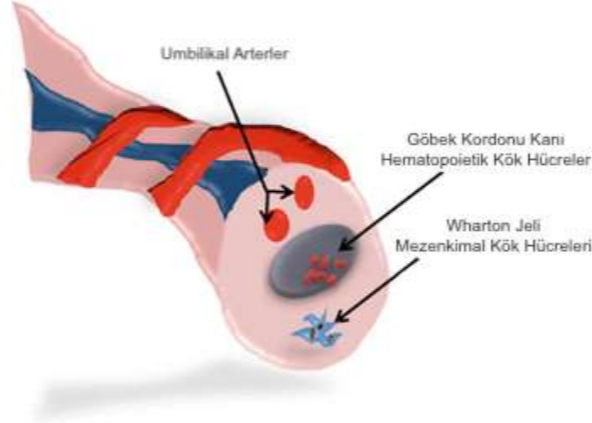


ÖZET

Kök hücrelerin temel işlevi, hastalıklı ve yaşlanan dokuların onarımı ve gençleşmesi yönünde destek sağlamaktır. Kök hücrelerin işlevlerinin transkripsiyon faktörleri, hücre döngüsü düzenleyicileri, sinyal ileti yolları ve miRNA'lar üzerinden kontrol edildiği gösterilmiştir. Bağ dokuda bulunan temel hücreler olan mezenkimal kök hücreler (MKH) doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için değerli bir hücre kaynağı olarak çeşitli uygulamalarda yer almaktadır. Bu çalışmada göbek kordonundaki damarları koruyan bir madde olan Wharton jelinden izole edilen mezenkimal kök hücrelerin (WJ-MKH) sinir doku mühendisliği uygulamaları için nöral farklılaşmasına ilişkin bulgular gösterilmiştir.



Şekil 1. Göbek kordonunun anatomik yapısı ve Wharton jeli mezenkimal kök hücrelerinin şematik gösterimi^[1]

GİRİŞ

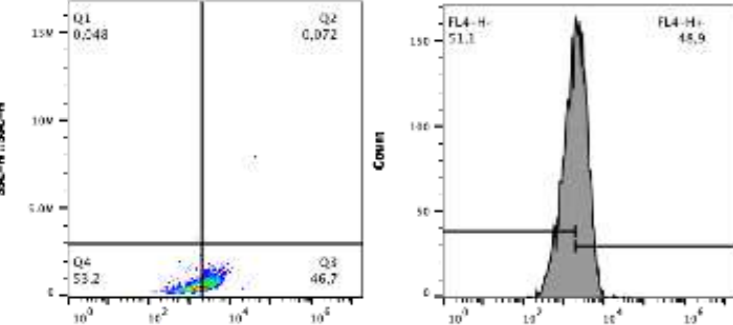
Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, periferik kan, fetal ve erişkin dokular gibi çeşitli kaynaklardan elde edilirler. Bu kaynaklar ağırlı invaziv yöntem, düşük hücre sayısı, hasta yaşının etkisi, azalmış kök hücre davranışı, *in vitro* kısa ömürlü kök ve etik duyarlılıklar gibi çeşitli sınırlamalara sahiptir^[2,3]. Wharton jelinden izole edilen mezenkimal kök hücreler ise, önemli klinik faydası olan eşsiz bir mezenkimal kök hücre popülasyonudur. Geniş farklılaşma potansiyeli, göbek kordonunun bulunabilirliği ve kültürün uzun süreli sürdürülebilirliği WJ-MKH'leri, kemik iliği MKH'lerine kıyasla daha yüksek terapötik değeri olan MKH kaynağı haline getirmektedir^[2]. WJ-MKH'ler, immünomodülasyon, anjiyogenez, yara iyileşmesi, apoptoz, antitümör aktivitesi ve kemotaksisi içeren genleri ifade edebilmektedir. WJ-MKH'lerde, nörojenik transkripsiyon faktörünün yüksek oranda eksprese edildiği bildirilmiştir^[3]. WJ-MKH'lerin, özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en önemli özelliği, uygun mikroçevre koşulları altında çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşma potansiyelinin olmasıdır^[4]. Bu sebeple WJ-MKH'lerin nöral farklılaşma potansiyeli, motor nöron hastalıkları, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, omurilik yaralanmaları, Huntington hastalığı, omurilik kas atrofisi gibi hastalıkların tedavisinde öncü olabilir.

