

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN ADİPOZ DOKUSU VE ADİPOZ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARINDA KULLANILMAK
ÜZERE KRİYOPREZERVASYONUNUN OPTİMİZASYONU**

NECATİ FINDIKLI

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ADİL ALLAHVERDİYEV**

İSTANBUL, 2014

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN ADİPOZ DOKUSU VE ADİPOZ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN DOKU
MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARINDA KULLANILMAK ÜZERE
KRİYOPREZERVASYONUNUN OPTİMİZASYONU

Necati FINDIKLI tarafından hazırlanan tez çalışması 19.08.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Bölümü'nde DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Fikriye URAS

Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Tülay İREZ

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Yrd.Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA

Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd.Doç. Dr. Alper YILMAZ

Yıldız Teknik Üniversitesi

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince beni engin bilgi ve tecrübesi ile en doğru şekilde yönlendiren, fikirlerini, yardımlarını esirgemeyen çok değerli tez danışmanım Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e,

Bu tez çalışması için her türlü imkanı sağlayan Fen Bilimleri Enstitüsü'ne, çalışmamın her aşamasında her türlü yardımlarını ve manevi desteklerini aldığım, başta Bölüm Başkanımız Sayın Prof.Dr. İbrahim IŞILDAK ve Yrd.Doç.Dr. Melahat BAĞIROVA olmak üzere Biyomühendislik Bölümü'müzün tüm değerli öğretim üyeleri ve asistanlarına,

Tez çalışmam süresince verdiği desteğin ve imkanların yanında ayrıca sağladığı yüksek motivasyon ile de bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde büyük emeği olan, çok değerli hocam ve çalışma arkadaşım Sayın Prof. Dr. Mustafa BAHÇECİ'ye,

Kısıtlı zamanlarını hiç bir zaman benden esirgemeyerek tüm çalışmam boyunca her türlü desteklerini esirgemeyen, beni kırmayıp her türlü kaprisimi çeken ve ricamı geri çevirmeyen Olga Nehir TEZEL, Hilal TOPTAŞ, Emrah Şefik ABAMOR, Serap YEŞİLKIR BAYDAR, Rabia ÇAKIR KOÇ, Serhat ELÇİÇEK, Serkan YAMAN, Gökçe ÜNAL, Melike ERSÖZ, Özlem Ayşe ÖZYILMAZ ve Aslı Pınar ZORBA'ya,

Yoğun iş temposu içerisinde bu çalışmaya yeterli zaman ve emek harcayabilmemi sağlayan, başta değerli yöneticilerim ve embriyoloji laboratuvarı ekibim olmak üzere, doktor, hemşire, hasta danışmanı arkadaşlarım ve Bahçeci Sağlık Grubu'nun tüm çalışanlarına,

Yoğun iş yüklerinin yanında kısıtlı zaman ve şartlarda beni kırmayıp çalışmaya bilimsel destek veren ve varlıkları ile hayatıma da yön vermiş Sayın Prof. Dr. Demir TİRYAKİ, Prof.Dr. Fikriye URAS, Doç.Dr. Gülderen YANIKKAYA DEMİREL, Op.Dr. Tunç TİRYAKİ ve Op.Dr. Ali SAKİNSEL'e,

Beni bugünlere getiren, zor anlarımda daima yanımda olan ve emeklerini hiç bir zaman ödeyemeyeceğim beni ben yapan aileme, sevgili eşim Yrd.Doç.Dr. Mine M. AFACAN FINDIKLI'ya,

Tüm samimiyetim ile teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ağustos, 2014

Necati FINDIKLI

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xviii
BÖLÜM 1	
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	8
1.3 Hipotez	9
BÖLÜM 2	
2. GENEL BİLGİLER.....	12
2.1 Adipoz Doku Mühendisliği.....	12
2.2 Adipoz doku ve ADK-MKH'lerin klinikte kullanımı	16
2.3 Doku ve Hücre Kriyoprezervasyonu Uygulamaları ve Bilimsel Temelleri	17
2.4 Adipoz Doku Kriyoprezervasyonu: Güncel Çalışmalar	23
2.5 ADK-MKH'lerin Kriyoprezervasyonu: Güncel Çalışmalar	27
BÖLÜM 3	
3. MATERYAL /METOD	29
3.1 Materyaller	29
3.1.1 Cihazlar	29
3.1.2 Kimyasallar	31
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Solüsyon ve Kriyoprotektanların Hazırlanması	32
3.2 Metod	35
3.2.1 İnsan Adipoz Dokuların Örneklenmesi.....	35

3.2.2 Taze Adipoz Doku Örneklerinden ADK-MKH İzolasyonu ve Ekspansiyonu ..	37
3.2.2.1 Manyetik Tabanlı Hücre Ayırıştırılması	38
3.2.3 In Vitro Hücre Kültürü	39
3.2.3.1 Mikro Kapiler Metod (MKM) ile In Vitro Hücre Kültürü	40
3.2.4 Akış Sitometrisi Yöntemi ile İmmünohistokimya	40
3.2.5 Tripan Mavisi Boya Dışlama Testi ile Viabilite Tayini	40
3.2.6 TUNEL testi ile DNA fragmentasyonu analizi	41
3.2.7 In Vitro Farklılaşma Amaçlı Hücre Kültürü	41
3.2.8 Hücrel Farklılaşmanın İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemleri ile İncelenmesi.....	42
3.2.8.1 Adipojenik farklılaşmanın immünohistokimyasal tayini.....	42
3.2.8.2 Kondrojenik farklılaşmanın immünohistokimyasal tayini	43
3.2.8.3 Osteojenik farklılaşmanın immünohistokimyasal tayini	43
3.2.9 İnsan ADK-MKH örneklerinin Kriyoprezervasyonu ve Çözülmesi	43
3.2.9.1 Aşamalı Yavaş Dondurma Protokolü	43
3.2.9.2 Vitrifikasyon Protokolü.....	44
3.2.9.3 ADK-MKH Örneklerinin Çözülmesi	45
3.2.10 İnsan Adipoz Doku Örneklerinin Kriyoprezervasyonu ve Çözülmesi.....	45
3.2.10.1 Aşamalı yavaş dondurma Protokolü	47
3.2.10.2 Vitrifikasyon Protokolü.....	48
3.2.10.3 Adipoz Doku Örneklerinin Çözülmesi.....	48
3.2.11 Histolojik İnceleme	49
3.2.12 Çözme Sonrası Adipoz Doku Örneklerinden ADK-MKH İzolasyonu ve Ekspansiyonu	49
3.2.13 İstatistiksel Analiz	52

BÖLÜM 4

4. DENEY SONUÇLARI	53
4.1 İnsan Adipoz Dokularından ADK-MKH İzolasyonu ve In Vitro Kültürü.....	53
4.2. ADK-MKH'lerin Kök Hücre Olma Özellikleri Bakımından Karakterizasyonu.....	56
4.3 Kriyoprotektan Konsantrasyonunun ve İnkübasyon Süresinin Hücrel Düzeydeki Toksik Etkilerinin ADK-MKH'ler Kullanılarak İncelenmesi.....	63
4.4 Kriyoprotektan Kokteyllerinin ve İnkübasyon Süresinin Hücrel Düzeydeki Toksik Etkilerinin ADK-MKH'ler Kullanılarak İncelenmesi	68
4.5 İki Farklı Metod ile Dondurulan ADK-MKH'lerin Çözme Sonrası Canlılık, In Vitro Ekspansiyon ve In vitro Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi.....	77
4.6 İnsan Adipoz Dokularının Farklı Metodlarla Kriyoprezervasyonu.....	82
4.7 Histolojik İnceleme ve Bulgular	83
4.7.1 Konvansiyonel Koşullarda (+4°C, -20°C ve -196°C) Saklanan Doku Örneklerinin Çözme Sonrası Histolojik Değerlendirilmesi	83
4.7.2 Vitrifikasyon Sonrası -196°C'de Sıvı Nitrojen İçerisinde Saklanan Doku	

Örneklerinin Çözme Sonrası Histolojik Değerlendirilmesi	89
4.8 Dondurulmuş/Çözülmüş Dokulardan Elde Edilen Hücrelerin Viabilite İncelemesi Sonuçları	93
4.9 Dondurulmuş/Çözülmüş Dokulardan Elde Edilen Hücrelerin In Vitro Kültürde Ekspansiyonu	101
4.10 Dondurulmuş/Çözülmüş Dokulardan Elde Edilen Hücrelerin In Vitro Farklılaşma Potansiyelleri.....	102
BÖLÜM 5	
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	105
KAYNAKLAR	116
ÖZGEÇMİŞ	129

SİMGE LİSTESİ

Bp	Baz çifti
cm	Santimetre
cm ²	Santimetre kare
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
α	Alfa
β	Beta
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
g	Gravite (Santrifüj dönüş hızı)
mol/l	Mol/litre

KISALTMA LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADK-MKH	Adipoz doku-kaynaklı mezenkimal kök hücre
ALP	Alkalın fosfataz
BAD	Beyaz adipoz doku
CHO	Çin hamster over hücresi
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagles mediumu
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPBS	Dulbecco'nun fosfat tamponlu salin solüsyonu
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
EG	Etilen glikol
ESM	Ekstraselüler matriks
FBS	Fetal bovin serumu
G3-PDH	Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz
GMP	İyi üretim uygulamaları (Good manufacturing practices)
HES	Hidroksietil nişasta
HSA	İnsan serum albumini
IVD	In vitro farklılaşma
HYL	Hücre yardımcı lipotransfer
KAD	Kahverengi adipoz doku
KİK-MKH	Kemik iliği-kaynaklı mezenkimal kök hücre
KKK-MKH	Kordon kanı-kaynaklı mezenkimal kök hücre
MKM	Mikrokapiler kültür metodu
MKH	Mezenkimal kök hücre
PBS	Fosfat tamponlu salin solüsyonu (Phosphate-buffered saline)
PEG	Polietilenglikol
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asit
PrOH	Propanediol
PVP	Polivinilpirolidon
RBC	Kırmızı kan hücresi (Red blood cell)
SCID	Ağır kombine bağışıklık sistemi yetmezliği
SVF	Stromal vasküler fraksiyon
TNF α	Doku nekroz faktörü α (Tissue Necrosis Factor α)

VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
YÜT	Yardımla üreme teknikleri
βFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Adipoz doku	5
Şekil 1.2 Çalışmanın hipotezi	10
Şekil 2.1 İşlem sayılarına göre ABD’de en yaygın ilk 5 kozmetik cerrahi uygulaması ..	16
Şekil 2.2 Günümüzde doku ve hücre kriyoprezervasyonunda en sık kullanılan yöntemler	18
Şekil 2.3 Farklı dondurma hızlarının hücresel canlılık üzerindeki etkileri	22
Şekil 2.4 Kriyoprotektan kokteylleri hazırlama şeması	23
Şekil 3.1 Enzim ile inkübasyon sonrası ayrılmış tabakalar	37
Şekil 3.2 RBC Liziz tamponu ile muamele öncesi hücre pelleti	38
Şekil 3.3 Vitrifikasyon için hazırlanmış solüsyonlar ve kriyotüpler	44
Şekil 3.4 Lipoaspirat örneklerinin doku dondurma aşaması için ayrılması	46
Şekil 3.5 İşlemden kullanım öncesi lipoaspirat örneğinin süzülmesi	46
Şekil 3.6 Dengeleme aşaması öncesi ilgili kaplara ayrılmış doku örnekleri	47
Şekil 3.7 Çözme sonrası adipoz dokulardan hücre izolasyonu	50
Şekil 4.1 Manyetik hücre ayırma sistemi ile ADK-MKH izolasyonu	54
Şekil 4.2 ADK-MKH izolasyonu sonrası 24 saat sonraki hücre kültür görüntüsü	57
Şekil 4.3 ADK-MKH hücrelerinin in vitro ortamda 1 haftalık kültür sonrası kültür kabının tabanını kaplamış görüntüsü	58
Şekil 4.4 ADK-MKH’lerin in vitro kültürü, 2.pasaj	58
Şekil 4.5 ADK-MKH’lerin in vitro kültürü, 4.pasaj	59
Şekil 4.6 ADK-MKH’lerin in vitro kültürü, 8.pasaj	60
Şekil 4.7 ADK-MKH’lerin in vitro kültürü, 10.pasaj	60
Şekil 4.8 Hücresel düzeyde inceleme aşamasında kullanılan ADK-MKH hücrelerinin akış sitometrisi sonuçları	61
Şekil 4.9 ADK-MKH’lerin IVD potansiyellerinin ölçülmesi - 14 günlük IVD sonrası kontrol grubu hücreleri	62
Şekil 4.10 14 günlük IVD sonrası adipojenik farklılaşma	62
Şekil 4.11 14 günlük IVD sonrası adipojenik farklılaşmanın Oil Red O boyaması sonrası görünümü	63
Şekil 4.12 Farklı DMSO konsantrasyonu ve inkübasyon sürelerine göre hücresel canlılığın ve DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi	65
Şekil 4.13 Farklı EG konsantrasyonu ve inkübasyon sürelerine göre hücresel canlılığın ve DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi	66
Şekil 4.14 TUNEL test sonrası DNA fragmentasyonu göstermeyen bir insan	

ADK-MKH nükleus görüntüsü.....	67
Şekil 4.15 TUNEL test sonrası DNA fragmentasyonu gösteren bir insan ADK-MKH nükleus görüntüsü	67
Şekil 4.16 Hücre düzeyinde toksisite incelemesi çalışma planı	68
Şekil 4.17 Aşamalı yavaş dondurma yöntemi ile kriyoprezervasyon öncesi kriyoprotektan inkübasyon sürelerinin hücresel canlılık üzerine etkisi	70
Şekil 4.18 Vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyon öncesi farklı kriyoprotektan ile inkübasyon sürelerinin hücresel canlılık üzerindeki etkisi	71
Şekil 4.19 Kriyoprezervasyon öncesi farklı kriyoprotektanlar ile inkübasyon sonrası canlılık değerlendirmesi (t=10 dakika)	72
Şekil 4.20 Dengeleme solüsyonu ile 20 dakika inkübasyon sonrası- Kontrol grubu hücreleri (40X).....	72
Şekil 4.21 Dengeleme solüsyonu ile 20 dakika inkübasyon sonrası-VS1 grubu hücreleri (40X).....	73
Şekil 4.22 Dengeleme solüsyonu ile 20 dakika inkübasyon sonrası -VS2 grubu hücreleri (40X).....	73
Şekil 4.23 Dengeleme solüsyonu ile 20 dakika inkübasyon sonrası-0,5M süktroz grubu hücreleri (40X)	74
Şekil 4.24 Dengeleme solüsyonu ile 40 dakika inkübasyon sonrası-kontrol grubu hücreleri (40X).....	74
Şekil 4.25 Dengeleme solüsyonu ile 40 dakika inkübasyon sonrası-VS1 grubu hücreleri (40X).....	75
Şekil 4.26 Dengeleme solüsyonu ile 40 dakika inkübasyon sonrası-VS2 grubu hücreleri (40X).....	75
Şekil 4.27 Dengeleme solüsyonu ile 40 dakika inkübasyon sonrası-0,5M süktroz grubu hücreleri (40X)	76
Şekil 4.28 VS2 grubunda 40 dakika dengeleme solüsyonu ile inkübasyon sonrası hücrelerde gözlenen sitoplazmik tomurcuklanma.....	76
Şekil 4.29 VS2 grubunda 40 dakika dengeleme solüsyonu ile inkübasyon sonrası hücrelerin tripan mavisi boyaması ile canlılık değerlendirmesi	77
Şekil 4.30 ADK-MKH'lerin farklı dondurma protokollerine göre gruplanması ve kriyoprezervasyonu.....	78
Şekil 4.31 Aşamalı yavaş dondurma ve vitrifikasyon ile kriyoprezervasyon uygulanan ADK-MKH'lerin çözme sonrası canlılık değerlendirmesi	79
Şekil 4.32 Çözme sonrası farklı dondurma gruplarındaki hücrelere ait zaman bağlı hücre gelişimi	80
Şekil 4.33 Adipojenik farklılaşma (Oil red O boyaması).....	81
Şekil 4.34 Kondrojenik farklılaşma (Alcian mavisi boyaması)	81
Şekil 4.35 Osteojenik farklılaşma (Alkalik fosfataz boyaması)	82
Şekil 4.36 Doku düzeyinde kriyoprezervasyon incelemesi çalışma planı	83
Şekil 4.37 +4°C'de saklanan kontrol grubu örneğine ait doku kesiti (10X).....	84
Şekil 4.38 +4°C'de saklanan %10 DMSO grubu örneğine ait doku kesiti (10X)	85
Şekil 4.39 +4°C'de saklanan %10 DMSO+0,2M süktroz grubu örn. ait doku kesiti (10X)	85
Şekil 4.40 +4°C'de saklanan 0,5M süktroz grubu örneğine ait doku kesiti (10X)	86
Şekil 4.41 -20°C'de saklanan kontrol grubu örneğine ait doku kesiti (10X)	86
Şekil 4.42 -20°C'de saklanan %10 DMSO grubu örneğine ait doku kesiti (10X)	87
Şekil 4.43 -196°C'de saklanan kontrol grubu örneğine ait doku kesiti (40X)	87

Şekil 4.44 -196°C'de saklanan %10 DMSO grubu örneğine ait doku kesiti (40X)	88
Şekil 4.45 -196°C'de saklanan %10 DMSO+0,2M süktroz grubu örn. ait doku kesiti (40X)	88
Şekil 4.46 -196°C'de saklanan 0,5M süktroz grubu örneğ.ne ait doku kesiti (40X)	89
Şekil 4.47 Dengeleme aşamasında 10 dakika inkübasyon sonrası kontrol grubu doku örneği kesiti (10X)	90
Şekil 4.48 Dengeleme aşamasında 10 dakika inkübasyon sonrası VS1 grubu doku örneği kesiti (10X)	91
Şekil 4.49 Dengeleme aşamasında 10 dakika inkübasyon sonrası VS2 grubu doku örneği kesiti (10X)	91
Şekil 4.50 Dengeleme aşamasında 10 dakika inkübasyon sonrası 0,5M süktroz grubu doku örneği kesiti (10X)	92
Şekil 4.51 Dengeleme aşamasında 20 dakika inkübasyon sonrası 0,5M süktroz grubu doku örneği kesiti (10X)	92
Şekil 4.52 Dengeleme aşamasında 40 dakika inkübasyon sonrası 0,5M süktroz grubu doku örneği kesiti (40X)	93
Şekil 4.53 Tripan mavisi boyaması sonrası canlılık tayini (canlı hücreler)	94
Şekil 4.54 Tripan mavisi boyaması sonrası canlılık tayini (ölü hücreler).....	94
Şekil 4.55 +4 °C'de saklanan aşamalı yavaş dondurma protokolü uygulanmış adipoz doku örneklerinde çözme sonrası hücresel canlılık oranları	97
Şekil 4.56 -20°C'de saklanan aşamalı yavaş dondurma protokolü uygulanmış adipoz doku örneklerinde çözme sonrası hücresel canlılık oranları	98
Şekil 4.57 -196°C'de saklanan aşamalı yavaş dondurma protokolü uygulanmış adipoz doku örneklerinin çözme sonrası hücresel canlılık oranları	98
Şekil 4.58 Dengeleme solüsyonu ile 10 dakika inkübe edilen adipoz doku örneklerinde çözme sonrası canlılık oranları	99
Şekil 4.59 Dengeleme solüsyonu ile 20 dakika inkübe edilen adipoz doku örneklerinde çözme sonrası hücresel canlılık oranları.....	99
Şekil 4.60 Dengeleme solüsyonu ile 40 dakika inkübe edilen adipoz doku örneklerinde çözme sonrası hücresel canlılık oranları	100
Şekil 4.61 Çözme sonrasında yüksek canlılık gözlenen gruplarda in vitro ekspansiyon değerlendirilmesi	102

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Adipoz doku mühendisliğinde kullanılan çeşitli biyomateryaller.....	13
Çizelge 2.2 İnsan adipoz dokusu kriyoprezervasyonu konusunda günümüze kadar gerçekleştirilmiş çalışmalar ve sonuçları	25
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan solüsyon ve kimyasallar.....	31
Çizelge 3.2 STEMPro in vitro farklılaşma solüsyonlarının hazırlanışı	35
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan adipoz doku örnekleri ile ilgili bilgiler.....	36
Çizelge 3.4 Aşamalı yavaş dondurma uygulanan dokularda altgruplara göre kullanılan dengeleme solüsyonları	47
Çizelge 3.5 Vitrifikasyon uygulanan dokularda altgruplara göre kullanılan dengeleme ve vitrifikasyon solüsyonları	48
Çizelge 4.1 Mikro kapiler metodu ile konvansiyonel kültür karşılaştırılmasında kullanılan hücre yoğunlukları.....	55
Çizelge 4.2 Çalışmada elde edilen farklı ADK-MKHLara ait akış sitometrisi sonuçları.....	61
Çizelge 4.3 DMSO ve EG ile gerçekleştirilen toksisite testinde kullanılan farklı inkübasyon süreleri ve kriyoprotektan konsantrasyonları	64
Çizelge 4.4 Aşamalı yavaş dondurma yöntemi ile kriyoprezervasyon öncesi kriyoprotektan ile farklı inkübasyon sürelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi	69
Çizelge 4.5 Vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezervasyon öncesi farklı dengeleme sürelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi	70
Çizelge 4.6 Aşamalı yavaş dondurma uygulanan adipoz doku örneklerinde farklı saklama sıcaklıklarının canlılık üzerindeki etkisi	95
Çizelge 4.7 Vitrifikasyon uygulanan adipoz doku örneklerinde farklı inkübasyon sürelerinin hücresel canlılık üzerindeki etkileri	96
Çizelge 4.8 Dondurulmuş ve 24 ay sonra çözölmüş dokulardan elde edilen hücrelerin in vitro ekspansiyon ve in vitro farklılaşma sonuçları.....	103

İNSAN ADİPOZ DOKUSU VE ADİPOZ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARINDA KULLANILMAK ÜZERE KRİYOPREZERVASYONUNUN OPTİMİZASYONU

Necati FINDIKLI

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEY

Amerikan Plastik Cerrahi Derneği verilerine göre, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 2012 yılı içerisinde yaklaşık 300.000 civarında yumuşak doku defekti tamiri amacı ile mastektomi sonrası meme, el ve yüz gençleştirme işlemlerini de kapsayan cerrahi işlem gerçekleştirilmiştir. Bu rakamın her yıl giderek arttığı bilinmektedir. Ülkemizde ise bu alanda çalışmalar yapılsa da rakamsal bir bilgi bulunmamaktadır. Son yıllarda yumuşak doku mühendisliği ve klinik doku tamiri uygulamalarında kök/progenitör hücrelerin kullanılması ve bu yolla elde edilmiş yapay dokuların oluşturulması gibi yeni yaklaşımlar ve çalışmalar, yer almaktadır. Bu bağlamda lipoaspirasyon metodu ile elde edilebilen otolog adipoz doku, içerdiği zengin kök/progenitör hücre popülasyonu sayesinde adı geçen yumuşak doku defektlerinin giderilmesinde ve iyileştirilmesinde yüksek potansiyele sahiptir. Dünya genelinde yılda milyonlarca lipoaspirasyon ve kozmetik amaçlı adipoz doku rezeksiyonu uygulaması yapılmaktadır. Bu uygulamalardan elde edilen adipoz dokuların etkin ve verimli olarak yakın gelecekte yumuşak doku travmaları dışında pek çok farklı doku mühendisliği veya rekonstrüktif cerrahi uygulaması için doğal otolog doku kaynağı olabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen adipoz dokunun veya içerdiği progenitör hücrelerin daha sonra kullanılmak üzere kriyoprezervasyonunun yapılması, kriyobankta uzun süre saklanması ve gerektiğinde biyolojik özelliklerini kaybetmeden kriyobanktan çıkarılarak çözülmesi, ve alıcının ihtiyaç duyulan bölgesine nakli sonrasında iyi sonuçların elde edilmesi oldukça

önemli olup, yumuşak doku mühendisliği ve plastik/rekonstrüktif cerrahinin esas hedeflerinden biridir. Ancak kriyobiyojinin bu alanında hücre ve dokuların dondurulma/çözümleri sonrası klinik kullanımlarıyla ilgili varolan ciddi problemler (insan adipoz dokusu ve aynı dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin, çözme sonrası düşük viabilite, nakledilen bölgede yüksek re-absorbsiyon vb.) halen giderilememiştir. Şimdiye kadar dünyada bu alanda çeşitli çalışmalar yapılsa da halen verimli bir adipoz doku/adipoz doku kaynaklı-mezenkimal kök hücre kriyoprezervasyon yöntemi geliştirilememiştir. Bunun nedenlerinden biri, şimdiye kadar uygun kriyoprotektanların, kriyoprotektan konsantrasyonlarının, karışımlarının, vitrifikasyon gibi önemli kriyoprezervasyon yönteminin adipoz doku/adipoz doku kaynaklı-mezenkimal kök hücrelerde yeterince incelenmemiş olmasıdır. Ayrıca mevcut yaklaşımların doku yenileme ve uygulanan bölgede mevcut hasarın tamirindeki etkinliği konusunda bugüne kadar gerçekleştirilen az sayıda klinik-öncesi ve klinik çalışmada, kök hücre ve içinde bulunduğu niş özellikleri dikkate alınmadığından çalışmalar her zaman olumlu sonuçlar vermemektedir.

Mevcut bilgilere dayanarak bu tez çalışmasının amacı, yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere insan adipoz dokusu ve aynı dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin, mevcut konvansiyonel yöntemler ile kriyoprezervasyonundaki yapısal ve fonksiyonel düzeydeki etkinliklerinin belirlenmesi, adipoz doku ve içerdiği kök hücrelerin kriyoprezervasyonu ile ilgili mevcut problemlerin giderilmesinde vitrifikasyon metodu ile kriyoprezervasyon rejimlerinin ve yaklaşımlarının etkinliğinin incelenmesi, elde edilen verilere dayanarak insan adipoz doku/adipoz doku-kaynaklı mezenkimal kök hücre kriyoprezervasyon protokollerinin optimize edilmesi ile klinik kullanıma uygun doku ve hücre saklama amaçlı kriyobank oluşturulmasıdır.

