. Bu da birçok hücrenin belki de hala erken aşamada olduğunu işaret etmektedir. Bütün veriler toplandığında oksijen seviyesindeki dalgalanmalara bağlı olarak adipoz mezenkimal kök hücrelerin osteojenik soya farklılaşmasında azaltılmış oksijen seviyesinin farklılaşmayı geciktirdiği söylenebilir.

miRNA'lar evrimsel olarak çok sıkı korunmuşlardır ve ekspresyonlarındaki artış veya azalış kanser, nörodejenerasyon ve kardiyovasküler dâhil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkisi olduğu düşünülmüştür (Hayes ve ark., 2014; Srinivasan ve ark., 2013). Bunun yanı sıra miRNA'ların kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma süreçlerinde önemli bir rol oynayarak kök hücre gelişiminin düzenlenmesine yeni bir bakış açısı kazandırabileceği düşünülmektedir (Mathieu ve Ruohola-Baker, 2013; Yi ve Fuchs, 2011). Bu amaçla miRNA'ların ifade profillerinin ve moleküler mekanizmalarının iyi tanımlanması gerekmektedir.

İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik nesile farklılaşmasında çeşitli miRNA'ların önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Kemik gelişiminde miRNA'ların fonksiyonu, osteojenik farklılaşmanın erken ve geç evresinde bu hücrelerin inhibitörlerini baskılayarak farklılaşmayı indüklemektir (Lian ve ark., 2012; Peng ve ark., 2016). Bu tez çalışmasında osteojenik farklılaşmada rol alan miR106a, miR26a, miR148b ve miR22'nin ekspresyon seviyeleri, eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile hem hipoksik ortamda hem de normoksik ortamda incelenmiştir. Literatürler incelendiğinde hipoksi ortamda osteojenik nesile farklılaştırılmış adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin miRNA ekspresyon seviyelerinin bugüne kadar çalışılmadığı görülmüştür.

miR106a, insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik ve adipojenik nesile farklılaşmasındaki dengede rol almaktadır. Li ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları çalışmada osteojenik farklılaşma sırasında miR106'nın ifadesi azalmış ve hücre adipojenik nesile farklılaşmaya başlamıştır. Çalışmada miR106'nın endojen tranfeksiyonu gerçekleştirilmiş ve miR106'nın yüksek seviyede ifade edilmesi hücrelerde ALP aktivitesi ve mineralizasyonu; osterix, Runx2, osteokalsin ve osteopontin gibi önemli osteojenik transkripsiyon faktörlerini inhibe etmiştir. miR106a'nın endojenik yöntemlerle inhibe edilmesiyle hücreler osteojenik nesile farklılaşmıştır (Li ve ark., 2013; Kang & Hata, 2015 ve Zhang ve ark., 2012). Tez çalışması kapsamında miR106'nın hipoksi ortamdaki ifadesinin normoksik ortama göre 14. günde 10,912 kat fazla olduğu gözlenmiştir.

İnsan adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin osteojenik-adipojenik nesile farklılaşmasında miR-22'nin rolü sadece tek bir çalışma ile gösterilmiştir. Yapılan çalışmada HDAC6 ifadesi siRNA transfekte edilerek baskılanmıştır. HDAC6 ifadesinin baskılanması hücrelerin osteojenik nesile farklılaşmasını indüklemiştir. Yapılan ALP ve von kossa boyamaları bu sonuçları kanıtlar niteliktedir (Huang S ve ark., 2012). Tez çalışmasında ise miR22'nin hipoksi ortamdaki ifadesinin normoksik ortama göre 14. günde 11,99 kat fazla olduğu gözlenmiştir.

Schoolmeesters ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada çeşitli miRNA'ların inhibitörlerini insan mezenkimal kök hücrelerine transfekte ettikten sonra hücreleri osteojenik besiyeri ortamında kültüre etmişlerdir. İnsan mezenkimal kök hücrelerin osteojenik nesile farklılaşmasında birçok farklı belirteçlerin ifadesi analiz edilmektedir. Yaptıkları çalışmada erken evre belirteci olarak kullanılan alkalın fosfataz aktivitesindeki değişikliklerden yola çıkarak transfekte ettikleri miRNA'ların ekspresyonları hakkında yorum yapmışlardır. Sonuç olarak ALP seviyelerindeki artış veya azalışa göre üç önemli miRNA'nın erken evredeki osteojenik farklılaşmayı etkilediği belirtilmiştir. Bu miRNA'lar miR148b, miR27a ve miR489 (Fakhry ve ark., 2013; Guo ve ark., 2011). Yapılan bu çalışmaya paralel olarak tez çalışması kapsamında hipoksi ortama kıyasla normoksi ortamda miR148b'nin ifade profili incelenmiştir. miR148b'nin 14.günde ekspresyonun arttığı, 14.günden sonra ise azaldığı gözlenmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda miR26a, osteojenik farklılaşmanın negatif bir düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. Fakat daha sonraki çalışmalar miR26'nın osteojenik farklılaşmayı teşvik ettiğini göstermiştir. Ancak, MKH'lerin osteojenik farklılaşmasının düzenlenmesinde miR-26a'nın rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır (Trompeter ve ark., 2013; Wang ve ark., 2015). Yapılan çalışmalarda miR26'nın osteojenik farklılaşmadaki rolü incelenmiştir. Osteojenik farklılaşmanın geç evrelerinde miR26 ekspresyonunda bir artış saptanmıştır. Bu çalışmalarla miR26'nın osteogenezde pozitif düzenleyici olduğu gösterilmiştir (Dai R ve ark., 2016; Luzi ve ark., 2008). Wang Z ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada miR26a'nın endojenik ekspresyonunun osteojenik farklılaşma boyunca arttığını tespit etmişlerdir. miR26'nın ekspresyonun artışı hücrelerde osteojenik farklılaşmayı desteklemiştir. Su ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada ise miR26a'nın yüksek seviyede ifadenmesi insan adipoz kaynaklı kök hücrelerin osteojenik nesile farklılaşmasını inhibe etmiştir. Tez kapsamında yaptığımız çalışmada mir26a'nın normoksik ortama göre hipoksik ortamda 14.günde 409,5 kat yüksek olduğu gözlenmiştir.