METOT

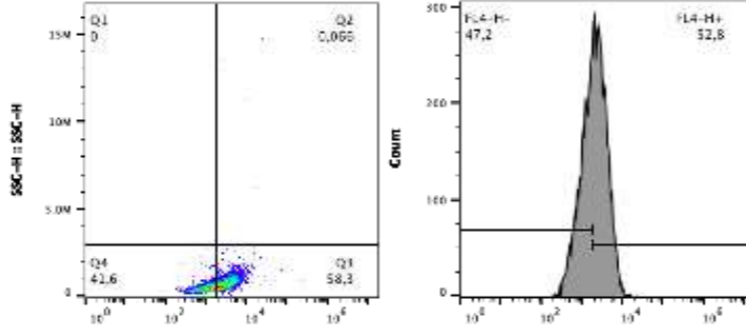
WJ-MKH izolasyonu için 27 günlük hamile Yeni Zelanda ırkı tavşana, intramuskuler olarak %10 ketamin (40-90 mg/kg) ve %2 ksilazin (5 mg/kg) ile anestezi yapılmış ve göbek kordonu örnekleri toplanmıştır. Küçük parçalara bölünen biyopsi, 1 mg/mL konsantrasyonda PBS içerisinde çözünmüş kolajenaz II enzimi ile karıştırılmıştır. 4 saatlik inkübasyon sonucu solüsyon santrifüjlenip dipte kalan pelet %10 FBS ve 100 U/mL penisilin-streptomisin içeren düşük glukoz-DMEM besin ortamıyla tekrar süspansiyon edilip kültür kabına alınıp ve %5 CO₂ içeren 37°C'deki inkübatöre yerleştirilmiştir. İzole edilen hücrelerin karakterizasyonu, pozitif belirteçler CD29, CD90, CD54, MHC I ve negatif belirteçler CD11b, CD34, CD45, MHC II ile işaretlenerek akış sitometrisinde analizleri gerçekleştirilmiş ve DMEM-LG, %1 ITS, %0,1 Gentamisin, 25 ng/mL NT-3, 25 ng/mL bFGF, 200 ng/mL SHH, 25 ng/mL BDNF, 25 ng/mL GDNF içeren nöral farklılaşma ortamı kullanılarak immüno Floresans boyama yapılmıştır.

BULGULAR

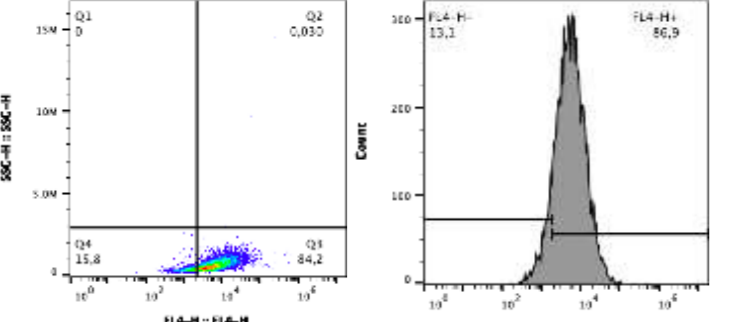
Tavşan göbek kordonundan izole edilen WJ-MKH'ler köklük belirteçleri olan -CD29, CD90, CD54, MHC I- ve köklük belirteçleri olmayan -CD11b, CD34, CD45, MHC II- MKH belirteçleri ile işaretlenerek akış sitometrisinde analizleri gerçekleştirilmiştir.