Belirlenen amaç doğrultusunda çalışma genelinde 10 farklı donörden lipoaspirasyon (n=8) ve cerrahi eksizyon (n=2) uygulamaları sonrası elde edilen adipoz doku örnekleri kullanıldı. Örneklerin 6'sına adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyonu amacı ile enzimatik ayrıştırma tekniği uygulandı. Hücre izolasyonu aşamasında ayrıca manyetik tabanlı hücre ayrıştırılması tekniği de kullanıldı. İzole edilen hücrelerin kök hücre olma özellikleri in vitro kültürdeki morfolojik analiz, akış sitometrisi (CD90, CD105, CD29, CD34, CD45) ve in vitro ekspansiyon/farklılaşma testleri kullanılarak ölçüldü. Doku ve hücre kriyoprezervasyonu için, içerisinde kriyoprotektan olarak DMSO, etilen glikol ve sükroz'un farklı konsantrasyonları veya kokteylleri bulunan aşamalı yavaş dondurma (%10 DMSO; %10DMSO+0,2M sükroz; 0,5M sükroz) ve vitrifikasyon teknikleri (%15 DMSO+%15 etilen glikol+0,5M sükroz; %30DMSO+%30 etilen glikol+0,5M sükroz) kullanıldı. Kriyoprezervasyon sonrası dokuların yapısal durumları immünohistokimya tekniği ile, hücrelerin yapısal ve fonksiyonel durumları ise Tripan mavisi boya dışlama testi, TUNEL testi ile DNA fragmantasyon analizi ve in vitro farklılaşma analizi kullanılarak ölçüldü. Çözme sonrası doğrudan dondurulan veya dondurulmuş dokudan izole edilen hücreler ayrıca morfolojik ve in vitro ekspansiyon özellikleri bakımından incelendi. İncelemeler ve ölçümler sırasında elde edilen kantitatif veriler SPSS versiyon 10.0 for windows programı ile değerlendirildi ve değerlendirme sırasında $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Deney üç aşamada gerçekleştirildi. İlk aşamada elde edilen örneklerden 6'sında (4 örnek lipoaspirasyon ve 2 örnek cerrahi eksizyon yöntemi) enzimatik ayrıştırma

metodu uygulanarak hücre izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen bu hücrelerin in vitro kültürdeki gelişim ve morfolojik özellikleri, akış sitometrisinde elde edilen kök hücre işaretçikleri sonuçları ve in vitro farklılaşma sonrası mezoderm kaynaklı farklı hücrelere dönüşüm özellikleri gösterildi ve mezenkimal kök hücre oldukları konfirme edildi. İkinci aşamada bu hücreler kullanılarak mevcut konvansiyonel kriyoprezervasyon ve vitrifikasyon protokollerinde kullanılan DMSO ve etilen glikol (EG) kriyoprotektanlarının farklı konsantrasyonları (%1 - %30), farklı kombinasyonları ve hücre ile farklı inkübasyon süreleri (10 – 40 dakika) bakımından sitotoksik ve genotoksik etkileri incelendi. DMSO ve etilen glikolün %10'dan yüksek konsantrasyonlarında ve 20 dakika'dan uzun inkübasyon sürelerinde hücresel canlılık düzeylerinde anlamlı azalma gözlemlendi ($p<0,05$). Hücre viabilite incelemesi ile eş zamanlı gerçekleştirilen DNA fragmentasyon testlerinde ise adı geçen parametreler yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmedi ($p>0,05$). Çalışmanın üçüncü aşamasında, deney kapsamında elde edilen insan adipoz dokuları ($n=4$) ve adipoz doku-kaynaklı mezenkimal kök hücreleri ($n=4$), mevcut konvansiyonel ve vitrifikasyon protokolleri kullanılarak doku ve hücre dondurma programlarına alındı. Her iki grup, ayrı ayrı olarak iki farklı metod (aşamalı yavaş dondurma ve vitrifikasyon), farklı inkübasyon süreleri ve kriyoprezervasyon sonrası farklı saklama sıcaklıkları yönünden test edildi. Hücre düzeyinde gerçekleştirilen kriyoprezervasyon uygulamalarında, aşamalı yavaş dondurma gerçekleştirilen %10 DMSO ve %10DMSO+0,2M süktroz grubu ile, vitrifikasyon uygulanan VS1 ve VS2 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek canlılık oranları elde edildi (sırasıyla %80,2, %88,9, %85,4, %68,2 ve %12,2; $p<0,01$). Doku düzeyinde gerçekleştirilen kriyoprezervasyon uygulamalarında ise vitrifikasyon uygulanan VS1 ve VS2 grubunda, aşamalı yavaş dondurma uygulanan %10 DMSO ve %10 DMSO+0,2M süktroz gruplarındaki dokulara ve kontrol grubuna kıyasla daha yüksek canlılık oranları elde edildi (sırasıyla %90,2, %82,0, %50,0, %62,8 ve %10,2; $p<0,01$). Aşamalı yavaş dondurma grubunda dondurulan doku örneklerinin ve içerdikleri kök hücrelerin +4°C 'de ve -20°C'de uzun süreli saklanmaları sonrası canlılık ve fonksiyonelliklerini kaybettikleri gözlemlendi. Gerek hücre, gerekse doku düzeyinde gerçekleştirilen dondurma ve çözme işlemleri sonrası canlı olarak tespit edilerek kültüre edilen hücrelerin, yapılan in vitro ekspansiyon ve in vitro farklılaşma testlerinde, hücre gelişim hızlarında ve adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyelleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında, günümüzde kullanılmakta olan farklı konvansiyonel doku ve hücre kriyoprezervasyon protokollerinin ve mevcut literatürde ilk kez olarak farklı vitrifikasyon protokollerinin adipoz doku ve içerdikleri mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkinlikleri eş zamanlı olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, aşamalı yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemi kapsamında kullanılan kriyoprotektanların ve uzatılmış inkübasyon sürelerinin insan adipoz dokusu ve içerdikleri mezenkimal kök hücrelerinin viabilitesi ve fonksiyonelliği üzerinde ciddi ve olumsuz etkiler oluşturabildiğini göstermiştir. Sonuçlar ayrıca kriyoprezervasyon işlemlerinin klinik etkinliğinin artırılması amacı ile doku ve hücre dondurma işlemlerinin ayrı ayrı optimize edilmesi ve uygulanması gerektiğini de doğrulamıştır. Bu bulgulara ilave olarak, mevcut güncel çalışmalarda raporlanmış konvansiyonel saklama sıcaklıklarının (+4°, - 20°C) adipoz doku ve içerdikleri ADK-MKH popülasyonunun uzun vadeli etkin ve verimli saklanması için yeterli olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak tez kapsamında bir adipoz doku/adipoz doku kaynaklı-mezenkimal kök hücre kriyoprezervasyonunda en uygun dondurma rejiminin doku için vitrifikasyon, ADK-MKH’ler için ise aşamalı yavaş dondurma olduğu saptanmıştır. Bu bilgiye dayanarak adipoz doku/adipoz doku kaynaklı-mezenkimal kök hücrelerin kriyoprezervasyon protokolları geliştirilmiş ve optimize edilmiştir.

Çalışmamız sırasında elde edilen sonuçlar doğrultusunda ayrıca etkin bir doku ve hücre kriyobankı oluşturulmuştur. Sonuçlarımızın, yakın gelecekte kök hücre ve doku mühendisliği alanında gerçekleştirilecek yeni araştırma, klinik öncesi veya klinik kullanım amaçlı üretim teknikleri, hücre karakterizasyonu ve farklılaştırma çalışmalarında kullanılmak üzere önemli bir kaynak oluşturacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Adipoz doku, ADK-MKH, Yumuşak doku mühendisliği, Kriyoprezervasyon, Aamalı yava dondurma, Vitrifikasyon.

**OPTIMIZATION OF CRYOPRESERVATION PROTOCOLS FOR ADIPOSE
TISSUE AND ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS AND
THEIR POTENTIAL USE IN TISSUE ENGINEERING**

Necati FINDIKLI

Department of Bioengineering

Ph.D. Thesis

Advisor: Prof. Dr. Adil ALLAHVERDIYEV

According to American Society of Plastic Surgeons, in 2012, approximately 300.000 procedures have been performed for soft tissue repairs including breast and nipple reconstruction (after mastectomy), hand and face rejuvenation and this number continues to increase annually. In Turkey, although the application of these procedures have usually been performed in many clinics, such information is not available for the public yet. Contemporary research in soft tissue engineering indicates that, numerous soft tissue defects can be efficiently repaired when appropriate biomaterials, cells and growth factors can be delivered together to the wounded location. For this reason, novel approaches and works are currently directed to the creation of artificial tissues by integrating stem/progenitor cells in natural scaffolds. Adipose tissue, which can be obtained after lipoaspiration, has a high poteintial in repairing and healing of soft tissue defects via its rich content of adipose mesenchymal stem cell (AD-MS C)/progenitor cell populations. Every year, milions of lipoaspirations and adipose tissue resections for cosmetic purposes are performed worldwide. Effective cryopreservation of these tissues can be very important natural autologus tissue sources for tissue engineering aplications other than soft tissue defects or reconstructive surgery applications.

Successful cryopreservation of adipose tissue, which is mostly obtained during lipoaspiration procedures with the aim of using in the near future, and effective warming and transplanting it into the defective site when needed has often been applied in soft tissue engineering and plastic/reconstructive surgery. Although cryopreservation of fat tissue have long been a preferred approach in several clinics undergoing liposuction procedures, problems associated with their clinical use after warming (low cellular viability upon warming, high reabsorption rates on recipient sites etc.) have not been fully resolved. There is still a lack of successful and efficient adipose tissue/AD-MSC cryopreservation protocol in the world. Moreover, the number of studies on the ability and effectiveness of cryopreserved adipose tissue or AD-MSCs in repairing a defect in the required site are scarce and the results are conflicting.

Based on current knowledge, our aim in this study is, to analyze the structural and functional integrity of human adipose tissues and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells during conventional cryopreservation procedures, to investigate the potential role of vitrification regimes and approaches in solving current problems associated with adipose tissue/ stem cell cryopreservation, and by optimizing the human adipose tissue and adipose tissue-derived mesenchymal stem cell cryopreservation protocols, to establish a tissue and cell cryobank that is suitable or compatible for clinical use.

In accordance with the objectives set our study, 10 different tissue samples that were obtained from different donors after lipoaspiration (n=8) and surgical excision (n=2) were used in the study. In 6 of these samples, enzymatic dissociation method was used in order to isolate mesenchymal stem cells. At this stage, magnetic-based cell separation technique was also applied. Stem cell properties of these freshly isolated cells were measured by in vitro culture and morphological analysis, flow cytometry (CD90, CD105, CD29, CD34, CD45) and in vitro expansion/differentiation tests. For tissue and cell cryopreservation, staged slow freezing (10% DMSO; 10% DMSO+0.2M sucrose; 0.5M sucrose) and vitrification (15% DMSO+15% Ethylene glycol+0.5M sucrose; 30% DMSO+30% ethylene glycol+0.5M sucrose) techniques that consists of DMSO, ethylene glycol (EG) and sucrose in different concentrations and cocktails were used. Upon warming, tissue integrity was measured by immunohistochemistry and structural and functional integrity of cells were measured by trypan blue dye exclusion test, TUNEL test for DNA fragmentation and in vitro differentiation. Cryopreserved cells and cells that were isolated upon warming of tissues were also investigated according to their in vitro morphologies and in vitro expansion characteristics. Quantitative data obtained during these investigations were evaluated by SPSS 10.0 for windows software programme and the p value of <0.05 was taken as statistically significant.

According to the study plan, the experiment had been performed in three parts. In the first phase of the study, cell isolation by enzymatic dissociation method was performed on 6 of the tissue samples (4 samples after lipoaspiration and 2 samples after surgical excision). Their stem cell properties were confirmed by their in vitro culture behaviours, morphologies, results of flow cytometry analysis and in vitro differentiation tests that shown their potential of differentiating in a variety of different mesodermal cells. In the second phase of the study, by using the cells that were isolated and characterized in the previous phase, cytotoxic or genotoxic effects of different

cryoprotectant concentrations (1% - 30%), different combinations and different incubation durations (10 -40 minutes) of DMSO and ethylene glycol were investigated. In the presence of 10% and higher concentrations of DMSO and EG and upon more than 20 minutes of incubation durations significant decrease in cellular survival was observed ($p<0.05$). On the other hand, simultaneous analysis of DNA fragmentation on the same cell populations did not show any statistically significant increase. In the third phase of the study, adipose tissue samples obtained ($n=4$) and adipose tissue-derived stem cells ($n=4$) were cryopreserved by conventional slow freezing and vitrification techniques. In both cryopreservation groups, samples were subgrouped according to different incubation durations as well as different storage temperatures. In the cellular-level cryopreservation experiments, the groups of 10% DMSO and 10% DMSO+0.2M sucrose in the conventional slow freezing arm and VS1 and VS2 in the vitrification arm shown significantly higher viability compared to control groups (80.2%, 88.9%, 85.4% and 68.2% vs. 12.2% respectively; $p<0.01$). In the tissue-level cryopreservation experiments, significantly higher cellular survival values were observed in VS1 and VS2 vitrification groups as compared to 10% DMSO and 10%DMSO+0.2M sucrose groups in the conventional slow freezing arm and controls (90.2%, 82.0% vs. 50.0%, 62,8% and 10.2% respectively). It was observed that, samples that were cryopreserved and stored at +4°C and -20°C in the conventional slow freezing group did not show any signs of viability after long term storage conditions. In groups showing comparable survival rates upon warming in both cellular and tissue-level experiments, no significant differences were observed in in vitro expansion and in vitro differentiation results.

As a result, in this study, both the conventional staged slow freezing protocols and, to our knowledge for the first time in the literature, vitrification protocols were simultaneously investigated for their effectivity on human adipose tissue and adipose tissue-derived mesenchymal stem cell cryopreservation. Our results have shown that, both the high concentration and longer incubation periods of cryoprotectants negatively and dramatically affect the survival and functions of the adipose tissue as well as mesenchymal stem cells in the same tissue. The results also confirmed that, in order to set up a clinically acceptable cryopreservation programme, one needs to optimize the cellular and tissue-level cryopreservation programmes separately. In addition to the above results, our data also clarified and confirmed that conventional storage temperatures (4°C and -20°C) are clearly ineffective in storing the functionality of the tissue and the cells.

In conclusion, this study showed that, staged slow freezing is the most optimal route for cryopreservation of AD-MSCs whereas vitrification protocol is the most convenient for cryopreservation of adipose tissues. Based on this information, simultaneous cryopreservation of adipose tissue and AD-MSCs has been developed and optimized for future use. The findings of this study also helped us to generate a tissue and a mesenchymal stem cell cryobank from the donated materials. Therefore the results obtained in this study can be considered as a valuable source for experimental, preclinical or clinical studies that can potentially be involved in stem cells and tissue engineering.

Keywords: Adipose tissue, AD-MSC, Soft tissue engineering, Cryopreservation, Slow freezing, Vitrification.

1.1 Literatür Özeti

Yumuşak doku, vücut genelinde organları ve yapıları çevreleyen, bağlayan ve koruyan dokudur. Günlük hayatta beklenmeyen şekilde karşılaşılan akut ve kronik yaralanmalar, tümör teşhisi nedeni ile cerrahi olarak organ/dokunun çıkarılması ve radyoterapi gibi nedenler ile yumuşak dokularda hasar meydana gelebilmekte, bu hasarlar da gerek insan sağlığı gerekse dokunun bulunduğu bölgedeki yapısal/fonksiyonel görevleri açısından ciddi problemler oluşturmaktadır. Amerikan Plastik Cerrahlar Derneği verilerine göre, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 2012 yılı içerisinde yaklaşık 300.000 civarında yumuşak doku defekti tamiri amacı ile meme (mastektomi sonrası), baş ve yüz cerrahi işlem gerçekleştirilmiştir¹ ve bu rakam her yıl artmaktadır.

Doğal ortamda vücudun adı geçen doku hasarına ilk tepkisi fizyolojik hasar tamiri mekanizmalarının devreye girmesidir. Bununla birlikte doğal doku tamiri mekanizmalarının her zaman yeterli ve etkin bir doku restorasyon süreci oluşturmamaları ve hatta bazen iyileşme ve dokunun yeniden yapılanma sürecinin daha ciddi yan etkiler oluşabilmesinden dolayı alternatif doku tamir yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır [1].

Yumuşak doku hasarlarının tamirinde günümüzde en sık tercih edilen yaklaşımlar, hasarlı dokunun flap yöntemi ile cerrahi olarak tamiri ile biyolojik (kolajen, hidroksiapetit, hiyaluronik asit vb.) veya sentetik (Polilaktik asit, poliglisik asit vb.)

¹ www.plasticsurgery.org

olarak üretilmiş greftler kullanılarak tamir edilmesi ve otolog adipoz doku nakli yaklaşımlarıdır. Otolog doku flap yöntemi doğal bir doku yapılanması sağlasa da her hasarlı bölge için uygulanabilir olmayıp oldukça invaziv bir işlemdir [2]. Ayrıca alıcı bölgede ciddi morbidite oluşturmaktadır. Otolog doku flap yöntemine alternatif olarak kullanılan greftler/implantlar ise uzun süreli yer-değiştirme, doku dışına çıkabilme, ve nakledilen implant çevresinde kapsüler yapıların oluşması gibi ciddi farklı problemler oluşturabilmektedir [3].

Otolog adipoz doku nakli, kolajen, hidroksiapetit veya hiyoluronik asit gibi yapay doku maddelerine kıyasla ucuz, kolay elde edilebilir ve alerjenik olmayışı gibi özelliklerinden dolayı hem rekonstrüktif hem de estetik cerrahide sıklıkla uygulanan bir yöntemdir [4]. Tarihte ilk otolog adipoz doku nakli Neuber tarafından 1893 yılında gerçekleştirilmiştir [5]. Takip eden dönemde göğüs (toraks) cerrahisi, ortopedik cerrahi, abdominal cerrahi, nöroşirürji ve meme cerrahisi alanlarında otolog yağ nakillerinden faydalanılmıştır. Otolog adipoz doku nakli, lipoaspirasyon metodu klinik pratiğe girdikten sonra ise 1980'li yıllarda oldukça popülerlik kazanmıştır [6], [7]. Fournier tarafından "mikrolipoenjeksiyon" olarak da adlandırılan ve dokunun şırınga yardımı ile alınıp nakledildiği basit bir işlem olarak tanımlanması sonrasında bu tekniğin daha da geliştirilerek uygulandığı pek çok yeni yaklaşım ve tedavi şekli ortaya çıkmıştır [7].

Otolog olarak nakledilen adipoz dokunun doku tamirinde sağladığı pek çok avantaj yanında nakledilen bölgede kalış süresi ve yarı akışkan bir haldeki dokunun nakil sonrası canlılığının ne kadarını koruduğu sorusu halen tartışmalıdır. Cerrahi uygulama sonrası gerçekleştirilen düzenli takiplerde, nakledilen yağ dokusunun olgudan olguya değişen bir şekilde önemli oranda geri emildiği gözlenmiştir [4]. Elde edilen değişken geri emilme sonuçları neticesinde pek çok uygulamada ardışık yağ transplantasyonlarına gerek duyulmaktadır. Bu durum da hastaya hem maddi hem de manevi olarak zorluk oluşturmaktadır [8].

Dünya üzerinde gerek lipoaspirasyon gerekse otolog yağ enjeksiyonu uygulamaları konusunda anatomik ve uygulama yönünden iyileştirmeler yapılabilmesi amacı ile halen pek çok klinik araştırma gerçekleştirilmektedir. Mevcut uygulamaların daha etkin ve verimli hale gelebilmesi için, yağ hücrelerinin vücuttan alınması sırasındaki

canlılık düzeyleri, işlem sırasında uygulanan anestezinin rolü/etkisi, doku aspirasyonu ve naklinde kullanılan şırınga ve kanüllerin çapları ve farklı çaptaki malzemelerin işlem sonuçlarına etkisi, nakledilen dokudaki mevcut kan ve kan hücre miktarları ile dokunun dış ortam ile (atmosferik oksijen ve patolojik mikroorganizmalar) temasının olup olmadığı gibi soruların araştırılması, bu amaçla çok sayıda çalışma yapılması gerekmektedir [5], [9] [10].

Otolog olarak nakledilen adipoz doku, işlem sırasında eşzamanlı olarak alınıp nakledildiği gibi, daha önceki bir tarihte gerçekleştirilen lipoaspirasyon işlemi sırasında alınmış ve klinik kullanıma uygun olduğu düşünülen şartlarda (kısa veya uzun sürelerde) saklanan yağ dokuları kullanılarak da gerçekleştirilebilmektedir. Lipoaspirasyon veya farklı amaçla gerçekleştirilen cerrahi işlemler sırasında elde edilen lipoaspiratların/adipoz dokuların tekrarlanabilir ve verimli bir şekilde kriyoprezervasyonu, saklanması ve gerektiğinde (örneğin yumuşak doku yaralanmaları veya kozmetik ihtiyacın ortaya çıkması) çözülerek klinikte etkin olarak kullanılabilmesi son derece önemlidir. Bu şekilde dondurularak saklanabilen otolog adipoz dokusu, ileri bir tarihte ihtiyaç duyulduğunda tekrar bir cerrahi operasyona gerek kalmaksızın çözülerek adı geçen yumuşak doku defektlerinin tamirinde veya kozmetik cerrahi uygulamalarında tedavi amaçlı kullanılabilir ve hasta açısından finansal, medikal ve ruhsal açıdan önemli avantajlar sağlayabilir. Uluslararası Plastik Cerrahi Derneği tarafından yayınlanan 2011 yılına ait istatistiklere göre dünya genelinde en sık gerçekleştirilen rekonstrüktif/kozmetik cerrahi operasyonlar arasında lipoaspirasyon %20'lik bir oran ile başı çekmektedir ¹. Bu oranda gerçekleştirilen bir işlem hacmi göz önüne alındığında, lipoaspirasyon sırasında alınan otolog yağ dokularının (veya hücrelerinin) etkin olarak kriyobankalarda saklanabilmesi ve ihtiyaç halinde kullanılabilmesinin doku mühendisliği ve klinik tedavilerde önemli ölçüde tıbbi ve ekonomik avantaj yaratacağı aşikardır. Özellikle son 15 yıldır bazı araştırmacılar adipoz dokunun bu amaçlar doğrultusunda farklı yöntemler kullanılarak kriyoprezervasyonu ve dokunun çözme sonrasındaki yapısal ve fonksiyonel etkinliğini incelemektedir. Bununla birlikte, lipoaspirasyon işlemi sonrası alınarak birbirinden çok farklı metodlarla ve şekilde

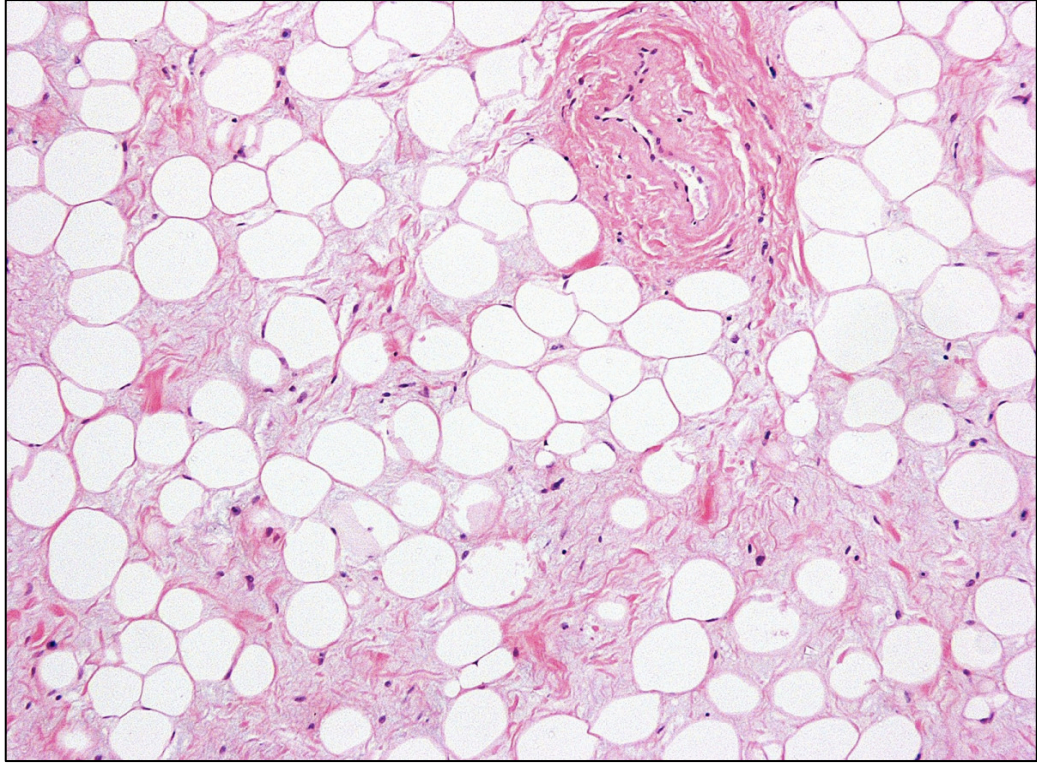
¹ <http://www.isaps.org/Media/Default/global-statistics/ISAPS-Results-Procedures-2011.pdf>

saklanan dokuların işlem sırasında ve sonrasındaki biyolojik özellikleri ve nakil öncesi/sonrası biyolojik/klinik etkinlikleri konusunda halen dünya genelinde standardize edilebilmiş etkin bir yöntem mevcut değildir. Dahası, günümüze kadar gerçekleştirilen sınırlı sayıdaki çalışma birbirine zıt veya farklı sonuçlar vermiştir [11].

Adipoz doku, yapısında olgun adiposit, öncül adiposit (preadiposit), fibroblast, vasküler düz kas hücresi, endotel hücre, monosit/makrofaj ve lenfosit hücreleri gibi pek çok farklı hücre içeren bir dokudur [12]. Doku yüksek oranda preadipositlerden ve olgunlaşmış lipid damlacıkları içeren adiposit hücrelerinden oluşur (Şekil 1.1). Adipositler dışında kalan heterojen hücre grubu stromal-vasküler fraksiyon (SVF) olarak adlandırılır. Dokunun temel fonksiyonu metabolizma için gerekli enerjinin lipid formatında depolanmasını sağlamak ve vücut sıcaklığını dış ortamdan izole etmektir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda adipoz dokunun ayrıca pek çok farklı hormonun (leptin, estrogen, resistin, TNF α vb.) üretildiği bir endokrin organ olarak görev aldığı da ortaya konmuştur [13].

Vücut dahilinde beyaz adipoz doku ve kahverengi adipoz doku olmak üzere iki farklı adipoz doku mevcuttur. Beyaz adipoz doku (BAD) sarı-beyaz renkte, farklı büyüklükte (20-200 μ m) ağsı bir yapıya sahiptir. Kanlanması kahverengi dokuya göre daha azdır. Özel boyalar yardımı ile bakıldığında adipoz dokunun fibroblast, immün hücreler, retiküler lifler ve miyelinsiz sinir lifleri içeren bir doku olduğu görülür. BAD sağlıklı erkeklerin vücut ağırlığının %15-20'sini kadınlarınsa %20-25'ini oluşturur. BAD'ın %70-90'ı yağ, % 10-30'u su geri kalanı proteindir. Kahverengi adipoz doku (KAD) ilk olarak İsviçreli bilimadamı Conrad Gessner tarafından tanımlanmıştır [14]. Sıklıkla yenidoğanlarda bulunur ve BAD'ye kıyasla doku içi kanlanma daha fazladır, dokuyu oluşturan adipositler daha küçüktür. KAD ayrıca sempatik sinir sistemine sahiptir ve termogenin adlı uncoupling protein aracılığı ile proton gradiyentini bozarak ısı üretilmesinde rolü vardır. Yetişkin bir bireyde adipoz doku deri altında (subkutan), iç organların çevresinde (viseral), kemik iliğinde (sarı kemik iliği) ve meme dokusunda bulunur. Viseral adipoz doku aynı zamanda karın içi yağ dokusu olarak da adlandırılır.

1.



Şekil 1.1 Adipoz doku

1970’li yılların başında bir sovyet bilim adamı olan Dr. Alexander Friedenstein, kemik iliğinde yer alan bir grup hücrenin kemik ve kıkırdak hücrelerine dönüşebildiğini gözlemlemiştir [15]. Bu hücreler morfolojik olarak fibroblast görünümünde olan, düşük yoğunlukta (low density) kültür kaplarına ekimleri sonrası klonal bir hücre gelişimi gösteren hücreler olarak tanımlanmıştır ve mezoderm-kaynaklı farklı hücre tiplerine dönüşme özelliklerine dayanarak “Mezenkimal kök hücre (MKH)” olarak adlandırılmışlardır [16]. Gerek kök hücre olma özellikleri, gerekse uzun süreli kendi kendilerini yenileme potansiyelleri henüz tam olarak netleşmediğinden, bu hücreler genel olarak multipotent mezenkimal kök hücreler olarak da adlandırılırlar. Günümüzde MKH, in vivo olarak kemik iliğinde bulunan ve kemik iliğinden elde edilmiş kültürde büyütülen hücrelere verilen genel addır (Kemik İliği-Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (KİK-MKH). Ayrıca bu hücreler mevcut durumları itibariyle progenitör hücrelerden matür stromal hücrelere kadar geniş bir yelpazedeki pek çok farklı aşamadaki hücreleri kapsamaktadır.