miRNA'ların literatürlerde farklı hedef genleri susturup veya indükleyerek osteojenik farklılaşmayı etkilediği gösterilmiştir. Seçtiğimiz miRNA'ların(miR-106a, miR-148b, miR-106a ve miR-22) normoksi ortamdaki hedeflerinin BMP, Runx2 ve HDAC gibi önemli transkripsiyon faktörleri olduğu yapılan diğer çalışmalarla gösterilmiştir.

Hipoksi ortamda erken evrede ifade olan miRNA'ların da belki de aynı yolak üzerinden osteojenik farklılaşmaya etki ettiği düşünebilir. Fakat miRNA'ların hipoksi ortama karşı nasıl cevap oluşturduğunun mekanizması henüz açıklanamamıştır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kök hücre biyolojisini anlamaya ve aynı zamanda kök hücrelerin potansiyel terapötik uygulamaları için yapılan hücre kültürlerinin optimizasyonuna duyulan ilgi giderek artmaktadır. Kök hücreler genellikle laminar akışlı kabinlerde ve kısmi atmosferik oksijen (%20 O₂) koşullarında kültüre edilmektedir. Bu koşullar hücre kültürü çalışanları tarafından normoksik koşullar olarak tanımlanmıştır. Atmosferik oksijen koşulları %20 O₂ olmasına rağmen, *in vivo* fizyolojik koşullarda oksijen seviyesi %3-13 olarak değişmektedir. Bu yüzden hücre kültüründe kullanılan normoksi terimi aslında tam olarak hücrelerin fizyolojik özelliklerini yansıtmamaktadır. *In vivo* ortamda belirli bir dokudaki hücre için fizyolojik olan oksijen seviyesi; oksijen difüzyonuna, oksijen tüketimine ve kan damarına mesafesi gibi birçok parametreye bağlıdır. Adipoz doku kan damarlarına uzak olmasından dolayı dokuda bulunan oksijen seviyesi %2-5 arasındadır. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin hipoksiye maruz kalmaları, bu hücreleri daha güçlü kılarak organ nakli sırasında ve sonrasında sağ kalımları için umut verici bir strateji oluşturmaktadır. Bu bilgiler ışığında yapılan tez çalışmasında insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler %2 oksijen ortamında kültüre edildi. Kültüre edilen hücrelerin karakteristik özelliklerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Hipoksik ortamda osteojenik farklılaşma incelendiğinde ise yapılan analizler osteojenik farklılaşmanın azaldığını göstermiştir.

Osteogenez, mezenkimal kök hücrelerin osteoblast progenitör hücrelere, preosteoblastlara, osteoblastlara ve osteositlere farklılaşmasını içeren, kemik oluşumu ve yenilenmesi için çeşitli hücre tiplerinin birbirleriyle etkileşime girdiği karmaşık ve çok aşamalı bir süreçtir. Osteojenik farklılaşma, pozitif veya negatif düzenlemede yer alan büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri ve miRNA gibi birçok sinyal yollarını içermektedir. Yapılan çalışmalarda miRNA'ların osteojenik sinyal yollarının düzenlenmesi açısından önemli olduğu tespit edilmiştir.

miRNA'ların ifade profillerinin ve dinamik düzenlemelerinin anlaşılması, MKH'lerin osteoblastik farklılaşma ve kemik oluşum mekanizmalarının anlaşılması bakımından önem taşımaktadır. Günümüze kadar osteoblast farklılaşma ve işlevleriyle ilgili olarak çok sayıda moleküler ve genetik çalışma yapılmıştır. Literatürlerde, hipoksik ortamda adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin HIF-1 α transkripsiyon faktörüne bağlı olarak artan veya azalan gen ekspresyon seviyelerine yönelik çeşitli çalışmalar bulunmakta ise de, hipoksik ve normoksik şartlar altında AMKH'lerin miRNA düzeyindeki ifade değişim profilleri temelinde karşılaştırmalı çalışmalara halen ihtiyaç duyulmaktadır.