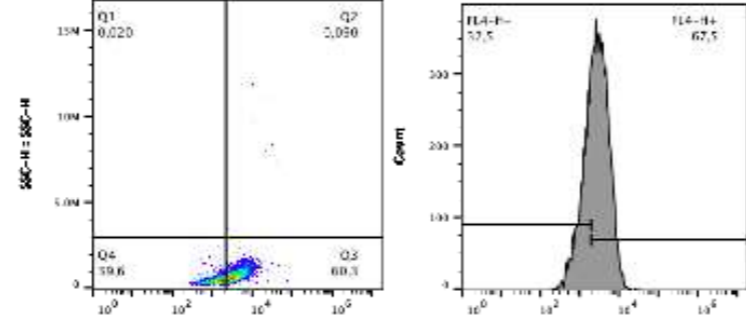
Şekil 2. CD29+ antikorlu işaretli WJ-MKH'lerin akış sitometri iki parametrelili nokta grafiği ve histogram data sonuçları



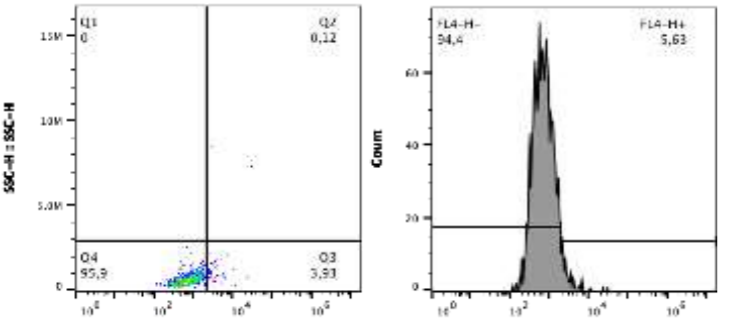
Şekil 3. CD54+ antikorlu işaretli WJ-MKH'lerin Akış Sitometri iki parametrelili nokta grafiği ve histogram data sonuçları



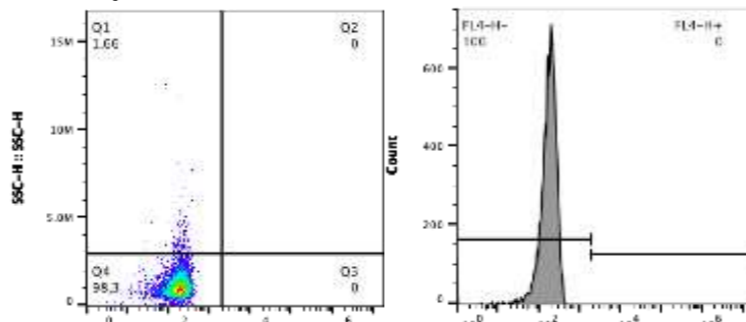
Şekil 4. CD90+ antikorlu işaretli WJ-MKH'lerin Akış Sitometri iki parametrelili nokta grafiği ve histogram data sonuçları



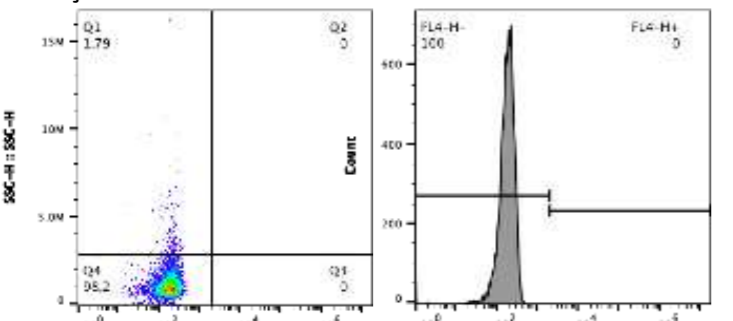
Şekil 5. MHC I antikorlu işaretli WJ-MKH'lerin Akış Sitometri iki parametrelili nokta grafiği ve histogram data sonuçları