Kemik, kıkırdak, kas gibi değişik hücre tipine dönüşüm potansiyellerinin yanında MKH’ler ürettikleri pek çok farklı büyüme faktörü ve sitokinler nedeni ile ayrıca immün-baskılayıcı ve trofik etki potansiyeline de sahiptirler [13], [17]. Bu özellikleri

neticesinde 1990'lı yılların ortalarından itibaren hücre-tabanlı klinik tedavilerde kullanılabilirlikleri konusunda pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir [18]. Gerçekleştirilen çalışmalar ayrıca MKH'lerin insanda ve memelilerde kemik iliği dışında kordon kanı da dahil olmak üzere (Kordon Kanı-Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre; KKK-MKH) pek çok organ ve dokuda varolduğunu göstermiştir [19], [20]. 2001 yılında Zuk ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada adipoz dokunun da MKH özelliği gösteren kök hücreler içerdiği (ADK-MKH) ilk kez gösterilmiş, sonrasında gerçekleştirilen pek çok farklı araştırmada lipoaspirat volümünün çok düşük bir miktarını oluşturmalarına rağmen (<%1), bu hücrelerin adipoz doku içerisindeki yoğunluğunun kemik iliğindeki MKH yoğunluğuna kıyasla 100 kat fazla olduğu bildirilmiştir [21], [22], [18], [23]. Diğer taraftan De Ugarte ve arkadaşları, aynı donörden elde edilen KİK-MKH ve ADK-MKH'leri karşılaştırmışlar ve her iki kaynaktan elde edilen hücrelerin büyüme kinetikleri, hücre senesansı, farklı hücre tiplerine dönüşme ve gen nakli uygulamalarındaki transdüksiyon potansiyellerinin anlamlı olarak farklılık göstermediğini bildirmişlerdir [24]. Bu bulgular, ADK-MKH hücrelerinin doku içerisindeki yoğunlukları ve elde edilebilirlikleri yönünden KİK-MKH hücrelerine göre ciddi bir avantaj sağlayabildiklerini, gelişim ve farklılaşma potansiyelleri bakımından ise benzer olduklarını göstermektedir. Bilimsel olarak ilk tanımlandıkları 2001 yılından günümüze kadar geçen süreçte ADK-MKH'ler ile laboratuvar ortamında ve klinikte pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir ve bu çalışmaların neticesinde ortaya çıkan sonuçlar özellikle adipoz doku ve adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin doku mühendisliği uygulamalarındaki gerek araştırma gerekse klinik amaçlı yüksek kullanım potansiyellerini ortaya koymaktadır [18], [25], [26], [27].

Rekonstrüktif ve rejeneratif tıptaki bu avantajlı konumları itibariyle ADK-MKH'lerin de, aynı adipoz dokuda olduğu gibi gelecekte pek çok farklı kullanım amaçlı kriyoprezervasyonu, saklanması ve gerektiğinde çözülerek doğrudan hücre olarak veya doğal/sentetik doku iskeletleri ile birlikte veya doku mühendisliğinde ya da tedavide kullanımı belirli bir süredir gündemdedir. Çalışmalar, adipoz dokuya kıyasla MKH'lerin kriyoprezervasyonunun çok daha kolay ve çözme sonrası etkinliğinin ve in vitro farklılaşma (IVD) potansiyellerinin yüksek olduğunu belirtse de, mevcut çalışmaların bazılarında elde edilen farklı sonuçlar ve çözme sonrası gözlenebilen

canlılık ve fonksiyon değişiklikleri bu konuda da daha fazla çalışma yapma gereğini ortaya koymaktadır [28], [29], [30], [31].

Greft olarak kullanılan otolog yağ dokusunun ayrıca yaşlanmayı engelleyici ve yarayı tamir edici etkilerinin olduğu farklı araştırmalarda gösterilmiştir [32], [33], [34]. Dokunun bu ve benzer pek çok olumlu özelliğinin/sonuçlarının altında özellikle son yıllarda artan sayıda çalışmada, nakledilen doku ile içerdiği kök/progenitor hücrelerin alıcı ortam ile olan etkileşimlerinin, bulundukları “mikroçevre”nin uygunluğunun yattığı vurgulanmaktadır [35]. Kök hücrede mikroçevre, diğer bir tanım ile “Niş” kavramı ilk olarak 1978 yılında Schofield tarafından hematopoietik kök hücre çalışmaları sonrası ortaya atılmıştır ve günümüzde çalışmalar kök hücrelerin özelliklerinin uzun süreli korunabilmesinde ve nakilleri sonrasında gerekli hücreyel farklılaşmanın ve fonksiyonel etkinliğin sağlanmasında bulundukları mikroçevrenin son derece önemli olduğunu belirtmektedir [36], [37]. Alınan olumlu sonuçlara ve tekniğin her geçen gün dünya genelinde artan sayıda cerrah tarafından tercih edilmesine rağmen, otolog adipoz doku transplantasyonlarında karşılaşılan önceden öngörülemeyen oranlarda geri emilme ve diğer yan etkileri [38] azaltabilmek amaçlı olarak Yoshimura ve arkadaşları, adı geçen problemleri büyük miktarlarda nakledilen iskemik yağ dokusu genelinde oluşan vaskülarizasyon eksikliği ve alıcı bölgenin gerekli bu vaskülarizasyonu sağlayamamasından dolayı nakledilen doku genelinde nekrozun tetiklenmesine bağlamışlardır. Aynı araştırmacılar, “Hücre yardımcı lipotransfer” (HYL) olarak adlandırdıkları metodu geliştirerek yüz ve göğüs bölgesinde gerçekleştirilen estetik/kozmetik operasyonlarda başarı ile uygulamışlardır [39], [40].

Bu ve benzer sonuçlar, otolog adipoz dokuların tek başına bir dolgu malzemesi olarak değil, aynı zamanda hücreyel zenginleştirme (cell enrichment) uygulanması ile kombine kullanımının yumuşak doku tamiri uygulamalarında ciddi bir başarı sağladığını göstermektedir. Halen kesin mekanizmalar bilinmemesine rağmen, adı geçen başarılı sonuçlarda ADK-MKH hücrelerinin pro-anjiyogenik, anti-apoptotik ve pro-adipojenik etkilerinin önemli ölçüde rol oynadığı düşünülmektedir [41].

HYL uygulamaları sonrası gözlemlenen olumlu sonuçlar, sadece doku veya hücre olarak kullanımlarının yanında, adipoz doku ve progenitor hücrelerin birlikte kullanıldığı doku mühendisliği veya rekonstrüktif cerrahi uygulamalarının da yakın

gelecekte pek çok farklı yumuşak doku defekti tamirinde etkin olarak kullanılabileceğini göstermektedir [42]. Bununla birlikte gerek doku, gerekse ADK-MKH ile gerçekleştirilen sınırlı sayıda ve farklı sonuçların alındığı araştırmalar, bu konuda çok daha kapsamlı çalışmaların yapılması gereksinimini doğurmuştur.

Vitrifikasyon, yüksek kriyoprotektan konsantrasyonları ve soğutma hızları kullanarak dondurulacak doku veya hücrede bulunan su moleküllerinin kristalleşmesine imkan vermeden camsılaştırılması yöntemidir. Yöntem uzun yıllardır deney ve çiftlik hayvanlarında başarı ile kullanılmaktadır. Son yıllarda özellikle insan üreme sistemine ait doku ve hücreleri ile gerçekleştirilen başarılı uygulamalar sonrasında artan oranda araştırmacı tarafından tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir [43], [44], [45], [46]. Mevcut literatürde, son yıllarda vitrifikasyon tekniği ile pek çok farklı doku ve hücre sisteminin etkin ve verimli kriyoprezervasyonu sağlandığı bildirilmektedir [47], [48], [49], [50]. Bununla birlikte literatürde henüz insan adipoz dokusu veya içerdiği ADK-MKH'lerin vitrifikasyon tekniği kullanılarak kriyoprezervasyonu ile ilgili bir deneysel, klinik öncesi veya klinik bir çalışma mevcut değildir.

Güncel literatür incelendiğinde, adipoz dokunun yumuşak doku defektlerinin tamirinde otolog olarak kullanım potansiyelinin yüksek olduğu, bununla birlikte dokunun ve içerdiği kök hücrelerin ileri bir tarihte adı geçen defektlerin tamirinde otolog olarak kullanılabilmesi için etkin ve verimli bir kriyoprezervasyon yaklaşımına ihtiyaç olduğu görülmektedir. Mevcut literatürdeki bazı çalışmalarda adipoz doku ve içerdiği kök hücrelerin farklı saklama koşulları ve yöntemleri kullanılarak etkinliği incelenmiş olsa da, çalışma sayısının ve kullanılan örnek sayısının azlığı, saklama sürelerinin çok kısa oluşu ve birbirine zıt sonuçların elde edilmiş olması ve halen dünya genelinde bu konuda etkin ve verimli bir protokolün var olmayışı mevcut çalışmanın gerçekleştirilmesi gereğini doğurmuştur.

1.2 Tezin Amacı

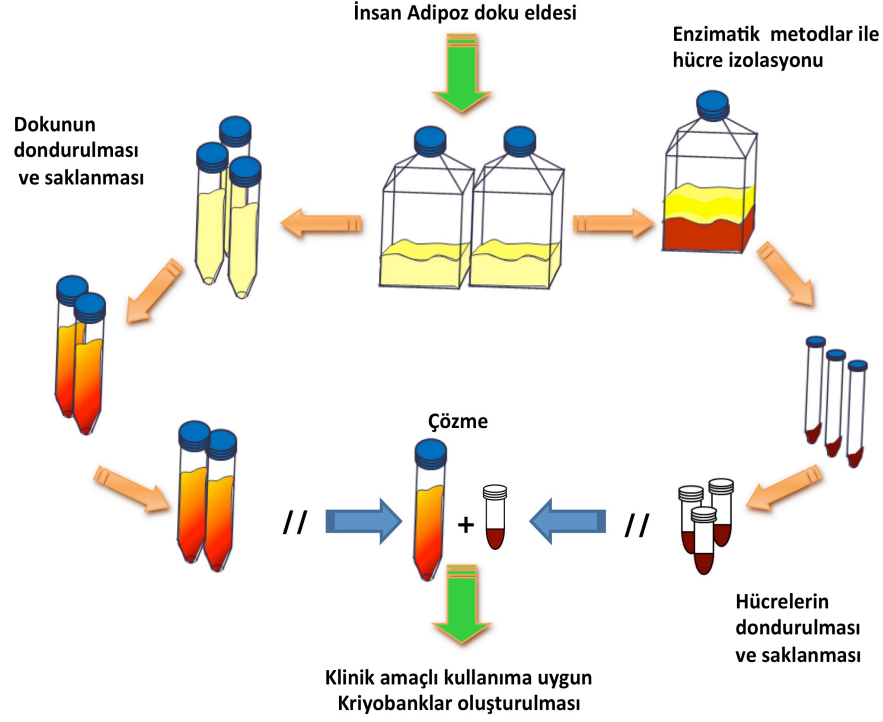
Bu çalışmanın amacı, yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere insan adipoz dokusu ve aynı dokudan elde edilen insan ADK-MKH'lerin,

- Mevcut konvansiyonel yöntemler ile kriyoprezervasyonundaki yapısal ve fonksiyonel düzeydeki etkinliklerinin belirlenmesi,

- Adipoz doku ve ADK-MKH'lerin kriyoprezervasyonu ile ilgili mevcut problemlerin giderilmesinde ilk kez vitrifikasyon metodu ile kriyoprezervasyon rejimlerinin ve yaklaşımlarının etkinliğinin incelenmesi,
- Elde edilen verilere dayanarak insan adipoz dokusu ve içerdği ADK-MKH'lerin kriyoprezervasyon protokollerinin optimize edilmesi ile klinik kullanıma uygun doku ve hücre saklama amaçlı kriyobank oluşturulmasıdır.

1.3 Hipotez

Yumuşak doku mühendisliğinde ve yakın gelecekte gerçekleştirilebilecek klinik uygulamalarda etkin bir kriyobank oluşturmak amacıyla, çalışma dahilinde donörlerden elde edilen adipoz doku ve ADK-MKH'ler ile gerçekleştirilen kriyoprezervasyon ve çözme uygulamalarının, niş temellerini göz önüne alarak doku ve hücre boyutunda ayrı ayrı optimize edilmesi ve doku ile kök hücrelerin birlikte işlenebildiği kombine bir kriyoprezervasyon protokolü oluşturulabilmesi çalışmanın temel hedef ve hipotezidir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Çalışmanın hipotezi

Bu hipotez dahilinde ve amaca ulaşmak için aşağıdaki hedefler belirlenmiştir:

- Araştırma amaçlı bağışlanmış insan adipoz dokularından farklı izolasyon yöntemleri (lipoaspirasyon ve cerrahi eksizyon) ile kök hücre elde edilmesi ve hücre izolasyon yöntemlerin (enzimatik ayrıştırma ve/veya manyetik hücre ayrıştırma) verimliliğinin karşılaştırılması,
- İzole edilen hücrelerinin standart ve mikrokapiler kültür metodu (MKM) ile in vitro ekspansiyonu,
- Elde edilen hücrelerin, uluslararası belirlenmiş kriterlere göre mezenkimal kök hücre olma özelliklerinin ileri hücre kültürü, akış sitometresi ve in vitro farklılaştırma sonrası immünositokimya testleri ile tanımlanmaları,
- Tanımlanmış insan ADK-MKH'lerin, mevcut kriyoprezervasyon protokolleri kapsamında farklı kriyoprotektanlar ile inkübasyonu sonrasında, ortamdaki

toksisiteye ve kriyohasarlara karşı gösterdikleri tepki ve dayanıklılıklarının, tripan mavisi boya dışlama testi, TUNEL testi ile ve morfolojik olarak incelenmesi,

- İnsan ADK-MKH'lerin konvansiyonel kriyoprezervasyon teknikleri ve vitrifikasyon tekniği ile paralel olarak kriyoprezervasyonu,
- Çözme sonrası hücrelerin farklı metodlar ile canlılık, morfolojik, in vitro ekspansiyon ve in vitro farklılaşma potansiyelleri yönünden incelenmesi,
 - Tripan mavisi boya dışlama testi,
 - Faz-kontrast mikroskop altında hücre gelişimi ve morfolojisinin tayini,
 - In vitro farklılaşma potansiyellerinin Alsiyan mavisi, Oil red O ve alkalın fosfataz testleri kullanılarak immünositokimyasal analizi
- İnsan adipoz dokularının farklı kriyoprotektan kokteylleri ve konsantrasyonları kullanılarak konvansiyonel ve vitrifikasyon teknikleri ile paralel olarak kriyoprezervasyonu,
- Dokuların deney planına göre farklı zamanlarda çözülerek immünohistokimyasal olarak incelenmesi,
- Aynı dokulardan enzimatik metodla hücre izolasyonu yapılması,
- Elde edilen hücrelerin,
 - Yapısal bütünlükleri, hücre morfolojileri ve viabilite yönünden incelenmesi,
 - In vitro ekspansiyon özelliklerinin incelenmesi,
 - In vitro farklılaşma potansiyellerinin Alsiyan mavisi, Oil red O ve alkalın fosfataz testleri kullanılarak immünositokimyasal analizi
- Hücre ve doku düzeyinde elde edilen verilere göre en uygun ve etkin adipoz doku ve ADK-MKH kriyoprezervasyon protokolünün belirlenmesi.
- Oluşturulan optimize protokoller kullanılarak doku ve kök hücre kriyobankı oluşturulması.

GENEL BİLGİLER

2.1 Adipoz Doku Mühendisliği

Adipoz doku patolojileri ve defektleri, kazalar, ciddi ve derin yanıklar, tümörlü bir dokunun çıkarılması sonrası meydana gelen doku çevresi hasarlar (küçük bir kesiden meme kanseri tanısı sonrası gerçekleştirilen mastektomi operasyonuna kadar geniş bir yelpazede), beklenmeyen bir travma veya konjenital anomaliler (örn. lipodistrofiler) nedeni ile hastaları sadece kozmetik olarak rahatsız etmekle kalmayıp aynı zamanda fonksiyonel yetmezliklere de neden olabilmektedirler¹. Bu durumlarda dokunun mümkün olan en kısa süre içinde ve etkin bir şekilde tamiri klinik açıdan büyük önem taşımaktadır [51]. Adipoz doku mühendisliği, yumuşak doku defektleri ve problemlerin düzeltilmesinde, rejenerasyonu tetiklemek ve kaybolan fonksiyonun geri kazanımını sağlamak amacıyla, mühendislik metodlarının yaşam bilimleri içerisinde uygulamaları ile birlikte kullanımı neticesinde ortaya çıkan bir çalışma alanıdır. İdeal bir doku mühendisliği uygulamasında, doku iskeleti, uygun hücre kaynağı ve dokunun yeniden modellenmesi için gerekli farklılaşma sinyallerinin sağlandığı uygun bir mikroçevreye ihtiyaç vardır.

Adipoz dokunun fonksiyonel olarak yapılandırılabilmesi sürecinde doku iskeletinin mikrovasküler ve ekstraselüler matriks (ESM) yapısı büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla doğal veya sentetik kaynaklı pek çok biyomateryalin adipoz doku mühendisliğinde iskelet olarak kullanımı gündemdedir. Bu materyallerden bazıları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

¹ www.plasticsurgery.org

Sentetik polimerlerin en büyük avantajı, kullanılması planlanan polimerin doku için gerekli ihtiyaca uygun olarak mekanik, kimyasal ve biyoçözünürlük özelliklerinin düzenlenebilir oluşudur [52]. Yumuşak doku uygulamalarında bu amaçla en yaygın kullanılan sentetik polimerler Polilaktik asit (PLA), Poliglikolik asit (PGA), Polietilen glikol (PEG) ve Polilaktik-ko-glikolik asittir (PLGA) [10]. PLA ve PGA, adipoz doku mühendisliğinde, moleküler yapılarının değiştirilerek çözünürlüklerinin düzenlenebilmesi gibi fizikokimyasal özellikleri sayesinde in vitro ve in vivo olarak üç boyutlu iskelet sistemleri veya greftlerin üretiminde kullanılmaktadırlar [53]. PLGA ise bazı hayvan çalışmalarında büyüme faktörlerinin neovaskülarizasyon etkilerinin incelendiği sistemlerde doku iskeleti dahilinde bir kopolimer olarak kullanılmıştır. Ayrıca PLGA, matrikste hücre bölünmesi ve farklılaşmayı tetikleyen büyüme faktörlerinin (örn. β FGF) kontrollü salınımlarına da imkan veren bir biyomateryal olarak da kullanılmaktadır [54]. Adipoz doku mühendisliğinde kullanımı konusunda çalışmalar gerçekleştirilen ve ümit verici bulunan diğer sentetik biyomateryaller polietilen tereftalat, polipropilen ve bazı silikon tabanlı yapılardır [55], [56].

Çizelge 2.1 Adipoz doku mühendisliğinde kullanılan çeşitli biyomateryaller

Kaynak	Biyomateryaller
Sentetik	Polilaktik asit, Poliglikolik asit, Polietilen glikol, Polilaktik-ko-glikolik asit, Polietilen tereftalat, Polipropilen
Doğal	Kolajen, İpek, Adipoz-kaynaklı ESM, plasental deselülerize matriks, PDM-çapraz bağlı hyaluronan, Omenta, Fibrin, Jelatin, Hyaluronan, Matrijel, Miyojel

Doğal polimerlerin, mekanik ve biyolojik özellikleri, biyouyumlu olmaları ve normal şartlarda doğal ESM'nin de komponentleri olmaları sebebi ile adipoz doku mühendisliğinde kullanımları uzun yıllardır gündemdedir. Doğal polimerler arasında kolajen, biyobozunurluk ve düşük antijenisite gibi özelliklerinden dolayı günümüzde kullanım yaygınlığı bakımından başı çekmektedir. Kolajen ayrıca pek çok farklı formda (3-boyutlu jel, elyaf, iskele, süngerimsi, mikrokapsül vb.) da kullanılabilir.

Vashi ve arkadaşlarının yakın bir zaman önce gerçekleştirdikleri bir çalışmada, içerisine FGF-2 büyüme faktörü yerleştirilmiş jelatin kapsülleri içeren kolajen hidrojellerin in vivo şartlarda içerisine hücre eklenmeksizin vaskülarize adipoz dokunun gelişimini hızlandırdığı gösterilmiştir [57]. Kolajen sonuçlarına benzer şekilde doğal polimer olarak jelatin seçilerek gerçekleştirilen çalışmalarda da, özellikle polimer içerisinde taşıyıp salınım yapılabilen büyüme faktörleri (örn. β FGF) sayesinde adipojenезin arttığı bildirilmektedir [58], [59]. Hiyoliranik asit-tabanlı biyomateryaller doku mühendisliği uygulamalarında özellikle deri, kırık ve kemik dokusu onarımı için değerlendirilmekte olsalar da çalışmalar preadipositlerin de belirli bir oranda hiyluronik asit-tabanlı doku iskeletlerine tutunabildiklerini göstermektedir [60]. Bu implantların timusu alınmış farelere nakli sonrasında nakil bölgesindeki preadiposit hücreleri üzerindeki farklılaşma etkisi neticesinde en azından hayvan modellerinde etkin olabildikleri bilinmektedir [61]. Polimer olarak Matrijelin kullanıldığı çalışmalarda in vitro şartlarda ümit verici sonuçlar alınmış olsa da, polimerin fare sarkom hücreleri tarafından üretiliyor oluşu nedeni ile (hayvan-kaynaklı ve tümör hücrelerinin ürettiği bir madde olması) klinik olarak kullanımı sınırlıdır ve adipoz doku mühendisliği açısından başarısı bilinmemektedir [62]. Son yıllarda matrijel'e alternatif olarak kas dokusu-kaynaklı Miyojel ile gerçekleştirilen çalışmalarda, polimerin in vitro ve in vivo şartlarda preadiposit farklılaşmasının ve vaskülarize adipoz dokusu formasyonunu arttırdığı gösterilmiş olsa da bu konuda çok sayıda deneysel ve preklinik çalışmaya ihtiyaç vardır [10], [63].

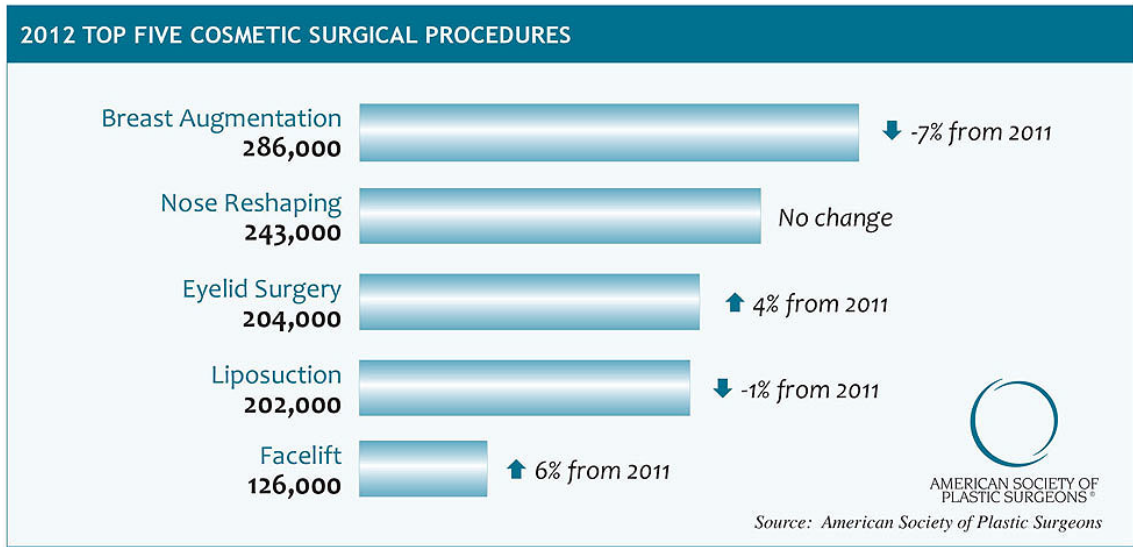
Başarılı bir doku mühendisliği uygulamasında sağlanması gereken ikinci önemli unsur, hücre kaynağıdır. Olgun adipositler son derece hassas bir yapıda oluşları ve hücre proliferasyon özelliklerinin olmayışı nedeni ile hücre kaynağı olarak kullanımları sınırlıdır [64]. Alternatif olarak preadipositlerin kullanımı ümit verici olarak görölse de, günümüze kadar gerçekleştirilen pek çok çalışma, adipoz doku mühendisliğinde mezenkimal kök hücrelerin, hücresel gelişim, morfoloji ve in vitro farklılaşma potansiyelleri bakımından en uygun kaynaklardan biri olduğunu göstermektedir [65], [66]. Bu özelliklere ek olarak Gimble ve arkadaşları yayınladıkları çalışmalarında, doku mühendisliğinde kullanıma uygun ideal bir kök hücre kaynağının sahip olması gereken özellikleri şu şekilde sıralamışlardır [67], [68]:

- İstenildiğinde tek bir işlem sonrası yüksek sayıda hücre elde edilmesi (milyondan milyara kadar sayılarda),
- Elde edilmeleri için minimum invaziv bir işlem gereksinimi,
- Tekrarlanabilir ve kontrol edilebilir bir şekilde farklı hücre tiplerine dönüşebilme özelliklerinin olması,
- Otolog veya alojenik bir alıcıya güvenli ve etkin bir biçimde nakledilebilmeleri,
- İyi Üretim Uygulamaları (GMP) şartlarına uygun bir şekilde üretilebiliyor olmaları.

İnsan ADK-MKH hücreleri, gerek elde edilmeleri için gerekli doku alım şeklinin basitliği ve minimal invaziv olması, gerekse dokunun içerdiği MKH oranının diğer kaynakların 100-500 katı fazla olması (1 gram adipoz dokudan yaklaşık 5000 ADK-MKH elde edilebilmektedir) nedeni ile özellikle son yıllarda doku mühendisliğindeki çalışmalar için veya tedavi amaçlı gerçekleştirilen cerrahi uygulamalar için son derece dikkat çeken bir kaynak haline gelmiştir [12], [23], [69], [70], [71].

Adipoz doku mühendisliğinde her ne kadar yukarıda bahsedildiği üzere son yıllarda oldukça ciddi ilerlemeler elde edilmiş olsa da güncel klinik uygulamalarda en sık tercih edilen doku kaynağı taze otolog adipoz dokudur. Bununla birlikte bireyin genetik özellikleri, yaşı, mevcut vücut kitle indeksi gibi pek çok faktör dolayısı ile yumuşak doku zedelenmesi veya tamirinde tercih edilen taze adipoz dokunun tamir potansiyeli ve içerdiği rejeneratif hücre oranları ciddi farklılıklar göstermektedir. Son yıllarda bazı plastik cerrahlar gerçekleştirdikleri lipoaspirasyon uygulamalarında hastalardan alınan adipoz dokuları daha ileri bir tarihte ihtiyaç duyulması halinde kullanım amacı ile soğutarak veya dondurarak saklamaktadır. Çoğu belirli bir bilimsel yaklaşıma/temele dayanmayan bu doku saklama hizmetleri sonrasında kullanılan dokuların, nakil sonrası öngörülemez şekilde vücut tarafından emildiği, bu nedenle ardışık bir cerrahi uygulamaya ihtiyaç duyulabildiği pek çok bilimsel çalışmada rapor edilmiştir [4], [5] [10]. Bu amaçla son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda adı geçen adipoz dokuların veya içerdiği rejeneratif hücre havuzunun uygun şartlarda dondurulması, saklanması ve gerektiğinde etkin olarak çözülerek kullanılması ile adı geçen problemlerin üstesinden gelinebileceği ve etkin bir otolog doku bankası uygulama ve saklama modeli oluşturulabileceği belirtilmektedir [10].

Şekil 2.1’de 2012 yılı itibariyle Amerikan Plastik Cerrahlar Derneği’nin yayınladığı resmi rakamlara göre lipoaspirasyon uygulamaları en sık uygulanan ilk 5 cerrahi uygulama arasında görülmektedir. Sadece Amerika Birleşik Devletleri’nde gerçekleştirilen bu sayılar göz önüne alınır ise, adı geçen işlemlerde elde edilen yağ dokularının uygun şartlarda dondurularak gelecekte etkin kullanımlarının sağlanması ile gerek sağlık gerekse ekonomik olarak ciddi bir faydanın sağlanabileceği aşikardır.