Yapılan tez çalışması kapsamında osteojenik farklılaşmada rol oynayan çeşitli miRNA'ların ifade profilleri normoksik ortama kıyasla hipoksik ortamda incelenmiştir. Hipoksik ve normoksik ortamda ekspresyonu incelenen miRNA'ların osteojenik farklılaşmanın erken aşamasında ifade edildiği tespit edilmiştir. Hipoksik ortamda farklı günlerde eksprese olan miRNA'ların osteojenik farklılaşmanın erken veya geç evrelerinde belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. miRNA'ların literatürlerde farklı hedef genleri susturup veya indükleyerek osteojenik farklılaşmayı etkilediği gösterilmiştir. Seçtiğimiz miRNA'ların normoksik ortamdaki hedeflerinin BMP ve HDAC gibi önemli transkripsiyon faktörleri olduğu yapılan diğer çalışmalarla gösterilmiştir. Hipoksik ortamda erken veya geç evrede ifade olan miRNA'ların da belki de aynı yolak üzerinden osteojenik farklılaşmaya etki ettiği düşünülebilir. miRNA'ların hipoksik ortama karşı nasıl cevap oluşturduğunun mekanizması henüz açıklanamamıştır.

Osteogenezde rol oynayan miRNA'ların karakteristik analizleri hakkında ileride yapılacak olan çalışmalar kemik hastalıklarının tedavisi açısından önemli bir adım oluşturabilir.

ÖZET

Hipoksik ve Normoksik Ortam Şartlarında Osteojenik Nesile Farklılaştırılmış İnsan Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Gen/Mikrorna İfade Profillerinin Karşılaştırmalı Analizi

Hüresel tedaviler kapsamında, kök hücrelerin in vitro çoğaltılma ve farklılaştırma işlemlerinin gerçekleştirildiği ortamın oksijen düzeyine bağlı olarak, hücre çoğalma dinamiğinde, elde edilen hüresel ürünün özelliklerinde ve transplantasyon sonrası etkinlik düzeyi bakımından farklı sonuçlara ulaşıldığı rapor edilmektedir. Sunulan tez çalışmasında hipoksik ve normoksik şartlar altında karşılaştırmalı olarak insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin karakteristik özellikleri ve osteojenik nesile farklılaşma potansiyellerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yapılan çalışmada insan yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler hem normoksik (%20 O₂) hem de hipoksik (%2 O₂) ortam koşullarında kültüre edildi. Kültüre edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre karakteri taşıdığı akım sitometri bulguları, soy analizi ve mikroskop görüntüleri ile gösterildi. Hücreler %70-80 bolluğa ulaştıklarında osteojenik farklılaştırma besiyerine geçildi. Osteojenik farklılaşma alkalın fosfataz aktivesi (ALP) ve Ca⁺² tayini, immunohistokimya (OSC, BSP) ve histokimya (von Kossa, Alizarin kırmızısı) boyamaları ile tespit edildi. Belirlenen zaman noktalarında (7., 14., 21., 28. gün) hücre kültürlerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA izolasyonundan sonra cDNA sentezi yapılarak hücrelerin miRNA ekspresyon seviyeleri RT-PCR kullanılarak analiz edildi.

Çalışma sonucunda kültüre edilen hücrelerin hem hipoksik hem de normoksik ortam şartlarında mezenkimal kök hücre karakteri taşıdığı yapılan analizler ile gösterildi. Yapılan osteojenik farklılaşma sonucunda her iki ortamda histokimya ve immunohistokimya boyamaları pozitif olarak görülse de hipoksik ortamda günlere bağlı olarak bir azalma gözlenmiştir. Hücrelerde her iki ortamda da ALP aktivitesi 14.günden sonra düşmüştür. Ca⁺² analizi sonucunda da 7.günden itibaren bir düşüş gözlenmiştir. Belirlenen zaman noktalarında gerçekleştirilen RNA izolasyonunda, RNA miktarlarının ve saflığının çalışma için yeterli olduğu görülmüştür. Yapılan miRNA analizi sonucunda miR106, miR148b, miR26a ve miR22 ekspresyonlarının hipoksik koşullarda arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak hipoksik ortamda miRNA ekspresyonundaki artışın osteojenik farklılaşmayı baskıladığı düşünülebilir.

Anahtar Sözcükler: Hipoksi, Hücre kültürü, Mezenkimal kök hücre, Osteojenik farklılaşma, miRNA

SUMMARY

Comparative Evaluation of the Gene/MicroRNA Expression Profiles of Hypoxic and Normoxic Conditions on the Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells

For cellular therapies, the oxygen concentration of the medium used for the expansion and differentiation of stem cells, affects the dynamics of cell proliferation, the properties of the cell products and the post-transplant effectiveness of grafted cells. In this study, we have investigated the effects of normoxic and hypoxic conditions on the osteogenic differentiation potential of the adipose-derived stem cells.