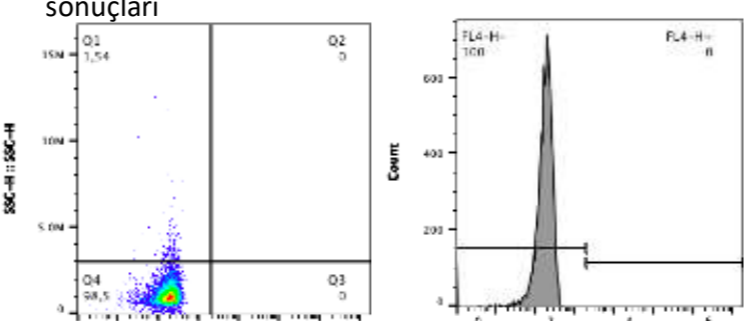
Şekil 6. CD34- antikorlu işaretli WJ-MKH'lerin Akış Sitometri iki parametrelili nokta grafiği ve histogram data sonuçları



Şekil 7. CD45- antikorlu işaretli WJ-MKH'lerin Akış Sitometri iki parametrelili nokta grafiği ve histogram data sonuçları



Şekil 8. CD11b- antikorlu işaretli WJ-MKH'lerin Akış Sitometri iki parametrelili nokta grafiği ve histogram data sonuçları

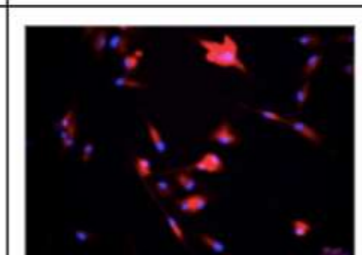
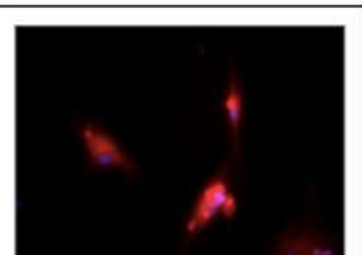
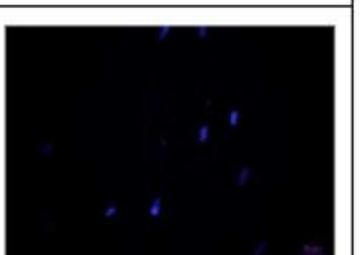
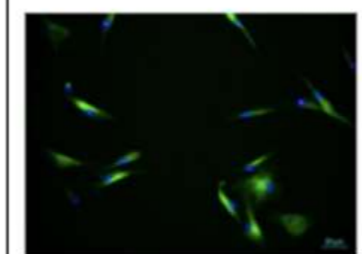
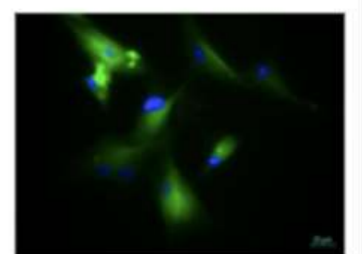
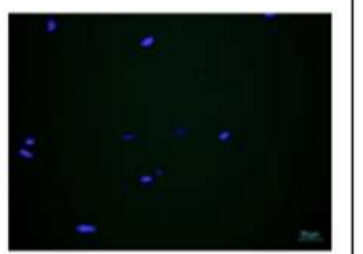
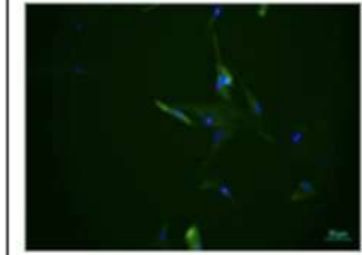
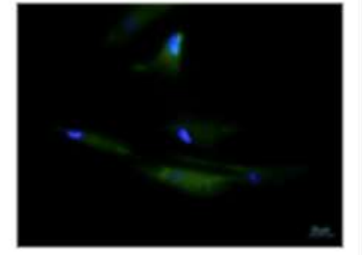
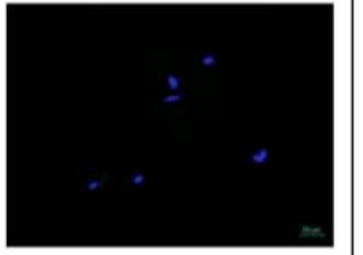