Şekil 2.1 İşlem sayılarına göre ABD’de en yaygın ilk 5 kozmetik cerrahi uygulaması ¹

2.2 Adipoz doku ve ADK-MKH’lerin klinikte kullanımı

Adipoz doku ve ADK-MKH’lerin klinik olarak kullanım potansiyellerinin başında, çalışmanın da temelini oluşturduğu şekilde yumuşak doku defektlerinin cerrahi olarak tamiri uygulamaları gelmektedir. Bu şekilde bir kullanım için ADK-MKH’lerin herhangi bir farklılaşma aşamasına ihtiyaçları olmadığından basit ve doğrudan tedavi amaçlı olarak kullanılabilmesi pek çok araştırmacı için cazip bir ortam oluşturmaktadır. Bu sebeple ADK-MKH’lerin klinikte farklı vakalarda ve klinik durumda kullanıldıkları ile ilgili günümüzde çok sayıda yayın bulunmaktadır ve adı geçen çalışmaların sayısı ve uygulandığı klinik şartların çeşidi her geçen gün artmaktadır [70]. Eylül 2013 itibariyle dünya genelinde ADK-MKH’lerin tedavi amacı ile kullanıldığı, bir kısmı tamamlanmış ve büyük bir kısmı halen devam eden 87 klinik çalışmanın olduğu bildirilmiştir [72]. Bu

¹ www.plasticsurgery.org

Çalışmalarda ADK-MKH'lerin yumuşak doku tamiri ve rekonstrüktif cerrahideki potansiyelinin yanında kemik ve kıkırdak tamirinde, miyokard enfarktüsü ve periferik vasküler hastalık gibi iskemik hastalıklarda, çeşitli yara tedavilerinde, bağışıklık sistemi hastalıklarında ve diyabetteki kullanım potansiyelleri de araştırılmaktadır. Her ne kadar ADK-MKH'lerin klinik kullanım imkanları henüz daha başlangıç aşamasında olsa da , sonuçların ümit verici olduğu ve bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalarda ciddi bir yan etki veya beklenmedik bir sonuç ile karşılaşılmaması sebebi ile yakın gelecekte standart bir tedavi olarak kullanılabilme olasılıklarının arttığı bildirilmektedir [73], [74].

2.3 Doku ve Hücre Kriyoprezervasyonu Uygulamaları ve Bilimsel Temelleri

Kriyoprezervasyon, en basit tanımı ile doku ve hücrelerin canlılıklarını ve fonksiyonlarını korumak sureti ile geri döndürülebilir olarak düşük ısılarda (<-130°C) saklanması olarak tanımlanabilir. Organizmayı oluşturan doku ve hücrelerin anatomik, biyolojik ve moleküler yapıları birbirinden oldukça farklı olabildiğinden, bu amaçla günümüze kadar farklı doku ve hücre için pek çok özel kriyoprezervasyon/çözme yöntemleri ve teknikleri geliştirilmiştir. Bununla birlikte her kriyoprezervasyon/çözme protokolü için temelde oluşturulması veya çözülmesi gereken en önemli aşamalar/ problemler sırası ile dondurma aşaması için:

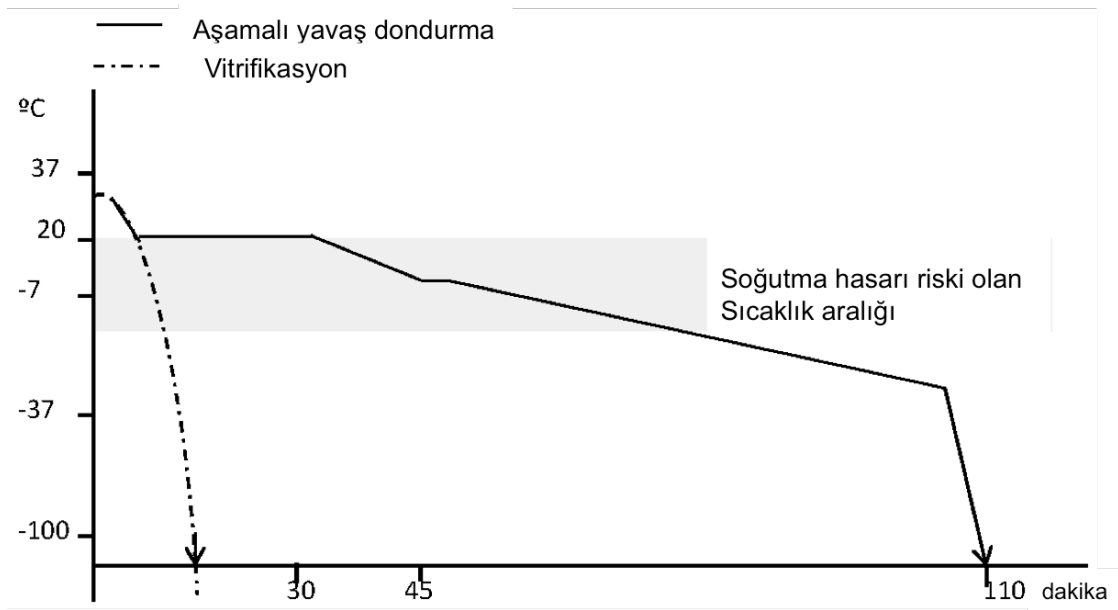
- i) ortamdaki çözücü konsantrasyonu,
- ii) soğutma hızı,
- iii) hücre içi donma süreci,

özme aşamasında dikkat edilmesi gereken en önemli noktalar:

- i) ozmotik çok riski
- ii) hücrelerin çözme sırasında maruz kaldıkları yüksek konsantrasyon kriyoprotektan solüsyonları kaynaklı toksisitedir [75], [76], [77], [78], [79].

Kriyobiyolojide pek çok farklı kriyoprezervasyon yaklaşımı veya protokolü bildirilmiş olmasına karşın, temelde buz kristaline bağlı hasardan kaçınarak azalan sıcaklığın koruyucu etkisini kullanan iki farklı yaklaşım mevcuttur. Bu yaklaşımlardan ilki, buz kristali oluşumunu dondurma işlemi uygulanacak örnekte belirli bir bölgede (örnek içerisindeki doku ve hücrelere zarar vermeyecek şekilde) tutarak ve dondurma hızı

olarak oluşumu kontrol ederek gerçekleştirilen “konvansiyonel kriyoprezervasyon” veya diğer adı ile “aşamalı yavaş dondurma”, diğeri ise çok yüksek bir hızda ortam sıcaklığını düşürerek buz kristali oluşumuna izin vermeyerek gerçekleştirilen “vitrifikasyon” yaklaşımıdır. Her iki yaklaşımda da temel amaç, hücre içi ve dışında oluşabilecek buz kristallerinin yaratabileceği hasardan kaçınmak ve dondurulan doku/hücreleri çözme sonrası fizyolojik bütünlüklerinde ve fonksiyonellikte geri kazanmaktır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Günümüzde doku ve hücre kriyoprezervasyonunda en sık kullanılan yöntemler

Optimize edilmemiş bir dondurma protokolünde, ortamdaki çözücü konsantrasyonunun ortamda bulunan buz kristallerinden daha ölümcül soğutma hasarları oluşturabileceği gösterilmiştir [80]. Buz kristali oluşumu ise hücre zarı ve organellerinde doğrudan fiziksel hasarlar vererek hücre/organel iç/dış dengesini değiştirmekte ve hücrenin viabilite kaybına yol açmaktadır [78]. Benzer şekilde düzgün planlanmamış bir dondurma protokolünde hatalı dondurma hızları hücre zarının iç ve dış ortamdaki karşılıklı su molekülü alışverişini uygun şekilde tamamlayamamasına veya hücre için son derece zararlı ve riskli olan yüksek ozmotik strese yol açabilmektedir [81].

Kriyoprotektanlar, dondurma protokollerine eklendiklerinde soğutma ısılarını azaltarak buz kristali oluşumunu ve olası hücre hasarını azaltırlar. İdeal bir kriyoprotektan suda kolaylıkla çözünebilen, hücre içerisine rahatlıkla girebilen ve düşük toksisiteye sahip bir kimyasal olarak tanımlanır [79], [82]. Dünya üzerinde ilk iki koşulu sağlayabilen çok sayıda madde/molekül olmasına karşın, özellikle üçüncü koşulu da birlikte sağlayabilenlerin sayısı oldukça sınırlıdır. Dünya üzerinde kriyokoruyucu etki gösterebilen pek çok doğal veya sentetik kimyasal madde biliniyor olsa da, pek çoğu yüksek toksisite oluşturmalarından dolayı doku/hücre kriyoprezervasyonu işlemlerinde kullanılamamaktadırlar. Kriyoprotektanlar, hücre içine girebilen (permeable) ve hücre içine giremeyen (impermeable) olarak iki temel grup olarak sınıflandırılırlar. Hücre içerisine girebilen kriyoprotektanlar hem hücre içinde hem de hücre dışında bulunabildiklerinden, dondurma işlemi sırasında oluşan artmış tuz konsantrasyonlarını her iki kısımda da düzenleyici olarak görev yaparlar. Hücre içine giremeyen kriyoprotektanlar da belirli bir düzeyde hücre canlılığı korurlar fakat hücre içerisine girebilen kriyoprotekthanlara kıyasla sadece hücre dışındaki tuz konsantrasyonu üzerinde düzenleyici bir etkileri vardır.

Gliserol, memeli hücrelerinde gerçekleştirilen kriyoprezervasyon uygulamalarında ilk kullanılan kriyoprotektandır. Polge, Smith ve Parkes, 1949 yılında gerçekleştirdikleri çalışmalarında salin solüsyonu içerisinde çözülmüş gliserol kullanarak ve sıcaklığı kademeli olarak azaltarak spermatozoa hücrelerini dondurmuşlar ve -80C'de uzun süre etkin olarak saklayabilmişlerdir [83]. Dimetilsulfoksit (DMSO) ise hücre zarından gliserol ile kıyaslandığında daha hızlı geçen ve hücre üzerinde daha düşük ozmotik stres oluşturan ve gliserole alternatif bir kriyoprotektan olarak 1959 yılında, Loveslock ve Bishop tarafından bildirilmiştir [84]. Bu tanımlamaya göre her iki kriyoprotektan da Lovelock'un belirttiği ilk iki temel gereksinimi karşılarlar. Gliserol DMSO'ya kıyasla daha düşük bir toksisiteye sahip olsa da hücre içerisine girme hızı DMSO ile kıyaslandığında oldukça düşüktür ve kullanımı sırasında hücre üzerindeki ozmotik stresin kontrolü oldukça zordur. Bu sebeple genel olarak geçerli başka bir neden yoksa, standart bir kriyoprezervasyon protokolü oluşturma aşamasında ilk tercih edilen kriyoprotektan DMSO'dur.

Kriyoprotektanların koruyucu özellikleri farklı hücre tiplerine göre oldukça farklılık gösterebilmektedir. Doku ve hücreler canlılıkları ve fonksiyonellikleri için pek çok farklı ortam ve gereksinime ihtiyaç duyduklarından, belirli bir doku veya hücre üzerinde optimal sonuçların alındığı kriyoprezervasyon protokolü veya kriyoprotektan başka bir doku veya hücre üzerinde son derece verimsiz sonuçlar doğurabilmektedir [85]. Bu nedenle, literatürde aynı kriyoprotektan ile farklı hücre tipleri üzerinde gerçekleştirilen araştırmalar birbirine tamamen zıt sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir. Bu nedenle, dondurma-çözme uygulamalarında kullanılacak hücre tipine göre hangi kriyoprotektanların hangi şartlarda kullanılacağına işlem öncesinde optimizasyonu, adı geçen hücreler ile gerçekleştirilecek çalışmalarda son derece önemlidir. Güncel kriyobiyolojide doku ve hücre tipine göre kullanılacak kriyoprezervasyon metodunun belirlenmesinde belirli temel kurallar mevcuttur ve bu kuralların her farklı doku ve hücre tipine göre değerlendirilmesi ve gerekli durumlarda optimize edilmesi gereklidir.

Adipoz doku ve ADK-MKH hücre kriyoprezervasyonunda günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalarda en sık kullanılan kriyoprotektanlar dimetilsüfoksit (DMSO), Etilen glikol, gliserol gibi hücre içerisine girebilen kimyasallar ve hidroksietil nişasta (HES), dekstran, polivinilpirolidon (PVP), süktroz ve trehaloz gibi hücre içerisine giremeyen makromoleküllerdir [11].

Etkin bir kriyoprotektan olarak gliserol ilk kez Polge ve arkadaşları tarafından 1949 yılında sperm üzerinde uygulanmıştır [83]. Bu çalışma aynı zamanda kriyoprezervasyon alanında pek çok çalışmanın da başlangıcı olarak kabul edilmektedir. Gliserol polihidroksile edilmiş bir çözünendir ve bu özelliği sayesinde su molekülleri ile hidrojen bağı kurarak hücre zarından sınırlı bir geçirgenliğe sahip olmaktadır. Gliserolün kriyoprotektan olarak etkinliği hücre tipine göre değişmekle birlikte genellikle 5mol/l 'ye kadar bir konsantrasyon sınırdadır. Gliserole kıyasla DMSO çok daha yüksek bir hücre zarı geçirgenliğine sahiptir ve kriyoprotektan olarak kullanıldığı şartlarda, sıcaklığa bağlı olarak değişmekle birlikte oldukça hızlı bir şekilde hücre içine girebildiğinden işlem sırasında inkübasyon sürelerinin kısaltılabilmesi açısından avantaj sağlar. Ayrıca hücre zarında yer alan fosfolipid molekülleri ile de elektrostatik etkileşime de girdiği bilinmektedir [86]. Bazı kriyoprotektanlar ayrıca

hücre içi proteinler ile bağ kurarlar veya proteinlerin yüzeylerinde bir tabaka oluşturarak dehidrasyon sırasında oluşabilecek yapısal değişikliklerden korur ve termodinamik denge sağlarlar.

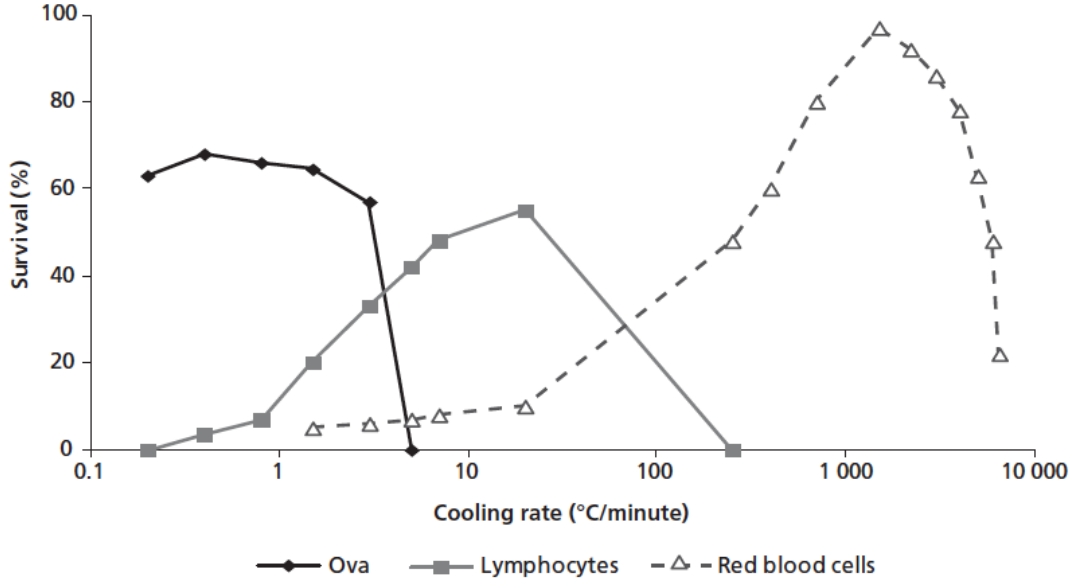
Sükroz, trehaloz gibi hücre içerisine giremeyen şeker tabanlı makromoleküllerin de membranda yer alan fosfolipidlerin polar grupları ile etkileşime geçerek benzer bir dengeyi membran seviyesinde sağladığı gösterilmiştir [87]. Yapılan çalışmalarda, hücre içerisine giremeyen hidroksietil nişasta, PVP, dekstran gibi diğer makromoleküllerin eritrositlerin kriyoprezervasyonunda oldukça etkili oldukları, fakat çekirdekli hücrelerde gerçekleştirilen kriyoprezervasyon çalışmalarında bu etkilerinin sınırlı kaldığı gözlenmiştir. [88], [89]. Günümüzde bu makromoleküller, özellikle sükroz ve trehaloz, memeli hücrelerin dondurulması protokollerinde tek başlarında olmalarından ziyade kriyoprotektan kokteyli içerisinde kullanılmaktadır.

Kriyoprezervasyon protokollerinin başarısına doğrudan etki eden bir diğer önemli faktör, kullanılan kriyoprotektanların toksisite seviyeleri/etkileridir. Kriyoprotektan kaynaklı toksisite çoğunlukla tek başına sabit bir etki olmayıp, protokol içerisinde çözünen konsantrasyonuna, çözünen ile olan temas (inkübasyon) süresine ve ortam sıcaklığına vb. bağlı olarak değişebilmektedir [90]. Dolayısı ile başarılı bir kriyoprezervasyon uygulaması sadece dondurma aşamasının optimizasyonundan ziyade çözme ve kriyokoruyucuların kademeli olarak uzaklaştırılması aşamalarını da kapsayan çok aşamalı bir süreç olarak ele alınmalıdır.

Farklı kriyoprotektanların farklı doku/hücreler üzerinde oluşturdukları ozmotik stres farklı olduğundan ve hücre tipine göre adı geçen stresin hücre viabilitesi üzerindeki etkileri ciddi değişkenlik gösterdiğinden, kriyoprezervasyon uygulamalarında kullanılacak kriyoprotektanın seçimi ile birlikte bu madde veya maddelerin hangi şartlarda eklenerek çözme sonrasında ortamdaki uzaklaştırılacakları da kriyoprezervasyonda başarıyı etkileyen en önemli temel unsurlardan biridir. Örneğin konvansiyonel kriyoprezervasyon yaklaşımında (aşamalı yavaş dondurma) eğer hücre örneği yeterince yavaş dondurulur ise, buz kristalleri ilk etapta hücreyi çevreleyen solüsyon içerisinde oluşur ve hücre bu durumda sadece azalan çözücü miktarı ve artan tuz konsantrasyonları nedeni ile değişim gösterir. Eğer dondurma protokolü

yeterince yavaş yapılmaz ise hücre içi su molekülleri yeteri kadar hızlı hücreyi terk edemedikleri için kristalleşir ve hücre içi ciddi hasarlar meydana getirirler.

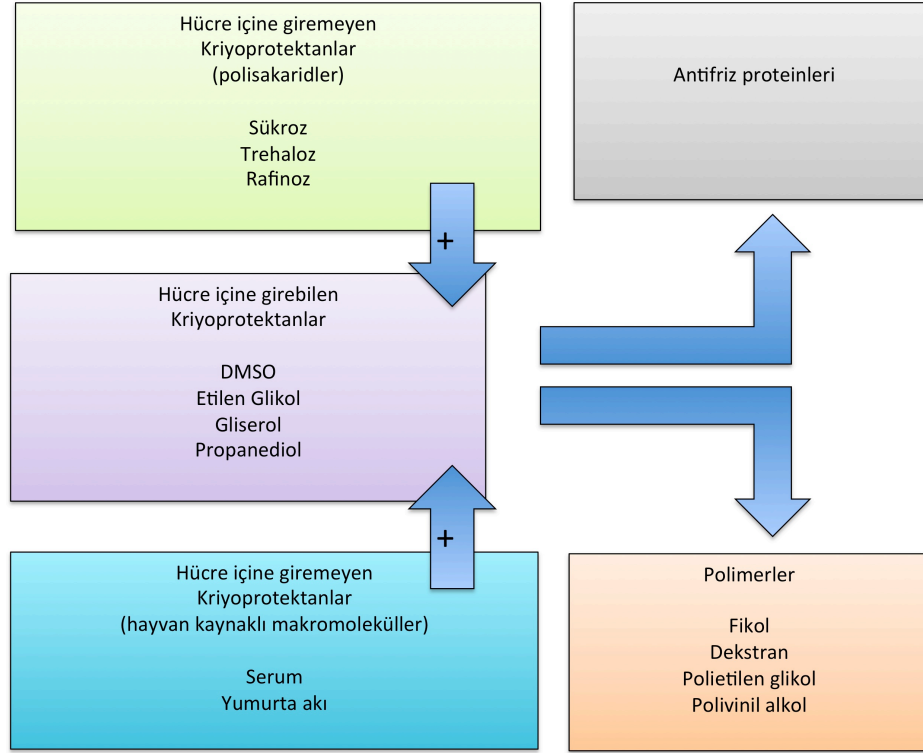
Şekil 2.3’de Mazur ve arkadaşlarının oosit, lenfosit ve eritrosit gibi çeşitli hücrelerle gerçekleştirdikleri çalışmada farklı dondurma hızlarının hücresel canlılık üzerindeki farklı etkileri görülmektedir.



Şekil 2.3 Farklı dondurma hızlarının hücresel canlılık üzerindeki etkileri

Bu hasarları önlemenin bir diğer yolu dondurulmak istenen örneğin “vitrifiye” edilmesidir. Vitrifikasyonda temel hedef, yüksek konsantrasyonda kriyoprotektanların kullanılması ve son derece yüksek hızda soğutma gerçekleştirilmesi ile doku veya hücrelerin “camsılaştırılması”dır. Güncel vitrifikasyon protokollerinde, yüksek konsantrasyonda kullanılan kriyoprotektanların potansiyel toksik etkilerini azaltabilmek için genellikle birden fazla kriyoprotektan kokteyl şeklinde kullanılmaktadır (Şekil 2.4) [47]. Vitrifikasyon tekniği özellikle üreme biyolojisinde ve yardımla üreme teknikleri (YÜT) uygulamalarında uzun yıllardır etkin olarak kullanılmaktadır [91]. Vitrifikasyon tekniğinin doku üzerinde uygulama protokolleri ve potansiyel etkinliği tamamiyle dokunun içeriğine ve kompleks yapısına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Kullanılan kriyoprotektan maddelerin doku genelinde etkinliğinin sağlanabilmesi için belirli bir inkübasyon süresine ihtiyaç vardır ve bu süre

ile kullanılan yüksek konsantrasyondaki kriyoprotektanların toksik etkileri ters orantılı olarak değişmektedir.



Şekil 2.4 Kriyoprotektan kokteylleri hazırlama şeması

Son olarak, dondurma işlemi uygulanmış doku/hücrelerin çözme aşamasına kadar olan süredeki saklama koşulları da etkin bir kriyoprezervasyon yaklaşımı için son derece önemlidir [92]. -80°C'den daha yüksek saklama sıcaklıkları genellikle uzun süreli kriyoprezervasyon için uygun değildir. Özellikle; eğer protokol dahilinde kriyoprotektan olarak DMSO kullanılıyor ise, saklanan örneklerin mümkün olduğu kadar -180°C ve altında saklanması gereklidir.

2.4 Adipoz Doku Kriyoprezervasyonu: Güncel Çalışmalar

Lipoaspirasyon veya cerrahi eksizyon şeklinde elde edilen adipoz dokuların otolog transplantasyonu, son 10 yılda yüz, el ve vücudun diğer alanları için yumuşak doku iyileştirilmesi amaçlı uygulanan kozmetik ve rekonstrüktif plastik cerrahi operasyonlarında yeni bir çığır açmıştır [93]. Bununla birlikte, günümüzde

lipoaspirasyon sonrası elde edilen yağ dokuları sadece eşzamanlı olarak gerçekleştirilen otolog yağ dokusu nakli uygulamalarında kullanılabilmektedir. Bu durum, kullanım fazlası yağ veya lipoaspirasyon örneklerinin işlem sonrası atılması anlamına gelmektedir. Günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalarda, lipoaspirasyon veya cerrahi eksizyon ile elde edilen adipoz dokuları otolog doku tamiri amacıyla gelecekte olası bir kullanım için kısa süreli saklanması ve çözme sonrası in vitro ve in vivo özelliklerinin incelendiği bazı çalışmalar mevcut olsa da, güncel literatürde bu konuda yapılmış geniş ölçekli ve uzun saklama süreleri sonrası doku ve hücre etkinliğinin ölçüldüğü çalışma sayısı son derece sınırlıdır. Ayrıca kısa süreli saklama şeklinde gerçekleştirilen ve farklı saklama metodlarının karşılaştırıldığı çalışmalarda birbirine zıt sonuçlar elde edilmesi bu konuda daha etkin çalışmaların yapılması ihtiyacını doğurmaktadır [8]. Adipoz doku kriyoprezervasyonu konusunda gerçekleştirilen ilk çalışmalarda, lipoaspirasyon yöntemi ile alınan adipoz dokuları öncelikle kriyoprotektan ile muamele etmeksizin doğrudan konvansiyonel soğutucularda (0°C ile -35°C arasında) saklanmış ve bu şekilde gerçekleştirilen uygulamalarda kabul edilebilir sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir [94], [95], [96]. Sonrasında farklı araştırmacılar, bu şekilde bir saklama yaklaşımının doku ve içerdiği hücrelerin canlılığı ve fonksiyonelliği açısından oldukça kötü sonuçlar verdiğini, uygun kriyoprotektanların kullanımı ve ilgili protokollerin optimizasyonu ile verimli ve tekrarlanabilir bir dondurma metodunun oluşturulabileceğini belirtmişlerdir [93], [97], [98], [99]. İnsan adipoz dokusu kriyoprezervasyonu konusunda günümüze kadar gerçekleştirilmiş ve özellikle hücresel sonuçların farklı yöntemler ile değerlendirildiği çalışmalar çizelge 2.2’de verilmiştir.

İnsan adipoz dokusu ile in vivo gerçekleştirilen uygulamalar, dokuların kriyoprezervasyon ve çözme sonrası doğrudan hastalara nakledildiği ve nakil sonrası klinik sonuçların değerlendirildiği çalışmalar ile daha deneysel olarak insan adipoz dokularının kriyoprezervasyon ve çözme sonrası bağışıklık sistemi işlevsel olmayan deney hayvanları modellerine nakilleri sonrası incelendiği çalışmalar olarak iki farklı grupta incelenebilir.