Human adipose-derived mesenchymal stem cells were cultured in normoxic (20%) and hypoxic (2%) conditions. The mesenchymal properties of the cultured cells were confirmed using flow cytometry, lineage analysis and imaging techniques. Upon 70-80% of confluence, the medium was switched to osteogenic. Osteogenic differentiation was documented by measuring the alkaline phosphatase activity (ALP) and Ca^{+2} assay, histochemistry (von Kossa, Alizarin Red) and immunohistochemistry (OCN, BSP). Total RNA isolation was performed at previously set time-points (7th, 14th, 21th, 28th days). Upon cDNA synthesis miRNA levels were detected the using RT-PCR technique.

Final analyses confirmed that the cells displayed mesenchymal stem cell characteristics in both hypoxic and normoxic conditions. Following osteogenic differentiation, histochemical and immunohistochemical stainings were positive for both groups, however hypoxia group showed a decreased differentiation capacity through the time-points. ALP activity was decreased for both groups at day 14. Ca^{+2} assay results was similarly lower at day seven for both groups. RNA isolation performed at pre-designated time-points has proven that the amount and purity of RNA was optimal. miRNA analyses have shown that the expression levels of miR106, miR148b, miR26a and miR22 has increased under hypoxic conditions. This study confirms that the measured expression of miRNA suppresses osteogenic differentiation capacity in adipose-derived mesenchymal cells.

Key words: Cell culture, Hypoxia, Mesenchymal stem cells, miRNA, Osteogenic differentiation

KAYNAKLAR

- AMORIN B, ALEGRETTI A, VALIM V, SILVA A, SILVA M, SEHN F, SILLA L (2013). Characteristics of Mesenchymal Stem Cells under Hypoxia. *CellBio*, **2(1)**: 11-19.
- AMOS PJ, BAILEY AM, SHANG H, KATZ AJ, LAWRENCE MB, PEIRCE SM (2008). Functional binding of human adipose-derived stromal cells: effects of extraction method and hypoxia pretreatment. *Ann Plast Surg.*, **60**: 437-44.
- AUBIN JE (2001). Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord* . **2**: 81-94.
- AUGELLO A, KURTH TB, DE BARI C (2010). Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *European Cells & Materials*, **20**: 121–133.
- AVASTHI S, SRIVASTAVA RN, SINGH A, SRIVASTAVA M (2008). Stem Cell: Past, Present and Future. *Journal of Medical Update*, **3(1)**.
- BAER PC, GEIGER H (2012). Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity, *Stem Cells International*, **1**: 11.
- BAJEK A, GURTOWSKA N, OLKOWSKA J, KAZMIERSKI L, MAJ M, DREWA T (2016). Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*.
- BARRY FP, MURPHY JM (2004). Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **36**: 568 –584.
- BARTEL DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. **116(2)**: 281-97.
- BIANCO P, ROBEY PG (2001). Stem cells in tissue engineering. *Nature*. **414**: 118-121.
- BIRMINGHAM E, NIEBUR GL, MCHUGH PE, SHAW G, BARRY FP, MCNAMARA LM (2012). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater*. **23**: 13-27.
- BONADIO J (2000). Tissue engineering via local gene delivery: update and future prospects for enhancing the technology. *Adv Drug Deliv Rev*. **44**: 185-194.

- BURAVKOVA LB, GRINAKOVSKAYA OS, ANDREEVA ER, ZHAMBALOVA AP, KOZIONOVA MP (2009). Characteristics of human lipoaspirate-isolated mesenchymal stromal cells cultivated under a lower oxygen tension. *Tsitologiya*. **51**: 5-11.
- BYDLOWSKI SP, LEVY D, RUIZ JML, PEREIRA J (2013). Hematopoietic Stem Cell Niche: Role in Normal and Malignant Hematopoiesis, *STEM CELL BIOLOGY IN NORMAL LIFE and DISEASES*. Ed.: Alimoghaddam K.
- CHAMBERLAIN G, FOX J, ASHTON B, MIDDLETON J (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features and Potential for Homing. *Stem Cells*, **25**: 2739–2749.
- CHAN CK, VANHOUTTE PM (2013). Hypoxia, vascular smooth muscles and endothelium. *Acta Pharmaceutica Sinica B.*, **3(1)**: 1-7.
- CHEN J, DENG S, ZHANG S, CHEN Z, WU S, CAI X, YANG X, GUO B, PENG Q (2014). The role of miRNAs in the differentiation of adipose-derived stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. **9(3)**: 268-79.
- CHEN L, SONG J, CUI J, HOU J, ZHENG X, LI C, LIU L (2013). microRNAs regulate adipocyte differentiation. *Cell Biol Int*. **37(6)**: 533-46.
- CHEN S, LEWALLEN M, XIE T (2013). Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development*. **140(2)**: 255-65.
- CHOI JR, PINGGUAN-MURPHY B, WAN ABAS WA, NOOR AZMI MA, OMAR SZ, CHUA KH, WAN SAFWANI WK (2014a). Hypoxia Promotes Growth and Viability of Human Adipose-Derived Stem Cells with Increased Growth Factors Secretion. *Journal of Asian Scientific Research*. **4(7)**: 328-338.
- CHOI JR, PINGGUAN-MURPHY B, WAN ABAS WA, NOOR AZMI MA, OMAR SZ, CHUA KH, WAN SAFWANI WK (2014b). Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **448(2)**: 218-24.
- CHOI JR, PINGGUAN-MURPHY B, WAN ABAS WA, YONG KW, POON CT, NOOR AZMI MA, OMAR SZ, CHUA KH, XU F, WAN SAFWANI WK (2015). In situ normoxia enhances survival and proliferation rate of human adipose tissue-derived stromal cells without increasing the risk of tumorigenesis. *PLoS One*. **10(1)**:e0115034.
- CHUNG HM, WOND CH, SUNGAB JH (2009). Responses of adipose-derived stem cells during hypoxia: enhanced skin-regenerative potential. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **9(12)**: 1499-1508.