Şekil 9. MHC II antikorlu işaretli WJ-MKH'lerin Akış Sitometri iki parametrelili nokta grafiği ve histogram data sonuçları

CD29+ antikorlu işaretli WJ-MKH'lerin histogram grafiğine göre hücrelerin %48,9'unun, CD54+ antikorlu işaretli WJ-MKH'lerin %52,8'inin, CD90+ antikorlu işaretli WJ-MKH'lerin %86,9'unun ve MHC I antikorlu işaretli WJ-MKH'lerin %67,5'inin, pozitif değer verdiği görülmüştür. CD34- antikorlu işaretli WJ-MKH'lerin %94,4'ünün, CD45-, CD11b- ve MHC II antikorları işaretli WJ-MKH'lerin ise %100'ünün negatif değer verdiği görülmüştür.

WJ-MKH'lerin nöral farklılaşmasının incelenebilmesi için nöral farklılaştırma ortam içeriğinde 21 gün boyunca kültür devam ettirilmiş ve β -III tubulin, O4 ve GFAP primer antikorları kullanılarak immüno Floresans boyama yapılmıştır.

Tablo 1. Farklı ortamlarda 21 gün boyunca kontrol ve nöral farklılaşma ortamlarında kültürü yapılmış WJ-MKH'lerin nöral farklılaşmaya yönelik ilişkili proteinlerin gösterilmesi. Görüntüler 40X ve 20X büyütmede alınmıştır. DAPI (mavi) ve antikor boyamalar (yeşil, kırmızı) floresans mikroskop altında gözlemlenmiştir. Ölçek çizgileri 40x büyütmede 25 μ m'ye 20x büyütmede ise 50 μ m'ye denk gelmektedir.

Antikor	Nöral Farklılaşma Ortamı		Control
	20x Büyütme	40x Büyütme	20x Büyütme
β -III tubulin			
O4			
GFAP			

Yapılan IF boyama sonucu, hücrelerde nöral hücre ilişkili β - III tubulin, O4 ve GFAP proteinlerinin kuvvetli şekilde ifade edildiği görülmüştür.

SONUÇLAR

Sonuç olarak, WJ-MKH'lerin oldukça önemli kök hücre kaynakları olduğu belirlenmiştir. Nöral farklılaştırma ortamı optimize edilmiş olup tavşan göbek kordonundan izole edilen WJ-MKH'ler başarılı bir şekilde nöral hücrelere farklılaştırılmıştır. Yüksek nöral farklılaşma özellikleri sayesinde merkezi ve çevresel sinir sistemi hastalıklarının tedavisi için WJ-MKH'lerin nihai klinik uygulamalara yol açacağı öngörülmektedir. WJ-MKH'lerin nöral farklılaşması, rejeneratif tıp alanında öncü bir görev üstlenmektedir; ve yeni araştırmaların temelini oluşturacaktır.

REFERANSLAR

- [1] Bastawrous, M., Pabón, M. M., Acosta, S., de la Peña, I., Hernandez-Ontiveros, D., Staples, M., ... & Borlongan, C. V. (2016). Wharton's jelly stem cells. *Fetal Stem Cells in Regenerative Medicine*, 257-276.
- [2] Baksh, D., Yao, R., & Tuan, R. S. (2007). Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. *Stem Cells*.
- [3] Musiał-Wysocka, A., Kot, M., Sulkowski, M., Badyra, B., & Majka, M. (2019). Molecular and functional verification of wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) pluripotency. *International Journal of Molecular Sciences*.
- [4] Halim, A., Ariyanti, A. D., Luo, Q., & Song, G. (2020). Recent Progress in Engineering Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Stem Cell Reviews and Reports*, 1-14.

TEŞEKKÜR

Çalışma 118S349 no'lu TÜBİTAK 1001 ve FLP-2019-21207 proje no'su ile Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında desteklenmiştir.