Çizelge 2.2 İnsan adipoz dokusu kriyoprezervasyonu konusunda günümüze kadar gerçekleştirilmiş çalışmalar ve sonuçları

Yıl	Ref.	Metod	Saklama a (°C)	Saklama süresi	Kriyo Koruyucu kullanımı	Uygulanan testler
2004	[100]	Aşamalı yavaş dondurma/ Hızlı çözme	-196	20 dak.	DMSO, Trehaloz	Akış sitometrisi, G3PDH testi, Histolojik inceleme
2008	[101]	Aşamalı yavaş dondurma/ Hızlı çözme	-196	6 ay 12 ay	Cell banker 1	İn vitro hücre gelişimi, İn vitro farklılaşma, Akış sitometrisi
2009	[93]	Aşamalı yavaş dondurma /Hızlı çözme	-196	4 ay 12 ay	DMSO, Trehaloz	Volümetrik inceleme, histolojik inceleme
2009	[97]	Aşamalı yavaş dondurma/ Hızlı çözme	-196	20 dakika	Trehaloz	Histolojik inceleme, G3PDH testi
2014	[102]	Aşamalı yavaş dondurma/ Hızlı çözme	-196	1 hafta	DMSO	In vitro farklılaşma, Akış sitometrisi, Gen ekspresyonu analizi
2005	[99]	Konvansiyonel saklama	-20 -80	2-30 gün	Farklı karışımda kriyoprotektan	MTT/XTT testi, G3PDH testi
2007	[103]	Konvansiyonel saklama	+22 +4 -20	1-3 gün 1 ay	Yok	Elektron mikroskopisi, Akış sitometrisi
2009	[104]	Konvansiyonel saklama	+4 -20 -80	15 gün	Yok	Supravital boyama
2009	[105]	Konvansiyonel saklama	-20	1 gün	Yok	Tripan mavisi testi
2010	[106]	Konvansiyonel saklama	-15 -70	1 gün 8 hafta	Yok	XTT testi, G3PDH testi
2010	[107]	Konvansiyonel saklama	-20 -80	2 ay 12 ay	DMSO	Akridin Oranj testi, İn vitro farklılaşma

2012	[8]	Konvansiyonel saklama	-20 -80 -196	2-4 hafta	Yok, Hidroksietil nişasta	MTT Testi
2013	[11]	Konvansiyonel saklama	-80	30 gün	DMSO	In vitro hücre gelişimi, Akış sitometrisi, AnexinV apoptoz testi
2014	[108]	Konvansiyonel saklama	-80 -196	1 hafta 1 ay	DMSO, Hidroksietil nişasta	MTT testi
2005	[98]	Konvansiyonel saklama/	-20	4 ay	DMSO, Gliserol	Supravital boyama, In vitro hücre gelişimi

Moscatiello ve arkadaşları, lipoaspirasyon sonrası alınan adipoz dokuları %10 DMSO içeren %0,9 salin solüsyonu ile dengeleyerek kademeli olarak soğutmuş (aşamalı yavaş dondurma) ve otolog olarak kullanıma kadar -196°C'de saklamışlardır. Çözme sonrası doku %0,9'luk salin solüsyonu ile yıkanarak DMSO uzaklaştırılmış ve hastaya gluteal iyileştirme amacı ile nakledilmiştir. Yazarlar, nakil sonrası doku kaybında görülen anlamlı azalmayı kullandıkları kriyoprotektanın ve aşamalı yavaş dondurma protokolünün pozitif etkisi olarak yorumlamışlardır [109]. Erol ve Agaoglu yakın bir süre önce gerçekleştirdikleri bir çalışmalarında, son 10 yılda dondurulmuş yağ dokuları ile gerçekleştirdikleri 5199 otolog yağ enjeksiyonu uygulamasını değerlendirmişler ve tekrarı gereken cerrahi uygulamalarda dondurularak saklanmakta olan yağ dokularının etkin bir kaynak olarak değerlendirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir [110].

İnsan adipoz dokusunun kriyoprezervasyonu ve çözme sonrası etkinliğinin timusu alınmış veya SCID farelere nakilleri sonrası incelendiği çalışmalar da, insan çalışmalarına benzer şekilde sınırlıdır. Ullmann ve arkadaşları 7 ay boyunca -18°C'de sakladıkları adipoz dokuyu timusu alınmış 10 farklı fareye nakletmişler ve 15 hafta sonra kontrol grubu olarak taze adipoz doku nakledilen 10 fareden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırmışlardır. Karşılaştırma sonrası dondurulmuş/çözülmüş adipoz dokunun gerek histolojik gerekse volümetrik olarak taze adipoz dokuya göre daha kalitesiz ve düşük olduğunu belirtmişlerdir [111]. Ciu ve arkadaşları 2009 yılında

gerçekleştirdikleri ve in vitro çalışmalarının devamı niteliğinde olan çalışmalarında, DMSO ve Trehaloz kullanılarak dondurulan insan adipoz doku örneklerini 60 adet 6 haftalık CD-1 timusu alınmış fareye nakletmişler ve adı geçen kriyoprotektanlar kullanılarak oluşturulan kriyoprezervasyon protokollerinin klinik öncesi etkinliğini araştırmışlardır. 8 haftalık bir süre sonunda yapılan incelemelerde histolojik olarak kontrol grubu ile eşdeğer bir sonuç alınsa da kriyoprezervasyon uygulanan gruptaki sonuçlar taze doku nakli yapılan farelerdeki sonuçlardan daha düşük seviyede tespit edilmiştir ve çalışmacılar bu konuda daha fazla optimizasyon yapılması gerektiğini belirtmişlerdir [97].

Ko ve arkadaşları, benzer bir çalışmada doğrudan sıvı nitrojen ile temas ettirilerek dondurulan -70°C 'de 8 hafta dondurularak saklanmış insan adipoz dokusunu, dondurma öncesi aynı dokudan izole edilerek kültürde çoğaltılmış ADK-MKH hücreleri ile karıştırarak 6 haftalık BAB/c timusu alınmış fareye nakletmiş ve nakil sonrası dokunun canlılığını ve doku kalitesini incelemiştir. Çalışma sonunda taze olarak izole edilmiş ADK-MKH'ler ile karıştırılmış grupta nakil edilen doku hacminin ve histolojik yapının kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha iyi olduğu bulunmuştur [112].

Gerek son yıllarda artan sayıda vakada tercih edilen hücre yardımcı lipotransfer uygulamaları, gerekse deney hayvanlarında gerçekleştirilen ve ADK-MKH eklenmesi ile elde edilen başarılı adipoz doku nakilleri çalışmaları, adipoz dokunun yakın gelecekte doku nakli amaçlı dondurulması, saklanması ve gerektiğinde çözülerek kullanılması halinde otolog ADK-MKH hücreleri ile kombine edilmesinin klinik etkinliği ve başarıyı arttıracığı yönündedir.

2.5 ADK-MKH'lerin Kriyoprezervasyonu: Güncel Çalışmalar

Taze dokudan izole edilmiş ve tanımlanmış ADK-MKH hücreleri ile son dönemlerde gerçekleştirilen kriyoprezervasyon çalışmalarının sonuçları da adipoz doku üzerinde yürütülen çalışmalarda olduğu gibi birbiri ile çelişik ve tartışmalıdır. James ve arkadaşları (%90 FBS/%10 DMSO içeren) kriyoprezervasyon mediumu ile dondurdukları ve çözdükleri ADK-MKH hücrelerinin hücre morfolojileri, proliferasyonları, osteojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyellerinin ciddi oranda negatif olarak etkilendiğini belirtmiştir [113]. Diğer taraftan Gonda ve arkadaşları %10

FBS içeren medium ile gerçekleştirdikleri kriyoprezervasyon çalışmasında, hücrelerin adı geçen şekilde dondurulup 6 aya kadar saklanması sonrası morfolojik, proliferasyon veya farklılaşma potansiyelleri bakımından herhangi bir kayıp yaşamadıklarını bildirmişlerdir [101]. Trihumala ve arkadaşları çalışmalarında farklı kriyoprotektanların etkilerini incelemiş ve hücrelerin serum kullanmaksızın %2'lik DMSO ve %10'luk PVP solüsyonları içerisinde etkin olarak dondurulup çözölebildiğini ifade etmişlerdir [114], [115]. Benzer şekilde farklı zamanlarda De Rosa ve arkadaşları ile Liu ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmalarda kriyoprezervasyonun adipoz hücre fenotipinde ve farklılaşma potansiyelinde negatif bir etki oluşturmadığı raporlanmıştır [31], [116].

MATERYAL /METOD

3.1 Materyaller

- 10, 50, 100, 1000 µl'lik mikropipetler (Thermo, Pippetman)
- 1-10, 10-100, 100-1000 µl'lik Tek Kullanımlık Pipet Uçları (AxyGen)
- Santrifüj tüpleri 1, 2, 15, 50 ml, (BD, Eppendorf, IsoLAB)
- 25cm² hücre kültür kabı, 4-kuyucuklu kültür kabı, merkezi-kuyucuklu kültür kabı (BD, TPP, Corning, NUNC)
- Steril örnek toplama kabı (Fıratpen)
- Serolojik Pipet Tabancası (Thermo)
- Serolojik pipetler 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml (Corning)
- Kriyotüpler 2ml , 4.5 ml (TPP, NUNC)
- 100 µm'lik steril hücre süzgeci (BD Biosciences)
- 50-1000 ml'lik otoklavlanabilir cam şişeler (ISOLAB, SCHOTT)
- 1-2, 5-5, 10-50 cc'lik enjektör (Ayset)
- 0,22 µm ve 0, 45 µm'lik şırınga filtreleri (MILLIPORE, TPP, Sartorius)
- Lateks eldiven (Broche, ISOLAB)

3.1.1 Cihazlar

- pH Metre (İnolab WTW Level 1)
- Hassas terazi (Precisa Gravimetrics AG)
- Santrifüj (Eppendorf, Thermo Micromax RF)
- Vorteks (Heidolph REAX top)

- Bidistile Su Cihazı
- Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (Heidolph MR 3001)
- Laminar-Hava Akışlı Kabin
- İnkübatör (37 °C %5 CO₂'li Binder Etüv)
- İnverted mikroskop (Olympus CKX41)
- Işık mikroskobu (Olympus)
- Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR3000)
- -20 ° C Derin Dondurucu
- QuadroMACS Manyetik Hücre separatörü (Miltenyi Biotech)
- Akış sitometresi (Becman Coulter Cell Lab Quanta SC)
- Buz makinesi (Scotsman AF100)
- Vortex (LMS (laboratory medical supplies) VTX-3000L)
- Su banyoları (GFL (gesellschaft für labortechnik) mbH, Kerman)
- Isıtıcılı karıştırıcı (Heidolph instruments)
- Dondurucular (Beko (+4,-20°C), Arçelik (+4,-20°C), GFL (-80°C))
- -196°C Azot Tankı ve Azot taşıma tankları (DMC air liquid systems)
- Otoklav (Kerman, HIRAYAMA)

3.1.2 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan solüsyon ve kimyasallar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan solüsyon ve kimyasallar

Madde adı	Üretici Firma	Katalog No
Alsian Mavisi Solüsyonu %1’lik,	Sigma	B8438
Antibiyotik-Antimikotik (100x)	Invitrogen™	15240-062
Deplesyon antikoru kokteyli	Miltenyi Biotech	130-092-211
DMSO (Hybrimax)	Sigma	D2650
DPBS Ca-Mg-(içermeyen)	Invitrogen	14040094
DPBS Ca-Mg (içeren)	Invitrogen	14040091
Dulbecco’s Modifiye Eagle Mediumu (DMEM)	Gibco	11880
Etilen Glikol	Sigma	102466
FBS	Gibco	10270-106
Formaldehit %37’lik	Merck	1.04002.2500
Glutamax™-I (100x)	Gibco	35050-079
HSA	Irvine Scientific	9988
Hücre yıkama solüsyonu (Rinsing solution)	Miltenyi Biotech	130-091-222
Kolajenaz A Tip I	Sigma	C0130
Lökosit Alkalın Fosfataz Kiti	Sigma	86R
Oil Red O Solüsyonu, %0.2’lik izopropanol ile	Sigma	O1391
Paraformaldehit	Sigma	P6148
PBS	MPLabs	2810305
RBC Lizis Tamponu	eBioscience	00-4333-57
Sodyum Sitrat	Sigma	S1804

STEMPRO® Adipogenez Farklılaşma Kiti	Gibco	A10070-01
STEMPRO® Kondrogenez Farklılaşma Kiti	Gibco	A10071-01
STEMPRO® Osteogenez Farklılaşma Kiti	Gibco	A10072-01
Sükroz	Sigma	S1888
Tripan mavisi (%0,5)	Biol. Industries	628255
Trypsin, 0.05% (1X) EDTA 4Na içeren, sıvı	Gibco	25300-054
Triton-X	Sigma	T8787
TUNEL Kiti (In situ Cell Death Detection Kit)	Roche	11.684.795.910

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Solüsyon ve Kriyoprotektanların Hazırlanması

Komplet hücre kültür solüsyonu: L-glutamin içeren bazal hücre kültür solüsyonu (DMEM) içerisine antibiyotik/antimikotik ve %10 oranında FBS eklenerek hazırlandı. Tüm deneylerde işlem günü taze olarak hazırlanmış veya hazırlandıktan sonra azami 3 gün +4°C’de buzdolabında saklanmış olan komplet hücre kültür solüsyonu kullanıldı.

%10 DMSO: Komplet hücre kültür solüsyonu içerisine stok DMSO solüsyonundan eklenerek hazırlandı. Genel kullanımda 10 ml %10 DMSO solüsyonu hazırlamak için 9 ml komplet hücre kültür solüsyonu içerisinde 1 ml stok DMSO damlalar halinde yavaşça ve sürekli karıştırılarak eklendi.

%1, %7,5, %10, %30 DMSO: Deneyde toksisite çalışmalarında kullanılmak üzere %1’den %30’a kadar farklı konsantrasyonlarda DMSO içeren komplet hücre kültür solüsyonu %10 DMSO hazırlanmasının anlatıldığı şekilde, komplet kültür mediumu içerisine ilgili oranda DMSO katılarak gerçekleştirildi.

%1, %7,5, %10, %30 EG: Deneyde toksisite çalışmalarında kullanılmak üzere %1’den %30’a kadar farklı konsantrasyonlarda EG içeren komplet hücre kültür solüsyonu %10 DMSO hazırlanmasının anlatıldığı şekilde, komplet kültür mediumu içerisine ilgili oranda EG katılarak gerçekleştirildi.

%10 DMSO+0,2M sükroz: Solüsyonun hazırlanış şekli %10 DMSO ile benzerdir. Öncesinde hazırlanmak istenen volüme bağlı olarak uygun miktarda sükroz tartıldı ve

komplet hücre kültür solüsyonu içerisinde çözöldü. Daha sonra bu solüsyonun içerisinde stok DMSO solüsyonundan eklenerek hazırlandı. Genel kullanımda 10 ml %10 DMSO+0,2M süktroz solüsyonu hazırlamak için 8 ml komplet hücre kültür solüsyonu içerisinde 0.68 gr süktroz tartılarak çözöldü. Daha sonra volüm 9 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyon üzerine 1 ml stok DMSO damlalar halinde yavaşça ve sürekli karıştırılarak eklendi.

0,5M süktroz: Hazırlanmak istenen son volüme bağılı olarak uygun miktarda süktroz tartıldı ve komplet hücre kültür solüsyonu içerisinde çözöldü. Genel kullanımda 10 ml 0,5M süktroz solüsyonu hazırlamak için 8 ml komplet hücre kültür solüsyonu içerisinde 1.71 gr süktroz tartılarak çözöldü. Daha sonra final volüm 10 ml olacak şekilde komplet hücre kültür solüsyonu eklendi.

ES solüsyonu (%7.5 DMSO+%7.5 Etilen Glikol): Komplet hücre kültür solüsyonu içerisinde stok DMSO ve Etilen glikol solüsyonlarından eklenerek hazırlandı. Genel kullanımda 10 ml ES solüsyonu hazırlamak için 8.5 ml komplet hücre kültür solüsyonu içerisinde 0.75 ml stok DMSO damlalar halinde yavaşça ve sürekli karıştırılarak eklendi. Daha sonra karıştırılmaya devam edilmek sureti ile 0.75ml Etilen glikol eklendi ve final hacim 10 ml'ye tamamlandı. DMSO eklenmesi yukarıda da bahsedildiğı üzere damlalar halinde ve yavaşça gerçekleştirildi.

VS1 solüsyonu (%15 DMSO+%15 Etilen Glikol+0,5M süktroz): Solüsyonun hazırlanış şekli ES solüsyonu ile benzerdir. Bununla birlikte öncesinde hazırlanmak istenen volüme bağılı olarak uygun miktarda süktroz tartıldı ve komplet hücre kültür solüsyonu içerisinde çözöldü. Daha sonra bu solüsyonun içerisinde stok DMSO ve Etilen Glikol solüsyonundan uygun miktarlar eklenerek hazırlandı. Genel kullanımda 10 ml VS1 solüsyonu hazırlamak için 6 ml komplet hücre kültür solüsyonu içerisinde 1.71 gr süktroz tartılarak çözöldü. Daha sonra solüsyon karıştırılmaya devam edilmek sureti ile 1.5 ml DMSO ve 1.5 ml Etilen glikol eklendi ve komplet kültür solüsyonu kullanılarak final hacim 10 ml'ye tamamlandı.

VS2 solüsyonu (%30 DMSO+%30 Etilen Glikol+0,5M süktroz): Solüsyonun hazırlanış şekli VS solüsyonu ile benzerdir. Bununla birlikte öncesinde hazırlanmak istenen volüme bağılı olarak uygun miktarda süktroz tartıldı ve komplet hücre kültür solüsyonu + Etilen glikol içerisinde çözöldü. Daha sonra bu solüsyonun içerisinde stok DMSO

solüsyonundan uygun miktarlar eklenerek hazırlandı. Genel kullanımda 10 ml VS2 solüsyonu hazırlamak için 3 ml komplet hücre kültür solüsyonu içerisinde 3 ml Etilen glikol eklendi ve 1.71 gr süktroz tartılarak bu solüsyon içerisinde çözöldü. Daha sonra solüsyon karıştırılmaya devam edilmek sureti ile 3 ml DMSO eklendi ve komplet kültür solüsyonu kullanılarak final hacim 10 ml'ye tamamlandı.

1M süktroz: Hazırlanmak istenen final volöme bağılı olarak uygun miktarda süktroz tartıldı ve komplet hücre kültür solüsyonu içerisinde çözöldü. Genel kullanımda 10 ml 1 M süktroz solüsyonu hazırlamak için 8 ml komplet hücre kültür solüsyonu içerisinde 3.42 gr süktroz tartılarak çözöldü. Daha sonra final volüm 10 ml olacak şekilde komplet hücre kültür solüsyonu eklendi. Yüksek konsantrasyon olduğundan hazırlanması sırasında süktrozun çözünölürlüğünü arttırmak amacı ile 37°C'de ısıtıcı tabla üzerinde hazırlandı.

Tripan Mavisi (TB) solüsyonunun hazırlanması

100mL'lik ambalajlarda % 0.5 konsantrasyon şeklinde olan Tripan mavisi solüsyonu (Biological Industries) ticari olarak satın alındı. Hücre sayımı için 10µl Tripan mavisi boya, 90µl distile su ile seyreltilerek sayım solüsyonu hazırlandı.

STEMPRO® farklılaşma besiyerlerinin hazırlanması

Çalışma süresi içerisinde elde edilen ADK-MKH hücrelerinin in vitro farklılaşma potansiyelinin tespit edilmesi için bölüm 4.1.2.'de detayları belirtilmiş ve ticari olarak üretilmiş STEMPRO® marka adipogenez, kondrogenez ve osteogenez farklılaşma kitleri kullanıldı. Adı geçen kitler, bazal medium ve adı geçen hücre tipine dönüşümü tetikleyen büyüme faktörleri kokteyli içeren ve katkı (supplement) mediumu olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. Üretici firma tarafından tavsiye edilen hazırlık şekli Çizelge 3.2'de belirtilmektedir. Hazırlanan komplet solüsyonlar deneylerde kullanımları öncesinde 2-8°C'de buzdolabında muhafaza edildiler. Çalışmada kullanımlarından hemen önce su banyosunda bekletilerek çalışma sırasında 37°C ye gelmeleri sağlandı.

Çizelge 3.2 STEMPRO in vitro farklılaşma solüsyonlarının hazırlanışı

STEMPRO® adipogenez farklılaşma mediumu (komplet)	
STEMPRO® adiposit farklılaşma bazal mediumu	90 ml
STEMPRO® adipogenez katkı solüsyonu	10 ml
Gentamisin (10 mg/ml)	50 ul
Total volüm:	100 ml
STEMPRO® osteogenez farklılaşma mediumu (komplet)	
STEMPRO® osteosit/kondrosit farklılaşma bazal mediumu	90 ml
STEMPRO® osteogenik katkı solüsyonu	10 ml
Gentamisin (10 mg/ml)	50 ul
Total volüm:	100 ml
STEMPRO® kondrogenez farklılaşma mediumu (komplet)	
STEMPRO® osteosit/kondrosit farklılaşma bazal mediumu	90 ml
STEMPRO® kondrojenik katkı solüsyonu	10 ml
Gentamisin (10 mg/ml)	50 ul
Total volüm:	100 ml

3.2 Metod

3.2.1 İnsan Adipoz Dokuların Örnekleme

Çalışmada kullanılan insan adipoz doku örnekleri, kozmetik amaçlı lipoaspirasyon veya cerrahi eksizyon operasyonu geçiren, herhangi ciddi bir genetik veya sistemik hastalık hikayesi olmayan 25-65 yaş aralığındaki 10 bayandan gerekli bilgilendirilmiş onam formları alınarak Op.Dr. Tunç Tiryaki ve Op.Dr. Ali Sakinsel tarafından elde edildi. Adipoz doku örnekleri ile ilgili detaylı bilgiler Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan adipoz doku örnekleri ile ilgili bilgiler

No:	Donör Cinsiyeti	Donör Yaşı	Doku miktarı (cc)	Örnekleme metodu	Kullanım şekli
1	Kadın	28	100	Lipoaspirasyon	Hücre izolasyonu
2	Kadın	35	120	Lipoaspirasyon	Hücre izolasyonu
3	Kadın	39	50	Lipoaspirasyon	Hücre izolasyonu
4	Kadın	42	150	Lipoaspirasyon	Hücre izolasyonu
5	Kadın	25	380	Cerrahi eksizyon	Hücre izolasyonu
6	Kadın	60	200	Cerrahi eksizyon	Hücre izolasyonu
7	Kadın	65	250	Lipoaspirasyon	Doku dondurma
8	Kadın	42	400	Lipoaspirasyon	Doku dondurma
9	Kadın	38	400	Lipoaspirasyon	Doku dondurma
10	Kadın	48	350	Lipoaspirasyon	Doku dondurma

Lipoaspirasyon işlemi genel anestezi altında, ucuna 2.4 mm'lik kanül takılmış 10ml'lik şırınga ile aspirasyon şeklinde gerçekleştirildi ve elde edilen lipoaspirat örnekleri steril gazlı bezlerden süzülme sureti ile çevreleyen sıvı ve kan hücrelerinden uzaklaştırıldı.

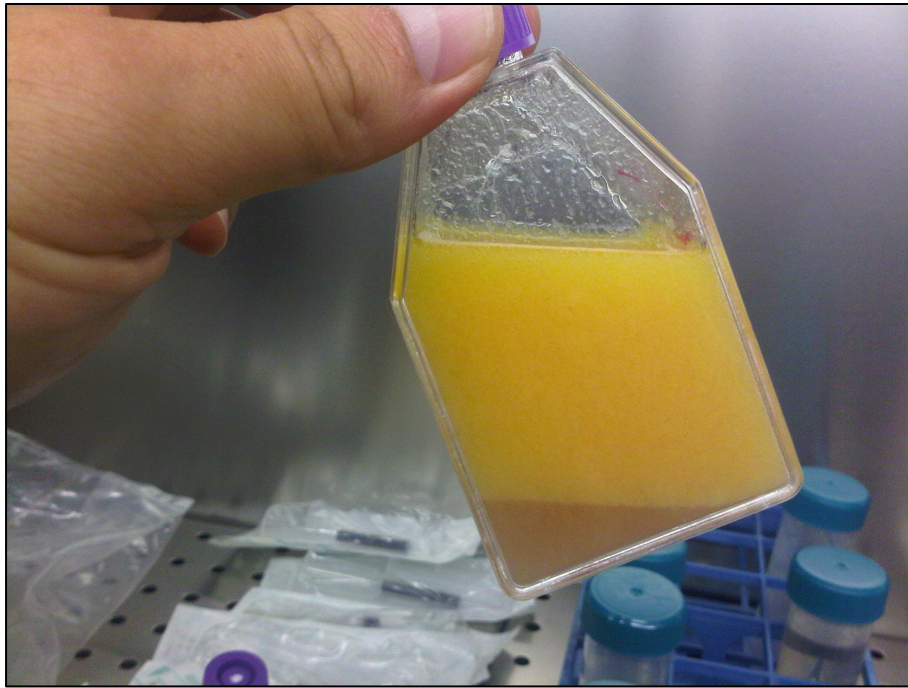
Doku dondurma deneylerinde kullanılan 4 farklı bireyden lipoaspirasyon yöntemi ile alınmış adipoz doku örnekleri, cerrahi işlem sonrasındaki 60-120 dakika içerisinde Medicana Bahçelievler Hastanesi Yardımcı Üreme Teknikleri Laboratuvarına aseptik koşullarda nakledilerek ilgili bölümde detaylı olarak anlatıldığı şekilde doku dondurma deneylerinde kullanılmak üzere işlendi.

Hücrel deneylerde kullanılan adipoz doku örnekleri 6 farklı donörden (4 örnek lipoaspirasyon sonrası, 2 örnek karın germe operasyonu sırasında cerrahi eksizyon sonrası) elde edildi. Doku örnekleri cerrahi operasyonu takip eden 2 saat içerisinde Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültür Laboratuvarına aseptik koşullarda ulaştırılarak enzimatik hücre izolasyonu uygulanmak üzere işlendi.

3.2.2 Taze Adipoz Doku Örneklerinden ADK-MKH İzolasyonu ve Ekspansiyonu

Taze adipoz dokudan ADK-MKH izolasyonu, literatürde etkinliği farklı gruplar tarafından tanımlanmış olan klasik enzimatik ayrıştırma metodu kullanılarak gerçekleştirildi [21], [117], [118].

Hücre izolasyonu yapılacak doku örnekleri (lipoaspirasyon veya doku eksizyonu ile elde edilen) öncelikle 25 cm² hücre kültür kapları içerisine alındı, sonrasında 10 ml %0.02'lik Tip I kolajenaz enzimi ve antibiyotik/antimikotik içeren DMEM solüsyonu ile 37°C'de 30-60 dakika inkübe edildi. Her 10 dakikada bir kap nazikçe çalkalanmak sureti ile enzimatik reaksiyonun doku genelinde homojen olması sağlandı. İnkübasyon sonrası elde edilen heterojen suspansiyon son çalkalama sonrası 15 dakika 37°C'de bekletilerek hücrelerin hücre maturasyonuna göre tabakalar halinde ayrışması sağlandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Enzim ile inkübasyon sonrası ayrılmış tabakalar

Alt tabakada yer alan SVF hücreleri 10 ml'lik steril pipet kullanılarak üst tabakayı rahatsız etmeden nazikçe aspire edildi ve temiz bir flask içerisinde 1:1 oranında komplet hücre kültür mediumu ile karıştırılmak sureti ile enzimin aktivitesi durduruldu.

Örnek içerisindeki bağ dokusu artığı veya doku debrisı süspansiyonun 100 µm'lik steril hücre süzgecinden geçirilmesi ile uzaklaştırıldı ve süspansiyon 15 ml'lik konik falcon tüpler içerisine nakledildi. Sonrasında tüp 300g'de 10 dakika santrifüj edilerek hücrelerin pelet oluşturması sağlandı. Süpernatant atıldıktan ve pelet komplet hücre kültür mediumu ile resuspanse edildikten sonra ikinci bir santrifüj aşaması ile yıkama yapıldı (Şekil 3.2).

Pelet resuspanse edilerek üzerine RBC Liziz tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmesini müteakip son bir santrifüj yıkama aşaması sonrası hücre sayımı ve viabilite değerlendirilmesi yapılarak daha önceden belirlenmiş deney planına göre işlendi.