- DAI R, WANG Z, SAMANIPOUR R, KOO KI, KIM K (2016). Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Stem Cells Int.* **2016**:6737345.
- DAS R, JAHR H, VAN OSCH GJ, FARRELL E (2010). The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. *Tissue Eng Part B Rev*, **16**: 159-168.
- DOĞAN, A., PARMAKSIZ, M., ELÇİN, A.E., ELÇİN, Y.M. (2016). Extracellular matrix and regenerative therapies from the cardiac perspective, *Stem Cell Rev Rep*, **12(2)**: 202-213.
- DOMINICI M, BLANC KL, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, KRAUSE DS, DEANS RJ, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ EM (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, **8**: 315–317.
- ELÇİN, Y. M. (2003). *TISSUE ENGINEERING, STEM CELLS, AND GENE THERAPIES* (Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York).
- ELÇİN, Y. M. (2016a). Kök hücrelere bakış: Tanımlar, kavramlar ve sınıflandırmalar, *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları - Kök Hücre Araştırmaları ve Biyoetik*, **20**: 19-33, ISBN: 978-9944-252-76-8.
- ELÇİN, Y. M. (2016b). Kök hücre ve rejeneratif tıp alanında dünya ve Türkiye'deki gelişmeler, *T.C. Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı - Anahtar Dergisi*, **328**: ISSN: 1300-2414.
- ELÇİN, Y. M. (2016c). TÜBA - KÖK HÜCRE ARAŞTIRMALARI VE BİYOETİK RAPORU, *Türkiye Bilimler Akademisi Yayınları*, **20**: 80, ISBN 978-9944-252-76-8.
- FAKHRY M, HAMADE E, BADRAN B, BUCHET R, MAGNE D (2013). Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J Stem Cells*. **5(4)**: 136-48.
- FENG Y, ZHU M, DANGELMAJER S, LEE YM, WIESEKERA O, CASTELLANOS CX, DENDULURI A, CHAICHANA KL, LI Q, ZHANG H, LEVCHENKO A, GUERRERO-CAZARES H, QUIÑONES-HINOJOSA A (2014). Hypoxia-cultured human adipose-derived mesenchymal stem cells are non-oncogenic and have enhanced viability, motility, and tropism to brain cancer. *Cell Death Dis*. **25(6)**:e1797.
- FERNANDES TG, DIOGO MM, CABRAL JMS (2013). Stem cell culture: mimicking the stem cell niche *in vitro*. *STEM CELL BIOPROCESSING FOR CELLULAR THERAPY, DIAGNOSTICS and DRUG DEVELOPMENT*. Woodhead Publishing Limited. Chapter 2. Pg: 33-68.
- FOTIA C, MASSA A, BORIANI F, BALDINI N, GRANCHI D (2015a). Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*. **67(6)**:1073-84.

- GATTAZZO F, URCIUOLO A, BONALDO P (2014). Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta*. **1840(8)**: 2506-19.
- GIACCIA AJ, SIMON MC, JOHNSON A (2004). The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes & Development*, **18**: 2183–2194.
- GROTH S, JOHANNESSEN MD, NEJLUND S, STEHR MA (2008). The effect of long term growth and hypoxia on the differentiation and proliferation potential of adipose-derived stem cells.
- GUO L, ZHAO RC, WU Y (2011). The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. **39(6)**: 608-16.
- HAWKINS KE, SHARP TV, MCKAY TR (2013). The role of hypoxia in stem cell potency and differentiation. *Regen Med.*, **8(6)**: 771–782.
- HAYES J, PERUZZI PP, LAWLER S (2014). MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*. **20(8)**: 460-9.
- HE L, HANNON GJ (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet*. **5(7)**: 522-531.
- HE J, GENETOS DC, YELLOWLEY CE, LEACH JK (2010). Oxygen tension differentially influences osteogenic differentiation of human adipose stem cells in 2D and 3D cultures. *J Cell Biochem*. **110(1)**:87-96.
- HINSKE G (2009). Silencing the host-the role of intronic microRNAs. Doctoral thesis. Ludwig-Maximilians-Universität München, Master of Science In Biomedical Informatics at the Massachusetts Institute of Technology, Germany.
- HOEMANN CD, EL-GABALAWY H, MCKEE MD (2009). In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol* . **57**: 318-323.
- HSIAO ST, LOKMIC Z, PESHAVARIYA H, ABBERTON KM, DUSTING GJ, LIM SY, DILLEY RJ (2013). Hypoxic conditioning enhances the angiogenic paracrine activity of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Dev*. **22(10)**: 1614-23.
- HUANG S, WANG S, BIAN C, YANG Z, ZHOU H, ZENG Y, LI H, HAN Q, ZHAO RC (2012). Upregulation of miR-22 promotes osteogenic differentiation and inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by repressing HDAC6 protein expression. *Stem Cells Dev*. **21(13)**: 2531-40.
- HUANG W, YANG S, SHAO J, LI YP (2013). Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci.*,**12**: 3068–3092.