Şekil 3.2 RBC Liziz tamponu ile muamele öncesi hücre pelleti

3.2.2.1 Manyetik Tabanlı Hücre Ayırıştırılması

Çalışmada manyetik tabanlı hücre ayırıştırılmasının gerçekleştirilmesi amacıyla QuadroMACS hücre ayırıştırma sistemi kullanıldı. Bölüm 3.2.2 sonrası elde edilen hücreler, öncelikle üretici firma tarafından tavsiye edilen %0,2 HSA içeren yıkama solüsyonu ile resuspanse edildi. Mevcut hücre süspansiyonu içerisindeki bağışıklı sistemi kökenli hücreleri ayırmak için üretici firma tarafından tavsiye edilen ve CD2,

CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123 ve CD235a yüzey antijenlerine karşı geliştirilmiş biyotin-kojuge depleksyon antikoru kokteyli kullanıldı. Üretici firma tarafından sağlanan protokole göre ilk olarak hücre süspansiyonu içerisinde 40 µl depleksyon antikor kokteyli eklenerek 10 dakika 4-8 °C'de inkübe edildi ve inkübasyon sonrası yıkama solüsyonu ile 300 g'de 10 dakika sanrijüj edilerek yıkandı ve supernatan kısmı uzaklaştırıldı. Pelet 80 µl yıkama solüsyonu ile resuspanse edildikten sonra içerisinde 20 µl Anti-Biyotin mikrotanecikler, (microbeads) eklenerek 10 dakika 4-8 °C'de inkübe edildi. Inkübasyon sonrası yıkama solüsyonu ile 300 g'de 10 dakika sanrijüj edilerek yıkanan hücre peleti son aşamada 500 µl yıkama solüsyonu ile resuspanse edilerek manyetik ayrıştırma aşamasına geçildi. Manyetik ayrıştırma aşamasında öncelikle ayrıştırmada kullanılacak kolon (LS kolonu) cihaza (QuadroMACS) yerleştirilerek 3 ml yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkama sonrası bir önceki aşamada inkübasyonu tamamlanan hücre süspansiyonu kolona yüklenerek, oluşan manyetik alan yardımı ile süspansiyon içerisindeki bağışıklık sistemi hücrelerinin kolona yapışması ve antijenlerin bağlanmadıkları progenitor/kök hücrelerin kolondan akarak saflaştırılması sağlandı. Bu şekilde ayrıştırılan progenitor/kök hücreler takip eden aşamada in vitro kültüre alınarak bölüm 3.2.3'te belirtildiği şekilde büyütüldüler.

3.2.3 In Vitro Hücre Kültürü

Elde edilen primer hücre kültürü örnekleri, tüm çalışma boyunca, deney planına göre aksi belirtilmedikçe %10 FBS içeren DMEM-tabanlı komplet hücre kültür mediumu kullanılarak 25 cm²'lik hücre kültür kapları içerisinde büyütüldü. Hücreler, bulundukları deney grubuna ve aşamasına göre her 4-7 günde bir, kültür kabı yüzeyinin yaklaşık %80-90'ının kaplamalarını müteakip 1:3 veya 1:4 oranında Tripsin/EDTA solüsyonu kullanılarak pasajlandı ve ekspanse edildi. Pasaj aşaması dışında her 2-4 günde bir hücre kültür mediumu yenilendi.

4-10. pasaj sayıları arasında hücrelerin kök hücre olma kriterleri bakımından gerekli değerlendirilmeleri yapıldı.

3.2.3.1 Mikro Kapiler Metod (MKM) ile In Vitro Hücre Kültürü

Primer hücre kültürü örnekleri tüm kültür kabı yüzeyini %90 oranında kapladıkları gözlemlendiğinde tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak kültür kabı yüzeyinden ayrılmaları sağlandı. Süspansiyon halde toplanan hücrelerden, tripan mavisi boyaması ile canlılık tayini sonrasında 60-70 µl alındı ve 1 ml'lik enjektörler kullanılarak mikrokapiler tüplere ekimleri gerçekleştirildi. Tüplerin açık uçları steril şartlarda reçine ile kapatıldı ve tüpler %5'lik CO₂ ve 37°C'de inkübe edildi. Ekim işlemini takip eden 4.günün sabahında hücre gelişimi ve morfolojisi invert mikroskop altında 200X büyütmede değerlendirildi ve deney planına göre pasajlama gerçekleştirildi.

3.2.4 Akış Sitometrisi Yöntemi ile İmmünofenotipleme

Hücrelerin immünofenotiplendirilmesi için akış sitometrisi tekniği kullanıldı. Fenotipleme yapılması planlanmış hücreler gelişmekte oldukları kültür kapları yüzeyinden %0,05'lik Tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırıldı ve hücre sayımı/viabilite değerlendirmesini müteakip 2 saat içerisinde farklı floresan işaretçikler ile bağlı, CD34, CD45, CD73, CD90, CD29 ve CD105 yüzey antikorları ile +4 °C'de 30 dakika inkübasyon sonrası Becman Coulter Cell Lab Quanta SC akış sitometrisi cihazı ve CXP yazılımı kullanılarak değerlendirildi. Değerlendirme sırasında her bir yüzey antijen ölçümü için kanallanmış en az 10000 sayım gerçekleştirildi.

3.2.5 Tripan Mavisi Boya Dışlama Testi ile Viabilite Tayini

Viabilite tayini yapılması planlanan örneklerden hücre yoğunluğuna göre 2-10 µl alındı ve 5 µl hazırlanmış tripan mavisi solüsyonu ile lam üzerinde karıştırıldı. Boyanın homojen olarak dağılması sağlandıktan sonra üzeri lamel ile kapatılarak ışık mikroskobu yardımıyla hücre sayımı gerçekleştirildi. Değerlendirme sırasında canlı hücrelerde boya hücre içerisine giremediğinden parlak beyaz renkte, ölü hücreler ise hücre zarından boyayı geçirdikleri için mavi renkte görüldü. Değerlendirilen her bir örnekte 3 farklı alanda en az 100 hücre sayımı yapıldı ve canlılık aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Viabilite (\%)} = (\text{canlı hücre sayısı} \div \text{toplam sayılan hücre sayısı}) \times 100$$

3.2.6 TUNEL testi ile DNA fragmentasyonu analizi

DNA hasar ölçümü yapılacak hücreler öncelikle bulundukları kültür kabından tripsin enzimi yardımı ile kaldırılarak süspansiyon haline getirildi. Süspansiyondan 50-100 µl'lik bir örnek alınarak kuru bir lam üzerine damlatıldı ve hafifçe lam üzerine yayılarak kurumaya bırakıldı. Sonrasında lam üzerine sabitlenmiş hücreler %4'lük paraformaldehit kullanılarak fikse edildi. Fikse edilen lamlar +4°C'de taze olarak hazırlanmış %0.1'lik Triton-X / %0.1'lik sodyum sitrat solüsyonu karışımında 2 dakika inkübe edildi. Sonrasında lamlar iki kez PBS ile yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Çalışılacak alan uygun bir şekilde işaretlenerek bu alana taze olarak hazırlanmış 10 µl Tunel mix solüsyonu (1 µl enzim solüsyonu + 9 µl işaretleme solüsyonu) eklendi ve alan 22x22 lamel ile kapatıldı ve 37°C'de 1 saat nemli ortamda inkübe edildi. Lam süre sonunda 3 kez PBS ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Son aşamada örnek üzerine DAPI boyası damlatılarak hücreler sayıma ve değerlendirmeye alındı. Sayım işlemi en az 2 farklı alanda 100 hücre (nükleus) değerlendirmesi ve ortalamalar alınarak gerçekleştirildi.

3.2.7 In Vitro Farklılaşma Amaçlı Hücre Kültürü

In vitro farklılaşma uygulanacak hücreler, ilk aşamada 25 cm²'lik hücre kültür kapları içinde 37 °C'de %5 CO₂ ortamda inkübe edilerek, çoğalmaları sağlandı. 2-7 gün süresince hücresel çoğalma gözlenen ve hücrelerin kabın yüzeyini %70-90 oranında kapladığı gözlenen gruplarda hücreler 2 kez Ca-Mg içermeyen DPBS tamponu kullanılarak yıkandı ve tripsin solüsyonu eklenerek hücrelerin kabın yüzeyinden ayrılmaları sağlandı. Elde edilen hücre süspansiyonu üzerine, tripsin enzimini bloke etmesi amacı ile 5 ml komplet hücre kültür mediumu eklenerek süspansiyon her bir deney grubu için (her bir kap içerisinde 1 ml hücre süspansiyonu olacak şekilde) 4 adet merkezi-kuyucuklu (center-well) kültür kapları içerisine pasajlandı. Kalan 2 ml'lik hücre süspansiyonu, 2 farklı 6 cm'lik kültür kabı içerisine 10 µl'lik damlacıklar halinde (mikrokütle-micromass) yüzeyde belirli aralıklarla ekildi ve mevcut literatürde açıklandığı şekilde 37 °C'de %5 CO₂ ortamında ve yüksek nem içeren inkübatörde 3

saat inkübe edildi [21], [119]. Mikrokütle yöntemi uygulanmamış kaplarda pasajdan 24 saat sonra hücre kültür mediumu tazelendi.

Dört adet merkezi-kuyucuklu kültür kabının 2'si kontrol grubu olarak seçildi ve bu gruptaki hücrelerin içinde büyütüldüğü kültür mediumu 14 gün boyunca her 2-3 günde bir taze komplet hücre kültür mediumu olarak tazelendi. Bu kaplar dışında kalan 2 kap sırası ile adipojenik ve osteojenik farklılaşmanın indüklenmesi için daha önce bölüm 3.1.3'te açıklanan STEMPRO ticari in vitro farklılaştırma mediumları ile inkübe edildiler. Bu kapların dışında hazırlanmış olan mikrokütle kaplarının biri komplet hücre kültür solüsyonu ile (kontrol), diğeri de kondrojenik farklılaşmanın tayini amacı ile STEMPRO kondrogenez farklılaşma mediumu ile kültüre edildi.

Kontrol grubu ve farklılaşma grubundaki tüm kaplar aynı zaman diliminde (14 gün boyunca) büyütüldüler ve kaplardaki hücrelerin içinde büyütüldüğü kültür mediumları deney koluna göre her 2-3 günde bir tazelendi.

3.2.8 Hücresel Farklılaşmanın İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemleri ile İncelenmesi

İn vitro farklılaşma amaçlı inkübasyon süresinin sonunda tüm kaplar %4'lük paraformaldehit ile fikse edildi ve farklılaşmanın beklendiği hücre tipinin tayini için Oil Red O (adipojenik), Alsiyan mavisi (kondrojenik) ve Alkalın fosfataz (ALP) boyama (osteojenik) teknikleri uygulandı.

3.2.8.1 Adipojenik farklılaşmanın immünohistokimyasal tayini

Adipojenik farklılaşma için Oil Red O boyama protokolü literatürde daha önce belirtildiği şekilde uygulandı [23]. Paraformaldehit ile fikse edilmiş hücreler önce deiyonize su ile yıkandı. Sonrasında %60 izopropanol içerisinde %0.2'lik Oil Red O boyama solüsyonu ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Sonrasında ikinci bir deiyonize su ile yıkama aşamasını takiben hücreler adipojenik farklılaşma bakımından (kırmızı boyanmış olan lipid vesikülleri tayin edilerek) ışık mikroskobu kullanılarak incelendi.

3.2.8.2 Kondrojenik farklılaşmanın immünohistokimyasal tayini

Kondrojenik farklılaşma tayini için, mikrokütle yöntemi ile hazırlanmış ve 14 gün süresince kontrol ve kondrojenik farklılaşma mediumu ile inkübe edilmiş farklı kaplarda Alsian mavisi boyama yöntemi kullanıldı. Paraformaldehit ile fiksasyon sonrası hücreler 2 kez deiyonize su ile yıkandı ve %70'lik etanol içerisinde bekletildiler. Dehidrasyon aşamasını takiben mikrokütle yapıları parafine gömüldü ve 5-mm'lik kesitler alınarak Alsian mavisi boyama protokolü ile incelendi [120].

3.2.8.3 Osteojenik farklılaşmanın immünohistokimyasal tayini

Osteojenik farklılaşmanın tespiti için Alkalın fosfataz boyama yöntemi kullanıldı. Paraformaldehit ile fiksasyon sonrası hücreler daha önce literatürde anlatıldığı şekilde [121], 2 kez deiyonize su ile yıkandıktan sonra ALP boyama solüsyonu ile 15 dakika inkübe edildi. Boyanın deiyonize su ile tekrar yıkanması sonrasında renk değişimi mikroskop altında incelendi.

3.2.9 İnsan ADK-MKH örneklerinin Kriyoprezervasyonu ve Çözülmesi

Çalışma kapsamında elde edilmiş ADK-MKH örneklerinin kriyoprezervasyonu, aşamalı yavaş dondurma ve vitrifikasyon teknikleri kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.9.1 Aşamalı Yavaş Dondurma Protokolü

ADK-MKH örneklerinin aşamalı yavaş dondurma metodu ile işlenmesi tek aşamalı olarak gerçekleştirildi. Kriyoprezervasyon öncesinde hücreler büyüttükleri kültür kaplarından tripsin-EDTA enzimi uygulanarak kaldırıldı ve 300 g'de 10 dakika santrifüj edilerek 15 ml'lik konik tüp içerisine toplandı, supernatan solüsyonu uzaklaştırıldı. Örnekler sonrasında ilgili kriyoprotektan solüsyonu ile oda sıcaklığında (22°C - 24°C) 10 dakika inkübe edildiler. İnkübasyon sonrasında hücre örnekleri kriyotüpler içerisine konularak soğutma hızının programlı olabilmesi amacı ile önce 4 saat -20°C'de daha sonra gece boyunca -80°C'de bekletildi ve son aşamada sıvı nitrojen içerisinde saklandı.

3.2.9.2 Vitrifikasyon Protokolü

ADK-MKH örneklerinin aşamalı yavaş dondurma metodu ile işlenmesi iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. Kriyoprezervasyon öncesinde hücreler büyütüldükleri kültür kaplarından tripsin-EDTA enzimi uygulanarak kaldırıldı ve 15 ml'lik konik tüp içerisine 300g'de 10 dakika santrifüj edilerek toplandı, supernatan solüsyonu uzaklaştırıldı. Birinci aşamada ADK-MKH örnekleri ilgili gruba göre belirlenmiş dengeleme solüsyonu/kokteyli ile oda sıcaklığında (22°C - 24°C) 10 dakika inkübe edildiler. Adı geçen dengeleme sürelerinin bitiminde tüp içindeki dengeleme solüsyonu 300 g'de 5 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı, pellet resüspanse edildi ve içerisine vitrifikasyon solüsyonu eklenerek 10 dakika bu solüsyon ile inkübe edildi. Inkübasyon süresi bitiminde hücreler 300 g'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü, üst kısımdaki fazla vitrifikasyon solüsyonu uzaklaştırıldı ve pellet kalan vitrifikasyon solüsyonu ile nazikçe resüspanse edilerek kriyotüpler içerisine bölündü. Kriyotüpler zaman kaybetmeden sıvı nitrojen içerisine daldırıldı ve sonrasında kriyoprezervasyon işleminin tamamlanmasını müteakip -196°C'de incelenekleri güne kadar saklandı. Şekil 3.3'te vitrifikasyon öncesi hazırlanmış kriyoprotektan kokteyl solüsyonları ve işlem bitiminde hücrelerin nakledilip dondurulacağı kriyotüpler görülmektedir.



Şekil 3.3 Vitrifikasyon için hazırlanmış solüsyonlar ve kriyotüpler

3.2.9.3 ADK-MKH Örneklerinin Çözülmesi

Dondurularak belirli bir süre saklanan ADK-MKH örnekleri planlanan saklama sürelerinin bitiminde hızlı çözme yöntemi kullanılarak çözüldüler.

İlk aşamada sıvı nitrojen içerisinde saklanan örnekler oda sıcaklığına getirildi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilerek tüpün etrafında bulunabilecek mevcut sıvı nitrojen artıklarının buharlaşması sağlandı. Daha sonra kriyotüpler 37°C'deki su banyosunda inkübe edilerek tüp içeriği çözüldü.

Tüp içindeki tüm örneğin çözüldüğünün görüldüğü aşamada tüpler uygulanan dondurma protokolüne göre yıkama işlemlerine tabi tutuldu ve örnek içindeki kriyoprotektanlar kademeli olarak uzaklaştırıldı.

Aşamalı yavaş dondurma uygulanan grupta bu aşamada hücreler öncelikle 15 ml'lik konik tüp içerisine alındı ve 2 kez komplet kültür mediumu eklenmek ve 300g'de 10 dakika santrifüj etmek sureti ile kriyoprotektan uzaklaştırıldı.

Vitrifikasyon tekniği uygulanan gruptaki ADK-MKH hücreleri 10'ar dakikalık inkübasyon süreleri ile sırasıyla 1M ve 0,5M Sükroz solüsyonu içerisine alınarak inkübe edildiler. Son aşamada dokular 10 dakika komplet kültür mediumu ile yıkandı, inkübasyon ve yıkama aşamaları arasındaki geçişler 300 g'de 10 dakika santrifüj yapılarak sağlandı.

3.2.10 İnsan Adipoz Doku Örneklerinin Kriyoprezervasyonu ve Çözülmesi

Çalışma kapsamında araştırma amaçlı elde edilmiş adipoz doku örneklerinin kriyoprezervasyonu, aşamalı yavaş dondurma ve vitrifikasyon teknikleri kullanılarak gerçekleştirildi. Kriyoprezervasyon öncesi adipoz dokuların süzülmesi, çalışma planına göre ilgili inkübasyon kaplarına alınması ve farklı kriyoprotektan solüsyonları ile inkübe edilmeleri Şekil 3.4, 3.5 ve 3.6'da görülmektedir.



Şekil 3.4 Lipoaspirat örneklerinin doku dondurma aşaması için ayrılması



Şekil 3.5 İşlemden önce lipoaspirat örneğinin süzülmesi



Şekil 3.6 Dengeleme aşaması öncesi ilgili kaplara ayrılmış doku örnekleri

3.2.10.1 Aşamalı yavaş dondurma Protokolü

Adipoz doku örneklerinin aşamalı yavaş dondurma metodu ile işlenmesi tek aşamalı olarak gerçekleştirildi. Örnekler, Çizelge 3.4'te belirtilmiş deney planına göre steril kaplar içerisinde ilgili kriyoprotektan solüsyonu ile oda sıcaklığında (22°C - 24°C) 10 dakika inkübe edildiler. Inkübasyon sonrasında örnekler mevcut rutin aşamalı yavaş dondurma protokolüne göre her bir deney grubu için 4 ayrı tüp içerisinde 3 ml doku örneği olacak şekilde kriyotüpler içerisine konularak soğutma hızının programlı olabilmesi amacı ile önce 4 saat -20°C'de daha sonra gece boyunca -80°C'de bekletildi ve son aşamada sıvı nitrojen içerisinde saklandı.

Çizelge 3.4 Aşamalı yavaş dondurma uygulanan dokularda altgruplara göre kullanılan dengeleme solüsyonları

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Dengeleme Solüsyonu	Komplet medium	%10 DMSO	%10 DMSO+ 0.2 M Sükroz	0,5M Sükroz

3.2.10.2 Vitrifikasyon Protokolü

Adipoz doku örneklerinin vitrifikasyon metodu ile işlenmesi iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. Birinci aşamada dokular deney planına göre ayrıldıkları kaplar içerisinde ilgili gruba göre belirlenmiş kriyoprotektan solüsyonu ile oda sıcaklığında (22°C - 24°C) Çizelge 3.5'te belirtildiği şekilde 10, 20 ve 40 dakika olmak üzere 3 farklı alt grupta dengeleme amaçlı inkübe edildiler. Adı geçen dengeleme sürelerinin bitiminde her bir alt gruba ait kap içindeki dengeleme solüsyonu uzaklaştırılarak içerisine vitrifikasyon solüsyonu eklendi ve 10 dakika vitrifikasyon solüsyonu ile inkübe edilen dokular 3 ml'lik kriyotüpler içerisine alınarak (her bir altgrup 4 tüp olacak şekilde) sıvı nitrojen içerisine daldırmak sureti ile vitrifiye edildiler.

Çizelge 3.5 Vitrifikasyon uygulanan dokularda altgruplara göre kullanılan dengeleme ve vitrifikasyon solusyonları

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Dengeleme Solüsyonu	Komplet medium	%7.5 DMSO+ %7.5 EG	%7.5 DMSO+ %7.5 EG	0,5M Sükroz
Vitrifikasyon Solüsyonu	Komplet medium	%15 DMSO+ %15 EG + 0.5 M Sükroz	%30 DMSO+ %30 EG +0,5M Sükroz	0.5M Sükroz

3.2.10.3 Adipoz Doku Örneklerinin Çözülmesi

Dondurularak belirli bir süre saklanan doku örnekleri, ilgili dondurma grubuna bağlı olarak (aşamalı yavaş dondurma veya vitrifikasyon) planlanan saklama sürelerinin bitiminde (1, 3, 12 ve 24 ay) çözme işlemine tabi tutuldular.

Aşamalı yavaş dondurma protokolü uygulanan grupta, +4°C'de saklanan dokular oda sıcaklığına alınmalarını müteakip komplet kültür mediumu ile 300g'de 10 dakika santrifüj edilmek sureti ile 2 kez yıkandı. -20 °C'de ve -196°C'de saklanmakta olan doku örnekleri 37°C'de hazır bulunan su banyosuna alınarak öncelikle dokunun

çözünmesi sağlandı. Sonrasında ilk grupta olduğu gibi yıkama aşamaları gerçekleştirildi.

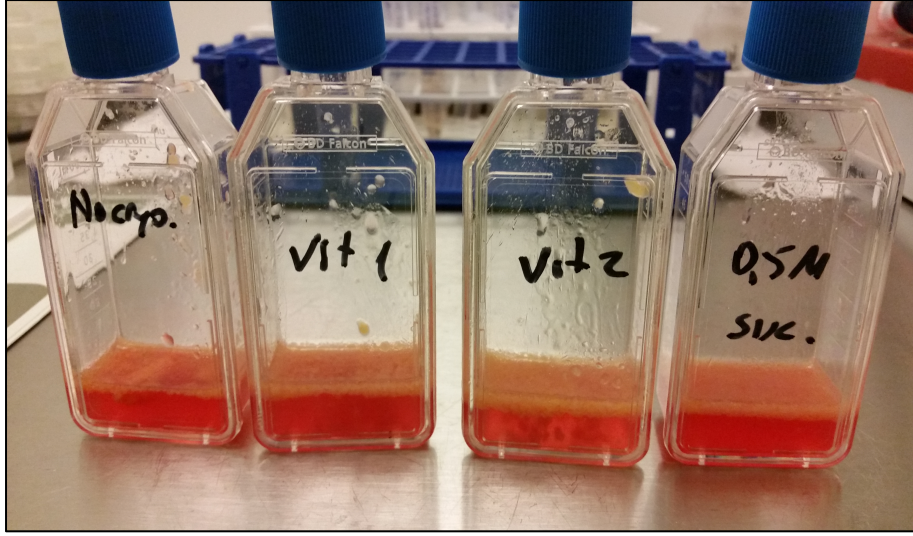
Vitrifikasyon tekniği uygulanan gruptaki dokularda çözme işlemi öncesi tüm örnekler 37 °C’de hazır bulunan su banyosuna alınarak öncelikle dokunun çözünmesi sağlandı. Sonrasında tüm gruplarda örnekler 10’ar dakikalık inkübasyon süreleri ile sırasıyla 1M ve 0,5M Sükroz solüsyonu içerisine alınarak inkübe edildiler. Son aşamada dokular 10 dakika komplet kültür mediumu ile yıkandı.

3.2.11 Histolojik İnceleme

Deney zaman çizelgesine göre çözme işlemi uygulanan dokuların bir kısmı histolojik inceleme yapılması amacı ile ayrıldı. İnceleme öncesi doku örnekleri %10’luk formalin solüsyonu kullanılarak fikse edildi. Seri olarak farklı konsantrasyondaki etanol ve en son aşamadaki ksilen yıkamalarından sonra parafin içerisine gömülerek 5µm’lik kesitler alındı. Alınan kesitler daha sonra hematoksilin&eoizin boyaması yapılarak incelendi. İnceleme öncesinde kesitlerin bulunduğu lamalar rastlantısal olarak ve incelemeyi yapan kişiden bağımsız biri tarafından numaralandırıldı ve değerlendirme işlemi tek-kör çalışma olarak gerçekleştirildi. Her bir örnek, dokunun olası yapısal hasarı, dejenerasyonu ve hücresel bütünlüğü yönünden değerlendirildi.

3.2.12 Çözme Sonrası Adipoz Doku Örneklerinden ADK-MKH İzolasyonu ve Ekspansiyonu

Deney zaman çizelgesine göre çözme işlemi uygulanan dokuların histolojik inceleme için ayrılan kısım dışında kalan miktarı adipoz dokudan ADK-MKH izolasyonu amacı ile işlendi. Hücre izolasyonu, bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Hücre izolasyonu yapılacak doku örnekleri öncelikle 25 cm² hücre kültür kapları içerisine alındı, sonrasında 10 ml %0,02’lik Tip I kolajenaz enzimi ve antibiyotik/antimikotik içeren DMEM solüsyonu ile 37 °C’de 30-60 dakika inkübe edildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 Çözme sonrası adipoz dokulardan hücre izolasyonu

Her 10 dakikada bir kap nazikçe çalkalanmak sureti ile enzimatik reaksiyonun doku genelinde homojen olması sağlandı. İnkübasyon sonrası elde edilen heterojen süspansiyon son çalkalama sonrası 15 dakika 37°C’de bekletilerek hücrelerin hücre maturasyonuna göre tabakalar halinde ayrışması sağlandı

Alt tabakada yer alan SVF hücreleri 10 ml’lik steril pipet kullanılarak üst tabakayı rahatsız etmeden nazikçe aspire edildi ve temiz bir flask içerisinde 1:1 oranında komplet hücre kültür mediumu ile karıştırılmak sureti ile enzimin aktivitesi durduruldu ve süspansiyon 15 ml’lik konik falcon tüpler içerisine nakledildi. Sonrasında tüp 300 g’de 10 dakika santrifüj edilerek hücrelerin pelet oluşturması sağlandı. Süpernatant atıldıktan ve pelet komplet hücre kültür mediumu ile resuspanse edildikten sonra ikinci bir santrifüj aşaması ile yıkama yapıldı. Pelet resuspanse edilerek üzerine RBC Liziz tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmesini müteakip son bir santrifüj yıkama aşaması sonrası hücre sayımı ve viabilite değerlendirilmesi yapılarak daha önceden ayrılmış hücre kaplarına ekimleri gerçekleştirildi.

İlk gruptaki tüpler (#1-4), doku düzeyinde inceleme kısmında olduğu gibi konvansiyonel aşamalı yavaş dondurma çalışmalarında kullanılan kriyoprotektan içeriklerine göre gruplandılar. Tüpler ilk olarak 300 g’de 5 dakika santrifüj edildi ve

supernatan atıldı. Pelet resuspanse edilerek her bir tüp içerisine işaretlendiği deney grubu solüsyonundan 3 ml eklenerek karıştırıldı. Her bir tüp içeriği, daha önceden işaretlenip etiketlenmiş 3 kriyotüp içerisine, her bir kriyotüpte 1 ml solüsyon olacak şekilde aktarıldı. Tüpler (toplamda 12 adet) sırası ile +4°C'de, -20°C'de bekletildiler ve son aşamada sıvı nitrojen içerisine aktarılacak sureti ile aşamalı yavaş dondurma protokolü uygulandı.

İkinci gruptaki tüpler (#5-8; Vitrifikasyon grubu) ilk olarak 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve supernatan atıldı. Pelet resuspanse edilerek her bir tüp içerisine işaretlendiği deney grubu solüsyonundan (Bu aşamada VS1 ve VS2 için aynı ES solüsyonu) 2 ml eklenerek karıştırıldı ve 300g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatan hızla uzaklaştırıldı ve her bir tüp içerisine işaretlendiği deney grubu solüsyonundan 3 ml eklendi. Tüp içerikleri daha önceden işaretlenip etiketlenmiş 3 kriyotüp içerisine, her bir kriyotüpte 1 ml solüsyon olacak şekilde aktarıldı. Tüpler (toplamda 12 adet) doğrudan sıvı nitrojen içerisine aktarıldı.

Dondurularak 15 gün saklanan hücre örnekleri, ilgili dondurma gurubuna bağlı olarak (aşamalı yavaş dondurma veya vitrifikasyon) çözme işlemine tabi tutuldular.

Aşamalı yavaş dondurma protokolü uygulanan grupta, -196 °C'de saklanmakta olan hücre örnekleri 37°C'de hazır bulunan su banyosuna alınarak öncelikle tüp içeriğinin çözünmesi sağlandı. Sonrasında 37 °C'de ısıtılmış komplet hücre kültür mediumu kullanılarak 300 g de 10 dakika santrifüj uygulayarak yıkandı ve kriyoprotektan uzaklaştırıldı. Bu aşamada bölüm 3.2.1.6'da detaylı olarak anlatıldığı şekilde tripan mavisi boya dışlama testi kullanılarak hücresel düzeyde canlılık tayini gerçekleştirildi. Son aşamada pelet resuspanse edildi, hücrelerin taze komplet hücre kültür mediumu eklenerek 25 cm²'lik flaskların içine aktarıldı. Her bir gruba ait süspansiyon hücre gelişiminin gözlenmesi ve takibi için 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.

Vitrifikasyon tekniği uygulanan gruptaki hücreler de ilk grupta olduğu gibi 37 °C'de hazır bulunan su banyosuna alınarak öncelikle tüp içeriğinin çözünmesi sağlandı. Sonrasında tüm gruplarda örnekler 10'ar dakikalık inkübasyon süreleri ile sırasıyla 1M ve 0,5M Sükroz solüsyonu içerisine alınarak inkübe edildiler. Son aşamada hücreler 10 dakika komplet kültür mediumu ile yıkandıktan sonra bölüm 3.2.1.6'da detaylı olarak

anlatıldığı şekilde tripan mavisi boya dışlama testi kullanılarak hücresel düzeyde canlılık tayini gerçekleştirildi. Daha sonra hücresel gelişiminin gözlenmesi ve takibi için 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.

3.2.13 İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar her bir parametre için en az 4 farklı ölçüm şeklinde alınmış ve sonuçlar ortalama±standart sapma olarak belirtilmiştir. Grupların karşılaştırılmasında t-test kullanılmıştır ve p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmiştir.

DENEY SONUÇLARI

4.1 İnsan Adipoz Dokularından ADK-MKH İzolasyonu ve In Vitro Kültürü

Çalışmanın hücresel düzeydeki kısmında kullanılmak üzere, ilk aşamada bölüm 3.2.1’de detaylı olarak anlatılan şekilde lipoaspirasyon (n=4) ve karın germe (n=2) ameliyatı geçiren 6 farklı kadın donörden elde edilmiş adipoz dokuları, ADK-MKH izolasyonu amacı ile enzimatik ayrıştırmaya tabi tutuldu. Ayrıştırma sonrası elde edilen SVF süspansiyonlarının aşağıdaki şekilde laboratuvar ortamında kültürleri gerçekleştirildi:

- i) SVF süspansiyonları doğrudan kültür ortamına alındı (n=4). Hücreler 25 cm²’lik hücre kültür kapları içerisine komplet kültür mediumu eklenerek aktarıldı ve büyütüldü.
- ii) SVF süspansiyonları MidiMACS manyetik hücre ayrıştırma sistemleri ve Lineage depletion kit kullanılarak cihaza bağlı kolonlardan geçirildi (n=2). Bu sayede SVF içerisinde yoğun miktarda bulunan kan ve bağışıklık sistemi kökenli mononükleer hücrelerin süspansiyondan uzaklaştırılması sağlandı (Şekil 5.1). Süzülen ve progenitör hücreler bakımından zenginleştirilmiş yeni süspansiyon 25 cm²’lik hücre kültür kapları içerisine komplet kültür mediumu eklenerek aktarıldı ve büyütüldü.



Şekil 4.1 Manyetik hücre ayırma sistemi ile ADK-MKH izolasyonu

Her iki izolasyon grubundaki hücreler in vitro kültür ortamında paralel olarak büyütüldü ve gözlendi. Manyetik tabanlı hücre ayırma işlemine tabi tutulan SVF örneklerinde, ayırma sonrası yapılan hücre sayımında başlangıçtaki hücre sayılarının yarıya yakın bir oranda azaldığı gözlemlendi. Ayırma sonrası kültür kaplarına ekimi yapılan hücrelerin, 1.grupta SVF hücrelerinin doğrudan kültüre alınıp büyütüldüğü kaplara kıyasla morfolojik olarak homojen bir görünümde olduğu gözlemlendi. Aynı hücreler ile yapılan in vitro ekspansiyon karşılaştırılmasında hücrelerin kaba yapışmasını takip eden günlerdeki hücresel gelişimde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Manyetik ayırma işlemi uygulanmadan doğrudan kültürü yapılan hücre grubunda morfolojik homojenite ancak 4. pasaj sonrasında sağlanabildi.

1. gruptaki hücrelerin primer kültür sonrası gerçekleştirilen ilk pasaj sırasında, tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırılarak süspansiyon halde toplanan hücrelerin bir kısmı farklı hücre yoğunluklarının adipoz-kaynaklı mezenkimal kök hücre ekspansiyonuna etkisinin tespit edilebilmesi amacı ile 25 cm² ve merkezi-kuyucuklu kültür kapları kullanılarak gerçekleştirilen konvansiyonel hücre kültür metoduna paralel olarak mikro kapiler metod kullanılarak büyütüldü.

Çizelge 4.1’de bu aşamada test edilen farklı in vitro ekspansiyon metodları için kullanılan farklı hücre yoğunlukları görülmektedir.

Çizelge 4.1 Mikro kapiler metodu ile konvansiyonel kültür karşılaştırılmasında kullanılan hücre yoğunlukları

	25cm ² kültür kabı	Merkezi-kuyucuklu kültür kabı	Mikro Kapiler Tüp
(hücre/ml)	50000	100	100
	1000	10	10

Konvansiyonel kültürde 25 cm²’lik kültür kaplarında 50.000 hücre/ml hücre yoğunluğu ile ekimi yapılan hücrelerin 24 saat sonrasında kabın yüzeyine tutunarak gelişmeye başladığı gözlemlendi. İlk pasajda farklı büyüklüklerde ve morfolojilerde oldukları gözlenen hücreler, ikinci pasajdan itibaren morfolojik olarak daha homojen bir yapı gösterdiler ve hücrelerin 7-10 gün içerisinde kabın yüzeyinin %80’lik bir kısmını kapladığı gözlemlendi. 3. ve 4. pasaj ve sonrasında ise kültürdeki hücreler morfolojik olarak homojen bir yapı gösterdiler. Alternatif olarak 1:50 oranında dilüe edilerek 1000 hücre/ml olarak ekim yapılan kültür kaplarındaki hücreler, aynı kültür takibi süresince paralel olarak işlendi ve gözlemlendi. Bu ikinci grupta, başlangıçta kabın tabanına tutunarak mezenkimal kök hücreye-benzer bir morfolojik yapı gösteren hücreler, kültürün ilerleyen dönemlerinde çoğalma göstermeyerek, hücrelerde genel olarak sitoplazmik granülasyon, canlılık kaybı ile sonuçlanan sitoplazmik uzantılar ve dejenerasyon işaretleri gözlemlendi.

Konvansiyonel kültürde merkezi-kuyucuklu kültür kaplarına 100 hücre/ml olarak ekim yapılan hücrelerin 25 cm²’lik kültür kaplarında olduğu gibi bulundukları kabın tabanına tutunarak çoğalmaya başladığı gözlemlendi. Mikroskopik inceleme sonrası hücrelerin literatürde tanımlanmış kök hücre morfolojisine sahip oldukları ve in vitro kültürde beklendiği şekilde çoğaldıkları, ilk aşamada 50000 hücre/ml olarak 25 cm²’lik kültür kabı içerisine ekimi yapılan hücreler ile benzer bir proliferasyon ve yoğunluk oluşturdıkları gözlemlendi. Merkezi-kuyucuklu kaplar içerisine 1:10 oranında dilüe

edilerek ekimi yapılan (10 hücre/ml yoğunlukta) hücrelerde ise, ilk grupta dilüe edilerek 25 cm²'lik kaplara ekimi yapılan hücrelere benzer şekilde gelişim durması ve dejenerasyon gözlemlendi. Bu grupta, takip sonrası verimli bir in vitro ekspansiyon ve adaptasyon elde edilemedi.

Merkezi-kuyucuklu kaplar ile aynı hücre yoğunluğu kullanılarak mikro kapiler metod ile cam kapiler tüplere ekimi yapılan hücrelerde ise her iki farklı yoğunlukta (100 hücre/ml ve 10 hücre/ml) da takip süresi sonunda hücrelerin eksponansiyel olarak çoğaldıkları, kök hücre-benzeri morfolojik yapılarını korudukları gözlemlendi. Bu gruplarda in vitro kültürün 11. gününde MKM metodu ile büyütülen hücreler pasajlanarak sırası ile merkezi-kuyucuklu kaplara ve 5-6 günlük bir in vitro kültür sonrasında ise 25 cm²'lik kültür kaplarına alınarak in vitro ekspansiyonları sağlandı.

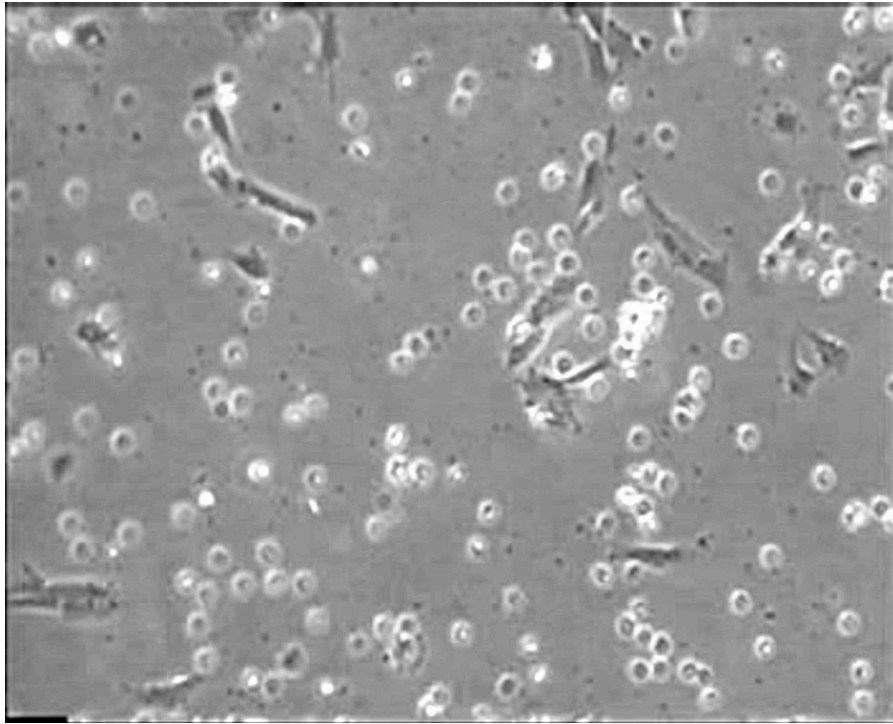
4.2. ADK-MKH'lerin Kök Hücre Olma Özellikleri Bakımından Karakterizasyonu

Çalışmanın bu aşamasında insan adipoz dokularından enzimatik ayrıştırma metodu ile elde edilmiş insan ADK-MKH'leri, literatürde bildirilmiş, mezenkimal kök hücre olarak adlandırılabilmek için hücrelerin sahip olması gereken minimum kriterler bakımından değerlendirildi [122], [123], [124].

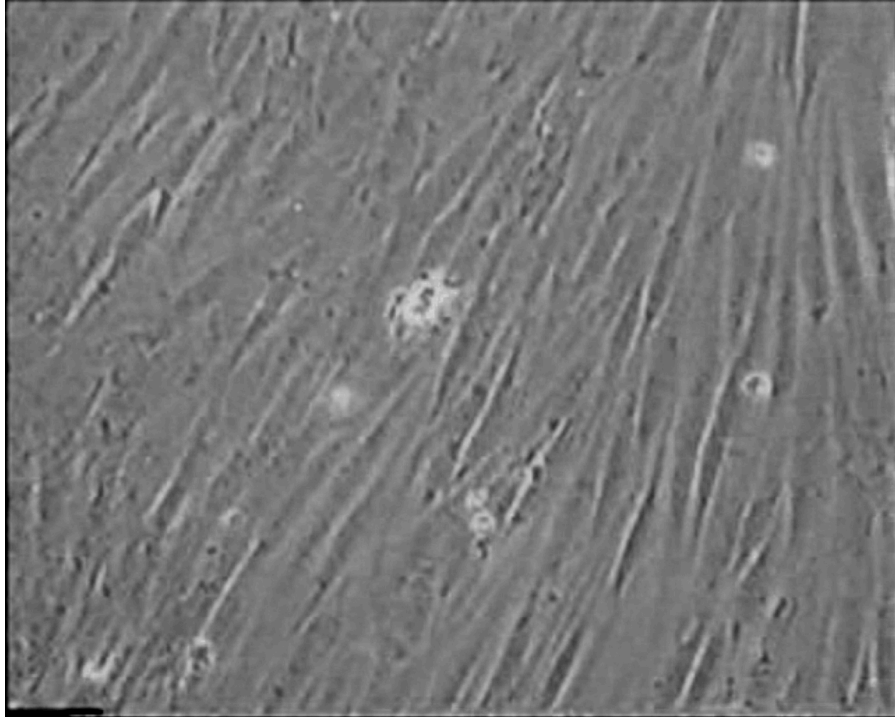
Hücreler ilk olarak mevcut kültür koşullarında farklı gelişim günlerinde faz kontrast mikroskobu altında hücresel gelişim ve morfoloji bakımından olarak incelendi. Primer pasajlarını (p=0) takiben, izolasyonu gerçekleştirilen tüm hücrelerin ardışık pasajlarda içinde büyütüldükleri kabın tabanına yapışarak fibroblastik hücre morfolojisi-benzeri bir yapıda gelişip çoğaldıkları gözlemlendi (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).

Hücreler bu süreçte ayrıca adipoz dokunun elde edilme yöntemine (lipoaspirasyon veya cerrahi eksizyon), SVF süspansiyonunun manyetik hücre ayrıştırma yöntemleri ile süzülüp süzülmemesine veya donör yaşına göre değerlendirildi ve değerlendirme sonrası gruplar arasında belirgin hücresel ve morfolojik farklılık olmadığı gözlemlendi. Gözlem yapılan dönemdeki (1. ve 10. pasaj aralığı) hücre gelişimi, hücre bölünmeleri ve morfolojilerinde de pasajlar arasında herhangi bir değişiklik (senesans, nekrotik ve apoptotik hücre oranlarında) gözlenmedi. Hücrelerin farklı pasaj aşamalarındaki faz kontrast mikroskobu altındaki görüntüleri Şekil 4.4 – Şekil 4.7'da gösterilmektedir. Aynı hücreler ile gerçekleştirilen immünofenotipleme çalışması sonrasında, elde

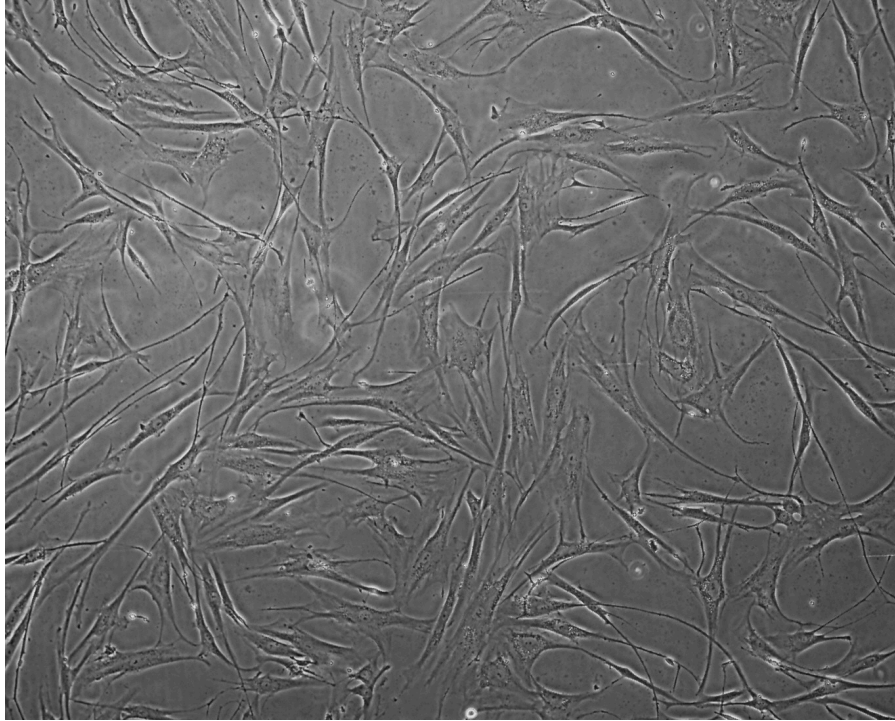
edilen hücrelerin kök hücre olma kriterlerinde belirtilen yüzey antijenleri yönünden (pozitif ve negatif) mevcut literatür ile uyumlu olduğu gözlemlendi. Çalışma dahilinde elde edilen farklı ADK-MKH'lerin immünofenotipleme sonrası akış sitometrisi bulguları Çizelge 4.2'te, pozitif/negatif yüzey antijenleri ile ilgili CD90, CD73, CD34 ve CD45'e ait örnek akış sitometrisi ölçümleri sonucu örnek görüntüleri Şekil 4.8'te gösterilmektedir.



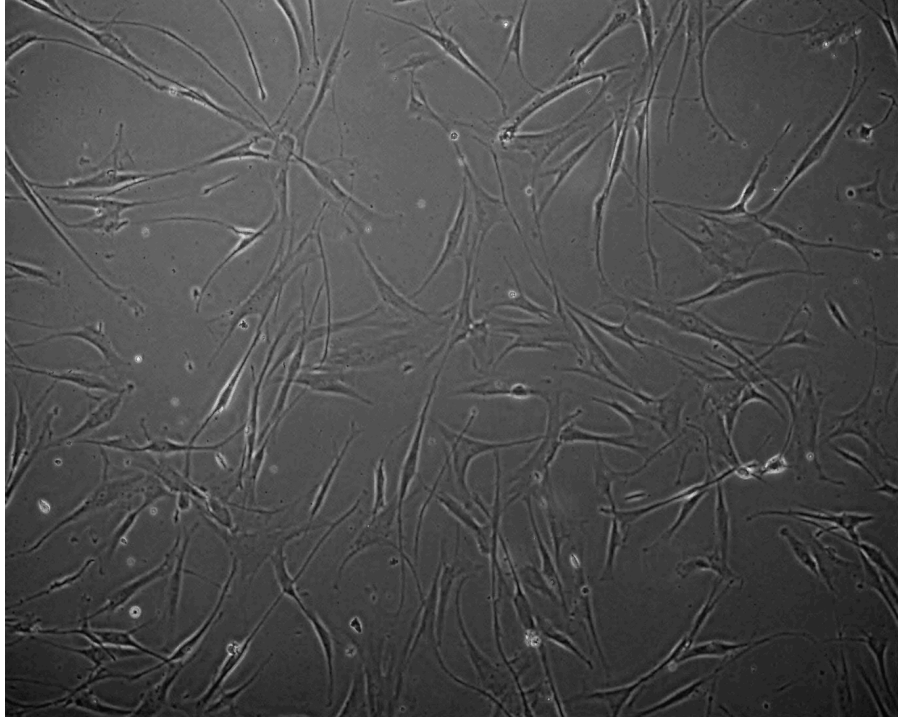
Şekil 4.2 ADK-MKH izolasyonu sonrası 24 saat sonraki hücre kültür görüntüsü



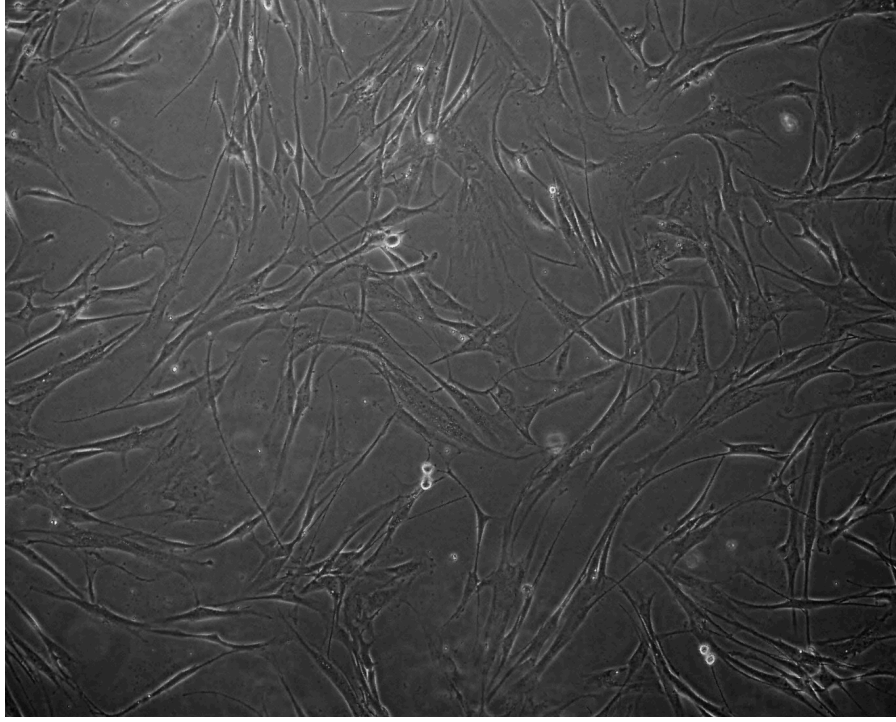
Şekil 4.3 ADK-MKH hücrelerinin in vitro ortamda 1 haftalık kültür sonrası kültür kabının tabanını kaplamış görüntüsü



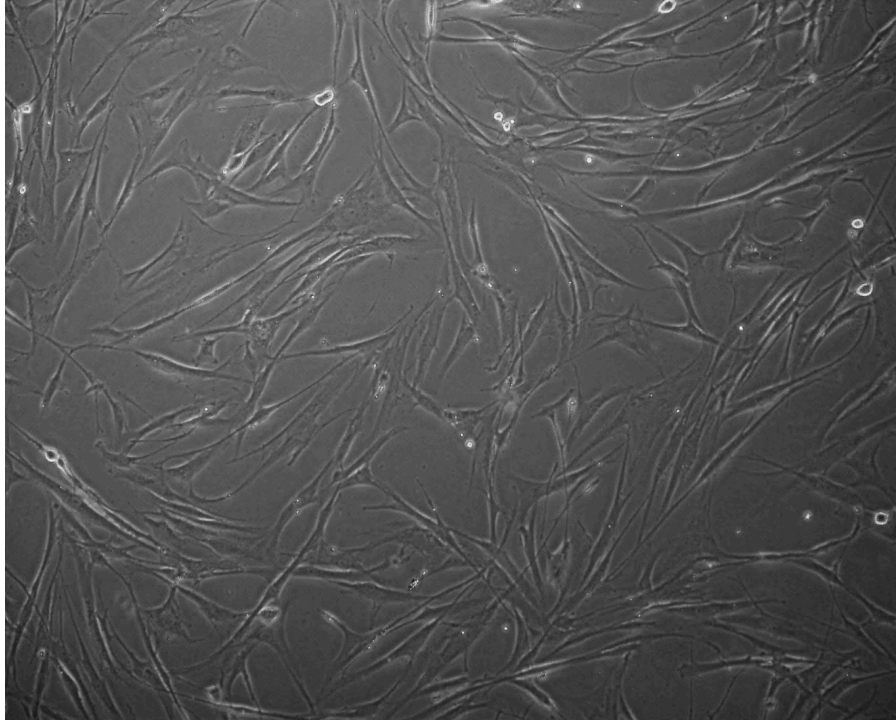
Şekil 4.4 ADK-MKH'lerin in vitro kültürü, 2.pasaj



Şekil 4.5 ADK-MKH'lerin in vitro kültürü, 4.pasaj



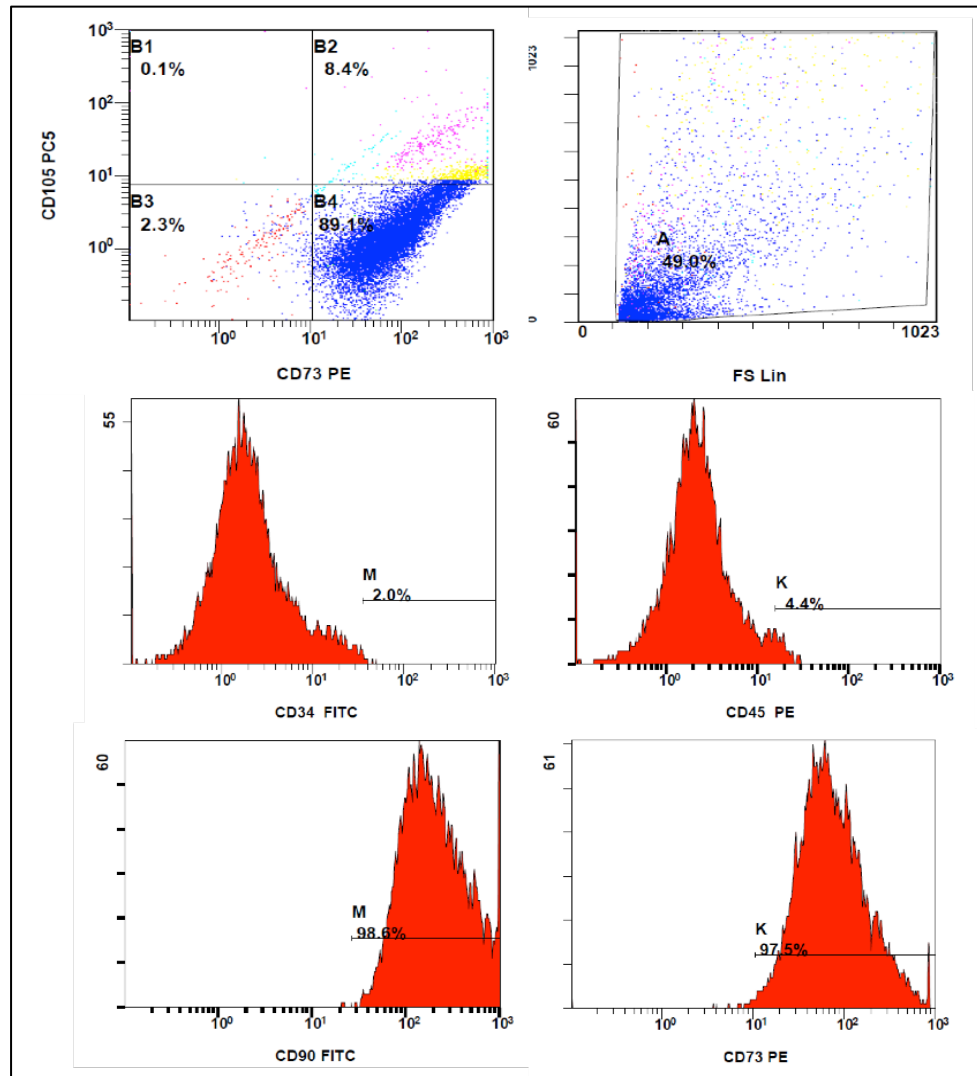
Şekil 4.6 ADK-MKH'lerin in vitro kültürü, 8.pasaj



Şekil 4.7 ADK-MKH'lerin in vitro kültürü, 10.pasaj

Çizelge 4.2 Çalışmada elde edilen farklı ADK-MKHLlara ait akış sitometrisi sonuçları

Yüzey Antijenleri	% pozitif (en düşük-enyüksek)
CD34	1,37 - 2,40
CD45	2,09 - 4,72
CD73	97,0 - 99,2
CD29 (IntergrinB1)	99,0 - 99,4
CD90 (Thy-1)	99,4 - 99,7

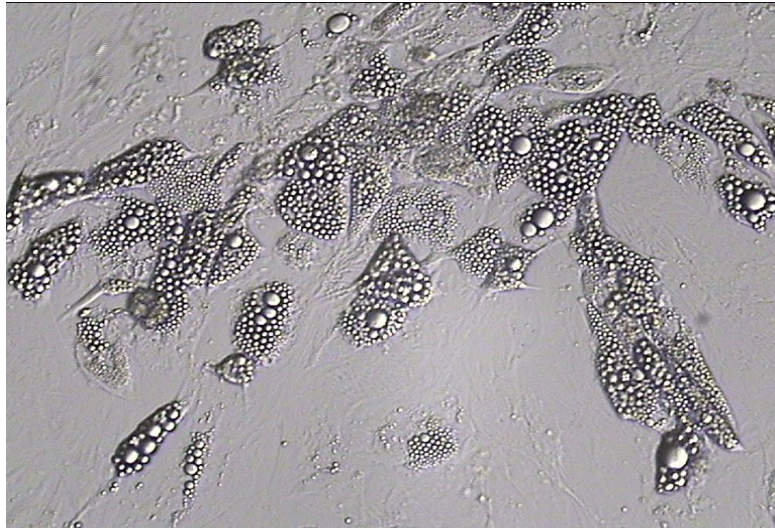


Şekil 4.8 Hücresel düzeyde inceleme aşamasında kullanılan ADK-MKH hücrelerinin akış sitometrisi sonuçları

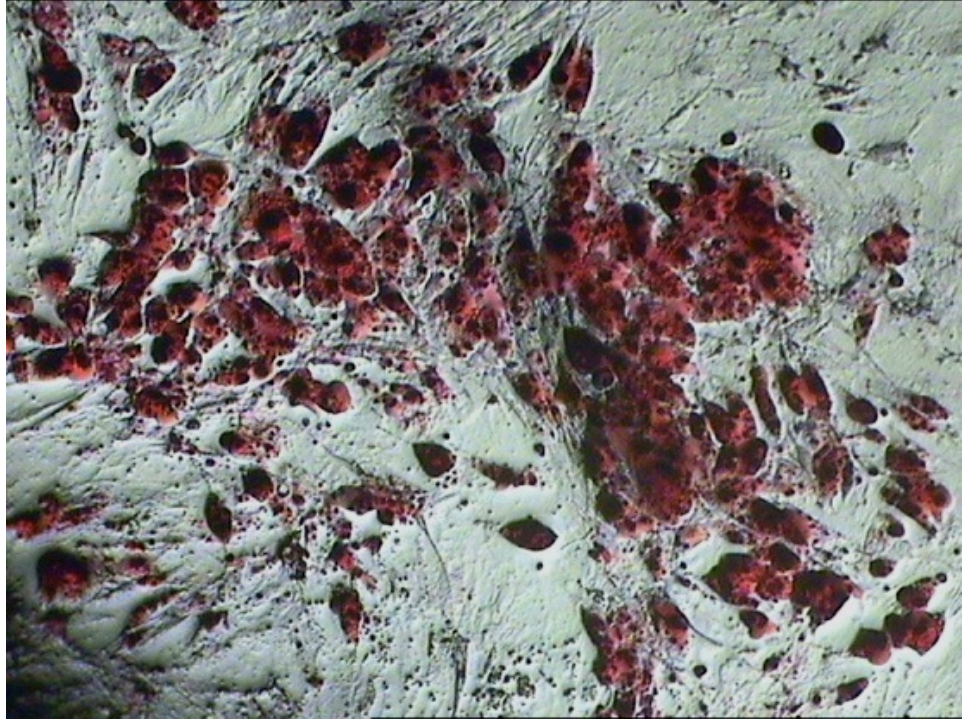
Son olarak, in vitro kültürü yapılan hücreler in vitro Şartlarda kemik, kıkırdak ve adiposit hücresine dönüşebilme potansiyelleri açısından değerlendirildiler. 14 günlük in vitro farklılaşma ortamında hücreler, kültüre edilmeleri sonrasında etkin bir Şekilde adipojenik, kondrojenik ve ostejenik yönde farklılaŐtılar. Şekil 4.9, 4.10 ve 4.11’de adipojenik farklılaŐmaya ait resimler görülmektedir.