- HUANG Z NELSON ER, SMITH RL, GOODMAN SB (2007). The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors [correction of osteroprogenitors] to osteoblasts in vitro. *Tissue Eng.* **13(9)**: 2311-20.
- JEŽ M, ROŽMAN P, IVANOVIĆ Z, BAS T (2015). Concise review: the role of oxygen in hematopoietic stem cell physiology. *J Cell Physiol.* **230(9)**: 1999-2005.
- JONES DL, WAGERS AJ (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **9**: 11-2.
- KAWSUWAN S, YONG SONG S, KIM JH, SUNG JH (2012). Mimicking the functional niche of adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **12(12)**: 1575-1588.
- KANG H, HATA A (2015). The role of microRNAs in cell fate determination of mesenchymal stem cells : balancing adipogenesis and osteogenesis. *BMB Rep.* **48(6)**: 319-23.
- KANG S, KIM SM, SUNG JH (2014). Cellular and molecular stimulation of adipose-derived stem cells under hypoxia. *Cell Biol Int.*, **38(5)**: 553-62.
- KAPINAS K, DELANY AM (2011). MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Res Ther.* **13(3)**: 220.
- KAVEH K, IBRAHIM R, BAKAR ZA, IBRAHIM TA (2011). Mesenchymal Stem Cells, Osteogenic Lineage and Bone Tissue Engineering: A Review. *J. Anim.Vet.Adv.* **10(17)**: 2317-2330.
- KIM WS, HAN J, HWANG SJ, SUNG JH (2014). An update on niche composition, signaling and functional regulation of the adipose-derived stem cells. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **14(8)**: 1091-1102.
- KODE J, MUKHERJEE S, JOGLEKAR MV, HARDIKAR AA (2009). Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*, **11**: 377-391.
- KOLIOS G, MOODLEY Y (2013). Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*, **85**: 3-10.
- KOSAN C, GODMANN M (2016). Genetic and Epigenetic Mechanisms That Maintain Hematopoietic Stem Cell Function. *Stem Cells Int.* **2016**: 5178965.
- KOLLMER M, BUHRMAN JS, ZHANG Y, GEMEINHART RA (2013). Markers Are Shared Between Adipogenic and Osteogenic Differentiated Mesenchymal Stem Cells. Journal of developmental biology and tissue engineering. *J Dev Biol Tissue Eng.* **5(2)**:18-25.

- KULSHRESHTHA R, DAVULURI RV, CALIÍN GA, IVAN M (2008). A microRNA component of the hypoxic response. *Cell Death Differ.* **15**: 667–671.
- KULTERER B, FRIEDL G, JANDROSITZ A, SANCHEZ-CABO F, PROKESCH A, PAAR C, SCHEIDELER M, WINDHAGER R, PREISEGGER KH, TRAJANOSKI Z (2007). Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*, **8**: 70.
- LANE SW, WILLIAMS DA, WATT FM (2014). Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nat Biotechnol.* **32(8)**: 795-803.
- LATAILLADE JJ, PIERRE-LOUIS O, HASSELBALCH CH, UZAN G, JASMIN C, MARTYRÉ MC (2008). Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood*, **112 (8)**: 3026 – 3035.
- LI H, LI T, WANG S, WEI J, FAN J, LI J, HAN Q, LIAO L, SHAO C, ZHAO RC (2013). miR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res.* **10(3)**: 313-24.
- LIAN JB, STEIN GS, VAN WIJNEN AJ, STEIN JL, HASSAN MQ, GAUR T, ZHANG Y (2012). MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol.* **8(4)**: 212-27.
- LIAO YH, CHANG YH, SUNG LY, LI KC, YEH CL, YEN TC, HWANG SM, LIN KJ, HU YC (2014). Osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells and calvarial defect repair using baculovirus-mediated co-expression of BMP-2 and miR-148b. *Biomaterials.* **35(18)**: 4901-10.
- LINDROOS B, SUURONEN R, MIETTINEN S (2011). The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev and Rep.* **7**: 269–291.
- LUZI E, MARINI F, SALA SC, TOGNARINI I, GALLI G, BRANDI ML (2008). Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells is modulated by the miR-26a targeting of the SMAD1 transcription factor. *J Bone Miner Res.* **23(2)**: 287-95.
- LYTLE JR, YARIO TA., STEITZ JA (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci USA.* **104(23)**: 9667-72.
- MA T, GRAYSON WL, FROHLICH M, VUNJAK-NOVAKOVIC G (2009). Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. *Biotechnol Prog.* **25(1)**: 32-42.
- MALLADI P, XU Y, CHIOU M, GIACCIA AJ, LONGAKER MT (2006). Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am J Physiol Cell Physiol.*, **290(4)**: 1139-46.

- MATHIEU J, RUOHOLA-BAKER H (2013). Regulation of stem cell populations by microRNAs. *Adv Exp Med Biol.* **786**: 329-51.
- MERCERON C, VINATIER C, PORTRON S, MASSON M, AMIAUD J, GUIGAND L, CHÉREL Y, WEISS P, GUICHEUX J (2010). Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* **298(2)**: 355-64.
- MOHYELDIN A, GARZÓN-MUVDI T, QUIÑONES-HINOJOSA A (2010). Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell.* **7(2)**: 150-61.
- NASCIMENTO ILO, MACHADO CV, TELLES PS (2013). Stem cells and their niches: importance in tissue engineering applied to dentistry. *Rev Gaúcha Odontol.*, **61(2)**: 263-268.
- PENG S, GAO D, GAO C, WEI P, NIU M, SHUAI C (2016). MicroRNAs regulate signaling pathways in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (Review). *Mol Med Rep.***14(1)**:623-9.
- PHAM PV, VU BN, PHAN NK (2016). Hypoxia promotes adipose-derived stem cell proliferation via VEGF. *Biomedical Research and Therapy.* **3(1)**: 476-482.
- PILGAARD L, LUND P, DUROUX M, LOCKSTONE H, TAYLOR J, EMMERSEN J, FINK T, RAGOISSIS J, ZACHAR V (2009). Transcriptional signature of human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) preconditioned for chondrogenesis in hypoxic conditions. *Exp Cell Res.* **315(11)**: 1937-52.
- POCOCK R (2011). Invited review: decoding the microRNA response to hypoxia. *Pflugers Arch.* **461(3)**: 307-15.
- QUINTANA L, ZUR NIEDEN NI, SEMINO CE (2009). Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* **15(1)**: 29-41.
- REZZA A, SENNETT R, RENDL M (2014). Adult stem cell niches: cellular and molecular components. *Curr Top Dev Biol.* **107**: 333-72.
- ROEMELING-VAN RHIJN M, MENSAH FK, KOREVAAR SS, LEIJS MJ, VAN OSCH GJ, IJZERMANS JN, BETJES MG, BAAN CC, WEIMAR W, HOOGDUIJN MJ (2013). Effects of Hypoxia on the Immunomodulatory Properties of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem cells. *Front Immunol.* **4**:203.
- ROMAO JM, JIN W, DODSON MV, HAUSMAN GJ, MOORE SS, GUAN LL (2011). MicroRNA regulation in mammalian adipogenesis. *Exp Biol Med (Maywood).* **236(9)**: 997-1004.

- ROSOVA I, DAO M, CAPOCCIA B, LINK D, NOLTA JA (2008). Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, **26(8)**: 2173-82.
- SATO F, TSUCHIYA S, MELTZER SJ, SHIMIZU K (2011). MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J.* **278(10)**: 1598-609.
- SCHOOLMEESTERS A, EKLUND T, LEAKE D, VERMEULEN A, SMITH Q, FORCE ALDRED S, FEDOROV Y (2009). Functional profiling reveals critical role for miRNA in differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One.* **4(5)**: e5605.
- SINGH P, SCHWARZBAUER JE (2012). Fibronectin and stem cell differentiation – lessons from chondrogenesis. *Journal of Cell Science.* **125**: 3703-12.
- SQUILLARO T, PELUSO G, GALDERISI U (2016). Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant.* **25(5)**: 829-48.
- SRINIVASAN S, SELVAN ST, ARCHUNAN G, GULYAS B, PADMANABHAN P (2013). MicroRNAs -the next generation therapeutic targets in human diseases. *Theranostics.* **3(12)**: 930-42.
- SU X, LIAO L, SHUAI Y, JING H, LIU S, ZHOU H, LIU Y, JIN Y (2015). MiR-26a functions oppositely in osteogenic differentiation of BMSCs and ADSCs depending on distinct activation and roles of Wnt and BMP signaling pathway. *Cell Death Dis.* **6**:e1851.
- STRIOGA M, VISWANATHAN S, DARINSKAS A, SLABY O, MICHALEK J (2012). Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.*, **21**: 2724–2752.
- TAIPALEENMÄKI H, BJERRE HOKLAND L, CHEN L, KAUPPINEN S, KASSEM M (2012). Mechanisms in endocrinology: micro-RNAs: targets for enhancing osteoblast differentiation and bone formation. *Eur J Endocrinol.* **166(3)**: 359-71
- THIBAUT RA, SCOTT BAGGETT L, MIKOS AG, KASPER FK (2010). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on pregenerated extracellular matrix scaffolds in the absence of osteogenic cell culture supplements. *Tissue Eng Part A.* **16(2)**: 431-40.
- TROMPETER HI, DREESEN J, HERMANN E, IWANIUK KM, HAFNER M, RENWICK N, TUSCHL T, WERNET P (2013). MicroRNAs miR-26a, miR-26b, and miR-29b accelerate osteogenic differentiation of unrestricted somatic stem cells from human cord blood. *BMC Genomics.* **14**: 111.
- ULLAH I, SUBBARAO RB, RHO GY (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci. Rep.* **35**: 2.

- VALORANI MG, MONTELATICI E, GERMANI A, BIDDLE A, D'ALESSANDRO D, STROLLO R, PATRIZI MP, LAZZARI L, NYE E, OTTO WR, POZZILLI P, ALISON MR (2012). Preculturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials. *Cell Prolif.*, **45**: 225–238.
- VAN ROOIJ E (2011). The art of microRNA research. *Circ Res.* **108(2)**: 219-34.
- WAGERS AJ (2012). The stem cell niche in regenerative medicine. *Cell Stem Cell.* **10(4)**: 362-9.
- WALMSLEY G. G, CHEUNG A. T., HU M. S., LORENZ H. P., LONGAKER M. T (2016). Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cells: Advancements and Future Directions for Bone Tissue Engineering. *Science Proceedings.* 3.
- WANG LD, WAGERS AJ (2011). Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **12(10)**: 643-55.
- WANG Z, XIE Q, YU Z, ZHOU H, HUANG Y, BI X, WANG Y, SHI W, SUN H, GU P, FAN X (2015). A regulatory loop containing miR-26a, GSK3 β and C/EBP α regulates the osteogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Sci Rep.* **5**: 15280.
- WEI X, YANG X, HAN ZP, QU FF, SHAO L, SHI YF (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin.*, **34(6)**: 747-54.
- YI R, FUCHS E (2011). MicroRNAs and their roles in mammalian stem cells. *J Cell Sci.* **124(Pt 11)**:1775-83.
- YUE Y, ZHANG P, LIU D, YANG JF, NIE C, YANG D (2013). Hypoxia preconditioning enhances the viability of ADSCs to increase the survival rate of ischemic skin flaps in rats. *Aesthetic Plast Surg.* **37(1)**: 159-70.
- ZHANG ZJ, ZHANG H, KANG Y, SHENG PY, MA YC, YANG ZB, ZHANG ZQ, FU M, HE AS, LIAO WM (2012). miRNA expression profile during osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *J Cell Biochem.* **113(3)**:888-98.
- ZHANG H, DAI S, BI J, LIU KK (2011). Biomimetic three-dimensional microenvironment for controlling stem cell fate. *Interface Focus*, **1**: 792–803.
- ZUK PA, ZHU M, ASHJIAN P, DE UGARTE DA, HUANG JI, MIZUNO H, ALFONSO ZC, FRASER JK, BENHAIM P, HEDRICK MH (2002). Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*, **13(12)**: 4279-4295.
- ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG JI, FUTRELL WJ, KATZ AJ, BENHAIM P, LORENZ HP, HEDRICK MH (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7**: 211–226.

ZUSCIK MJ, HILTON MJ, ZHANG X, CHEN D, O'KEEFE RJ (2008). Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *J Clin Invest.* **118(2)**: 429–438.



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Oya

Soyadı: ÇELİKAĞ

Doğum yeri ve tarihi: Ankara / 1989

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekâr

İletişim adresi ve telefonu: Dil devrimi cad. Kentkonakları sit. B6 blk. No:

98/30 Etimesgut/ ANKARA (0506) 622 28 21

II- Eğitimi

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü (2008-2012)

75. Yıl Cumhuriyet Lisesi (2003-2007)

Yabancı Dili:

- İngilizce

III- Ünvanları: Biyolog

IV- Mesleki Deneyimi

- Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji A.B.D., Stajyer Öğrenci (2011)
- Ankara Üniversitesi- Biyoteknoloji Enstitüsü- Proteom Bilim Dalı Stajyer Öğrenci (2010)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgi Alanları

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar: Tübitak 1003-Öncelikli Alanlar 213S203 “Hematolojik Maligniteli Hastalarda Haploidentik Allojeneik Kök Hücre Nakillerinde Mezenkimal Kök Hücre Uygulaması”

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve Katıldığı eğitim seminerleri:

- TÜBA- Kök Hücre Tedavilerine Genel Yaklaşımlar Sempozyumu (2015)
- Deney hayvanları kullanım sertifikası –ANKÜSEM (2014)
- Pedagojik Formasyon Sertifikası – Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
- Laboratuvar akreditasyonu (ISO 17025) - Kırmacı mühendislik danışmanlık Tic. Ltd. Şti
- GMP, GLP, GHP ve ISO22716 Sertifikaları - TSC Akademi