Şekil 4.9 ADK-MKH’lerin IVD potansiyellerinin ölçülmesi - 14 günlük IVD sonrası kontrol grubu hücreleri



Şekil 4.10 14 günlük IVD sonrası adipojenik farklılaşma



Şekil 4.11 14 günlük IVD sonrası adipojenik farklılaşmanın Oil Red O boyaması sonrası görünümü

Bulgular doğrultusunda, çalışma kapsamında izole edilerek kültürü yapılan adipoz doku-kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin uluslararası kök hücre araştırmaları tarafından belirlenmiş “kök hücre olarak tanımlanabilme” kriterlerini sağladıkları gösterildi.

4.3 Kriyoprotektan Konsantrasyonunun ve Inkübasyon Süresinin Hücresel Düzeydeki Toksik Etkilerinin ADK-MKH’ler Kullanılarak İncelenmesi

Çalışmanın bu aşamasında, çalışma dahilinde test edilen protokollerde birincil kriyoprotektanlar olarak kullanılan DMSO ve Etilen glikol (EG) maddelerinin ADK-MKH hücrelerinin kriyoprezervasyonu sırasında oluşturabilecekleri sitotoksosite, genotoksosite ve olası farklı morfolojik etkileri, tripan mavisı boyaması, TUNEL DNA fragmentasyon testi ve rutin mikroskopik incelemeler doğrultusunda incelendi.

Bu amaçla, 7-10. pasaj aralığında büyütülen ADK-MKH hücreleri, büyütölmekte oldukları 25cm²’lik kültür kaplarından kaldırılarak planlanan deneyler kapsamında homojenize edildiler ve aşağıda detaylı olarak anlatıldığı şekilde incelendiler.

İlk olarak hücreler, dört grup halinde 4-kuyucuklu kaplar içerisinde (her bir grupta 5, toplamda 20 adet 4-kuyucuklu kap) ve her bir kuyucukta yaklaşık 50 bin hücre olacak şekilde eş zamanlı olarak ekildi ve gece boyunca büyütüldü. Ertesi gün tüm gruplardaki hücrelerin üzerindeki kültür mediumları aspire edildi ve yerlerine Çizelge 4.2’te belirtilen oranlarda DMSO ve EG içeren komplet kültür mediumu konuldu. Çizelge 4.3’de belirtilen gruplara göre ayrılmış kapların içerisindeki hücreler, belirtilen inkübasyon sürelerinin sonunda tripsin enzimi ile kaldırıldı. Hücre süspansiyonundan alınan 50 µl’lik örnekler ile Tripin mavisi boya dışlama testi kullanılarak hücre viabilitesi, TUNEL DNA fragmentasyon testi kullanılarak DNA hasarı ölçüldü.

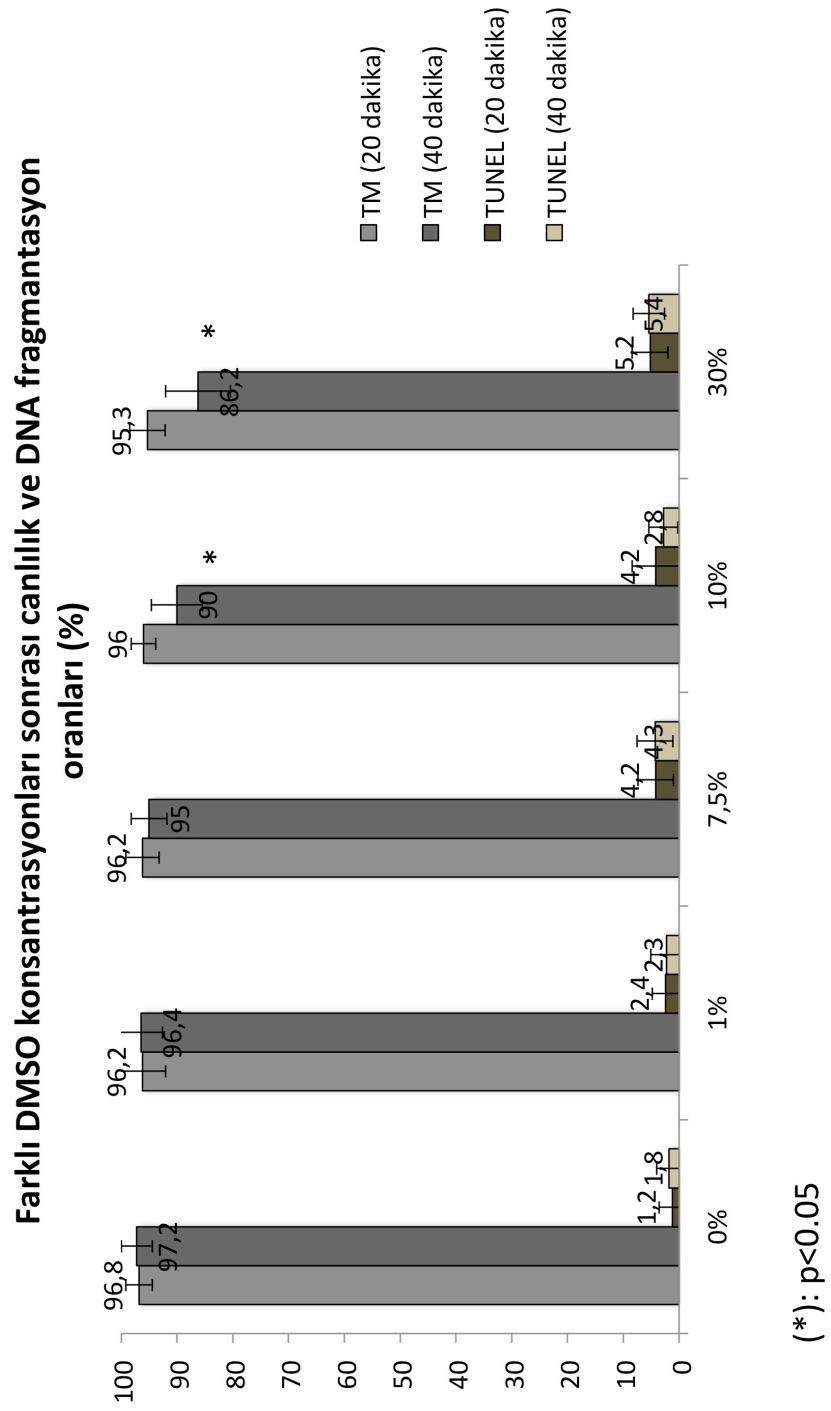
Çizelge 4.3 DMSO ve EG ile gerçekleştirilen toksisite testinde kullanılan farklı inkübasyon süreleri ve kriyoprotektan konsantrasyonları

Kriyoprotektan		İnkübasyon süresi	Test Konsantrasyonu				
DMSO	Grup 1	20 dak	-	%1	%7,5	%10	%30
	Grup 2	40 dak	-	%1	%7,5	%10	%30
EG	Grup 1	20 dak	-	%1	%7,5	%10	%30
	Grup 2	40 dak	-	%1	%7,5	%10	%30

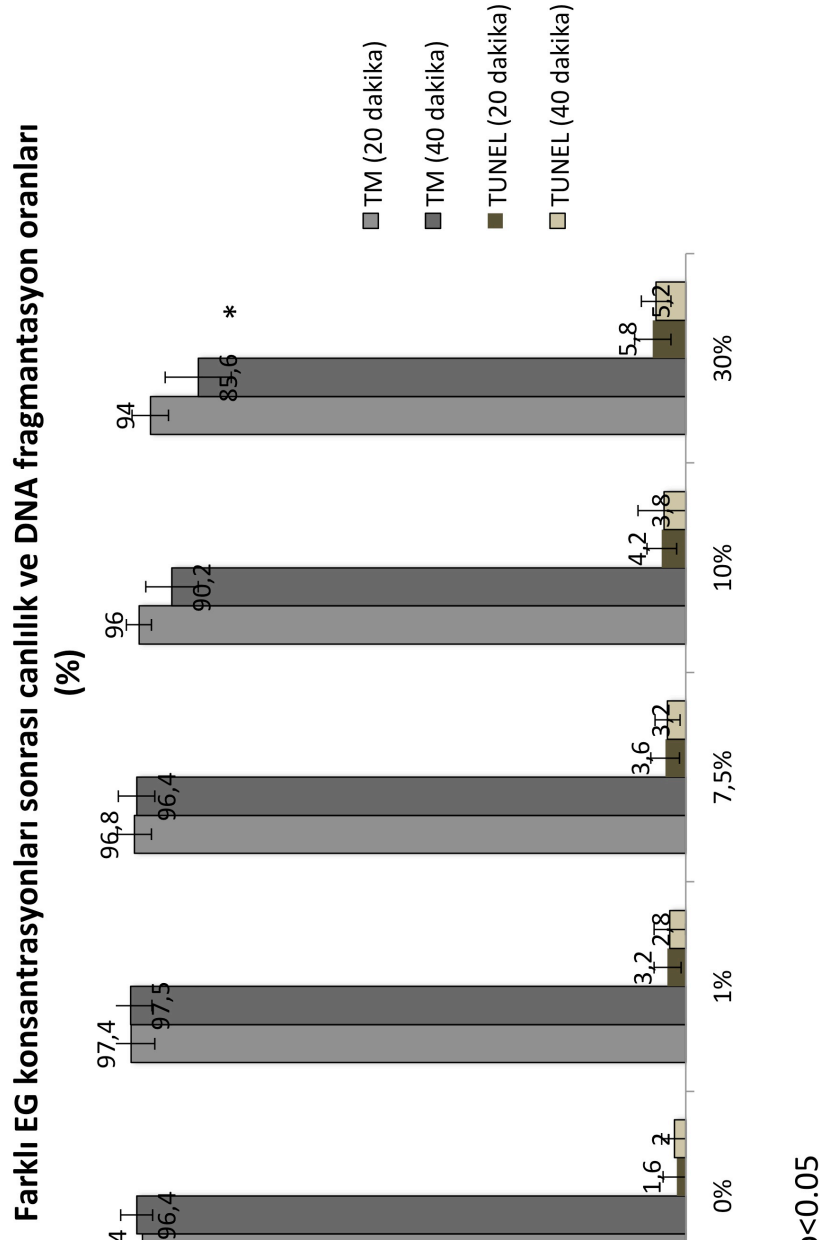
Deney kapsamında farklı kriyoprotektan konsantrasyonları ve süreleri ile inkübasyon sonrası hücrelerde incelenen parametrelere göre hücreler üzerinde anlamlı herhangi bir morfolojik değişikliğe/bulguya rastlanılmadı. Analiz sonrası elde edilen hücresel canlılık ve DNA fragmentasyon oranları Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’te görülmektedir.

Farklı konsantrasyondaki DMSO ile bizzat karşı karşıya kalan hücreler arasında vitalite sonuçları 20 dakikalık inkübasyon süreleri arasında değişiklik göstermezken, 40 dakikalık inkübasyon sonrasında %10 ve üzeri konsantrasyonda kriyoprotektan içeren gruplarda %6-8’lik ve istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü.

EG için 20 dakikalık inkübasyon sürelerinde hücresel canlılık oranları arasında fark gözlenmedi. Bununla birlikte 40 dakikalık inkübasyon sürelerinin sonunda %30’luk EG ile inkübe edilen hücrelerden elde edilen canlılık oranlarında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi.



Şekil 4.12 Farklı DMSO konsantrasyonu ve inkübasyon sürelerine göre hücresel canlılığın ve DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi

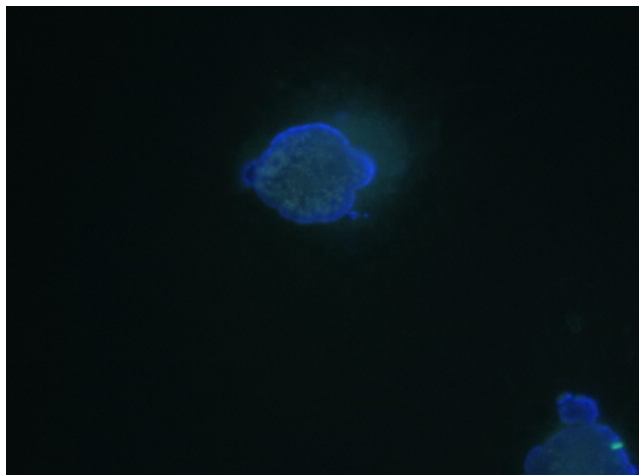


Şekil 4.13 Farklı EG konsantrasyonu ve inkübasyon sürelerine göre hücresel canlılığın ve DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi

Vitalite testi ile aynı deney planı çerçevesinde gerçekleştirilen TUNEL DNA fragmentasyon testi sonuçlarında da incelenen tüm ana ve altgruplarda DNA fragmentasyon oranının %1.2 ile %5.6 arasında değiştiği tespit edildi. Bununla birlikte incelenen farklı konsantrasyonlar ve inkübasyon sürelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. TUNEL testi sonrası negatif (DNA hasarı bulgusuna rastlanılmayan) ve pozitif (DNA yapısal hasar bulgusa rastlanılmış) hücre çekirdeği görüntüleri sırası ile Şekil 4.14 te ve Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14 TUNEL test sonrası DNA fragmentasyonu göstermeyen bir insan ADK-MKH nükleus görüntüsü

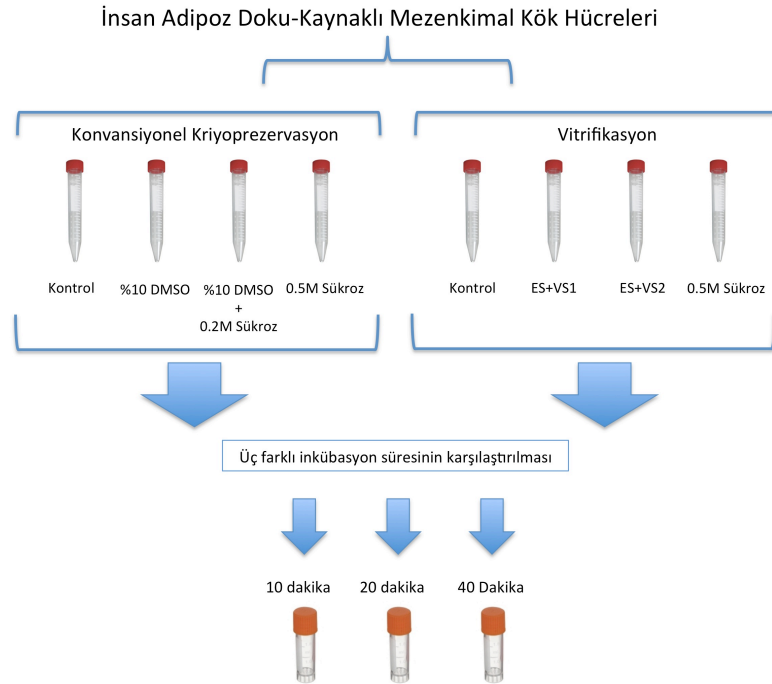


Şekil 4.15 TUNEL test sonrası DNA fragmentasyonu gösteren bir insan ADK-MKH nükleus görüntüsü

Bu bulgulara göre gerek DMSO, gerekse EG ajanlarının artan konsantrasyonlarının ve 20 dakikaya kadar olan inkübasyon sürelerinin, hücrelerde yapısal, fiziksel ve işlevsel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadığı tespit edildi. 40 dakika inkübasyon sonrası her iki grupta da gözlenen canlılık oranlarındaki azalmaya karşın TUNEL testi bulguları 40 dakikalık inkübasyon sonrası tüm gruplardaki DNA hasarları oranlarının benzer ve düşük düzeyde olduğunu gösterdi.

4.4 Kriyoprotektan Kokteyllerinin ve İnkübasyon Süresinin Hücresel Düzeydeki Toksik Etkilerinin ADK-MKH'ler Kullanılarak İncelenmesi

Çalışma dahilinde aşamalı yavaş dondurma ve vitrifikasyon protokolleri içerisinde kullanılması planlanan kriyoprotektan kokteyllerinin ADK-MKH hücreleri üzerinde oluşturabilecekleri sitotoksosite, genotoksosite ve olası farklı morfolojik etkiler, iki farklı dondurma tekniği ve üç farklı inkübasyon süresi bakımından (t=10 dakika, t=20 dakika ve t=40 dakika) tripan mavisi boyaması, TUNEL DNA fragmentasyon testi ve rutin mikroskopik inceleme yöntemleri ile Şekil 4.16 gösterildiği çalışma planı doğrultusunda incelendi.



Şekil 4.16 Hücre düzeyinde toksisite incelemesi çalışma planı

Kriyoprotektan ile inkübasyon sürecinde, aşamalı yavaş dondurma yaklaşımı uygulanan ve farklı kriyoprotektanlar ile muamele edilen hücrelerde morfolojik olarak gruplar arası belirgin farklılıklar gözlenmedi.

Aşamalı yavaş dondurma protokolü dahilinde kullanılan farklı kriyoprotektan ve kokteyllere ait viabilite sonuçları Çizelge 4.4'te gösterilmektedir.

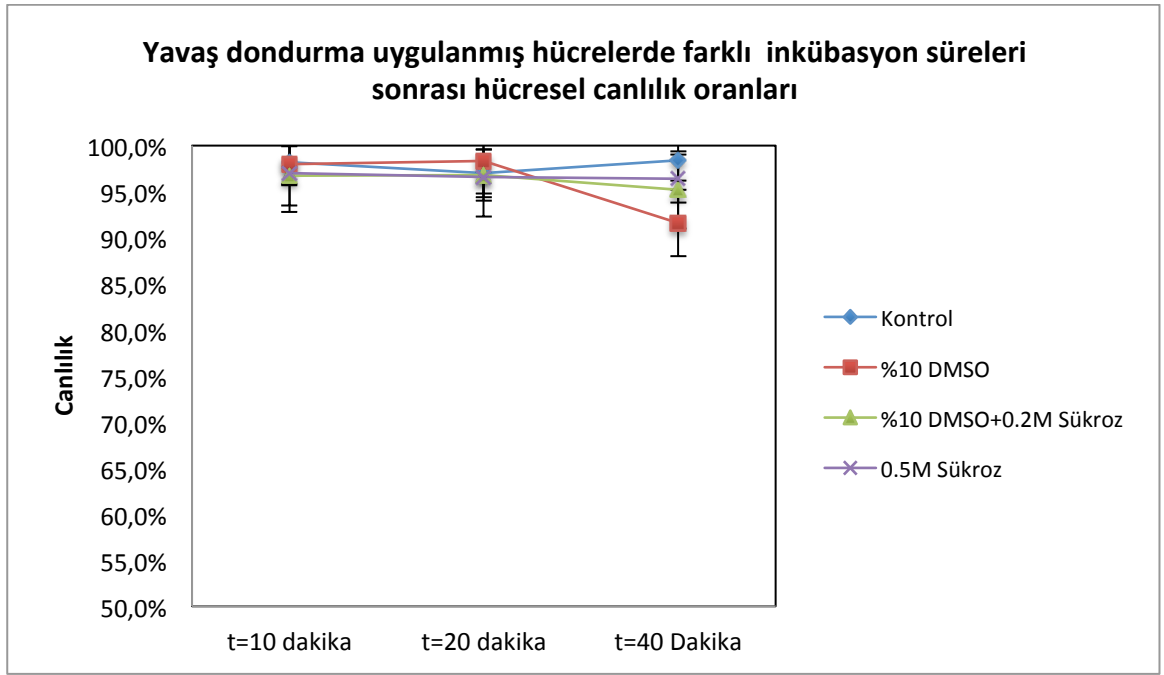
Çizelge 4.4 Aşamalı yavaş dondurma yöntemi ile kriyoprezervasyon öncesi kriyoprotektan ile farklı inkübasyon sürelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi

Hücre sel canlılık (*) (%)	Kontrol	%10 DMSO	%10DMSO+ 0,2M Sükroz	0,5M Sükroz
t ₁₀ dakika	98,2±2,4	98,0±2,3	96,7±3,2	97,0±4,2
t ₂₀ dakika	97,0±2,6	98,3±3,5	96,8±2,8	96,6±4,3
t ₄₀ dakika	98,4±2,2	91,6±3,6 (**)	95,2±2,2	96,4±2,6

(*) Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. (**): p<0.05

Bu aşamada sonuçlar bir önceki deneyde farklı konsantrasyonlardaki DMSO ve inkübasyon süreleri ile elde edilen hücre sel canlılık sonuçlarına benzer bulundu. Tüm gruplarda 10, 20 ve 40 dakikalık inkübasyon sonrasında yüksek canlılık gözlemlendi, bununla birlikte 40 dakikalık inkübasyon sonrasında %10 DMSO kullanılan grupta anlamlı bir viabilite düşüklüğü saptandı. Şekil 4.17'te aşamalı yavaş dondurma uygulanan grupta elde edilen sonuçlar grafik olarak gösterilmektedir. Dolayısı ile çalışma kapsamında aşamalı yavaş dondurma uygulanan grupta kullanılan kriyoprotektan konsantrasyonlarının değişen inkübasyon süreleri sonunda hücre viabilitesinde herhangi bir değişiklik oluşturmadığı gösterildi.

Vitrifikasyon protokolü dahilinde kullanılan farklı kriyoprotektan ve kokteyllere ait viabilite sonuçları Çizelge 4.5'te gösterilmektedir.



Şekil 4.17 Aşamalı yavaş dondurma yöntemi ile kriyoprezervasyon öncesi kriyoprotektan inkübasyon sürelerinin hücresel canlılık üzerine etkisi

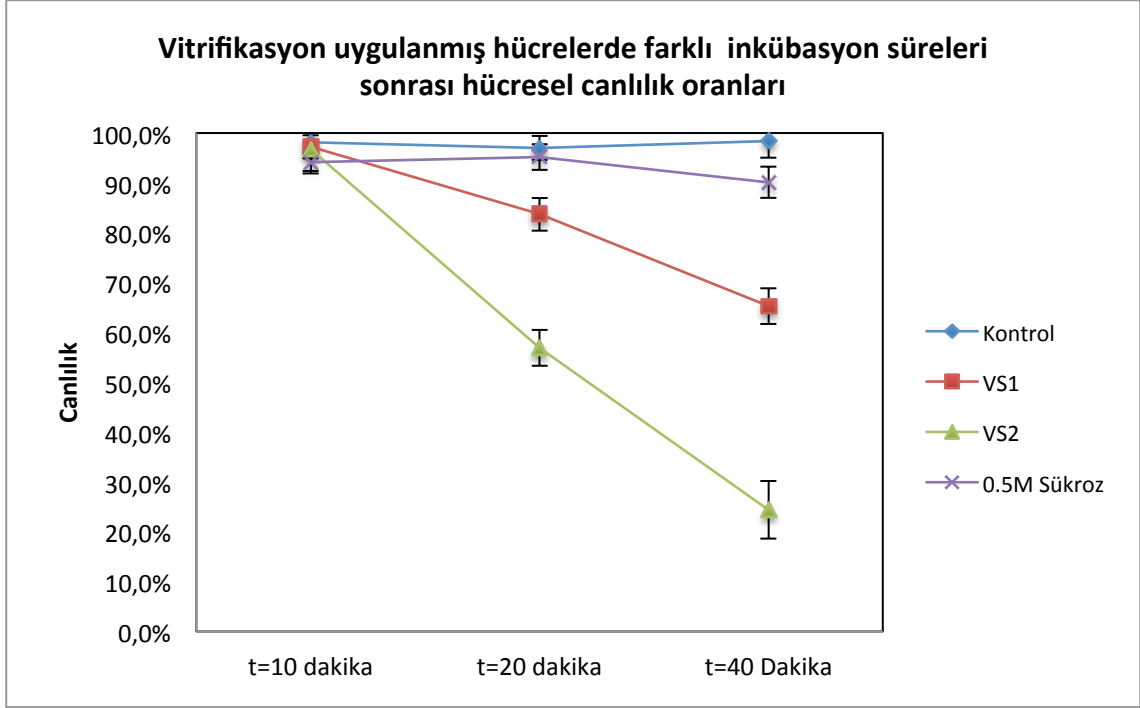
Çizelge 4.5 Vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezervasyon öncesi farklı dengeleme sürelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi

Hücresel canlılık (*) (%)	Kontrol	VS1	VS2	0,5M Sükroz
t ₁₀ dakika	98,2±2,2	97,2±2,3	96,7±4,3	94,2±2,3
t ₂₀ dakika	97,0±2,4	83,7±3,3 ^(*)	56,2±3,6 ^(**)	95,2±2,6
t ₄₀ dakika	98,4±3,4	65,3±3,6 ^(*)	24,4±5,8 ^(**)	90,1±3,1 ^(**)

(*) Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. (**): p<0.05

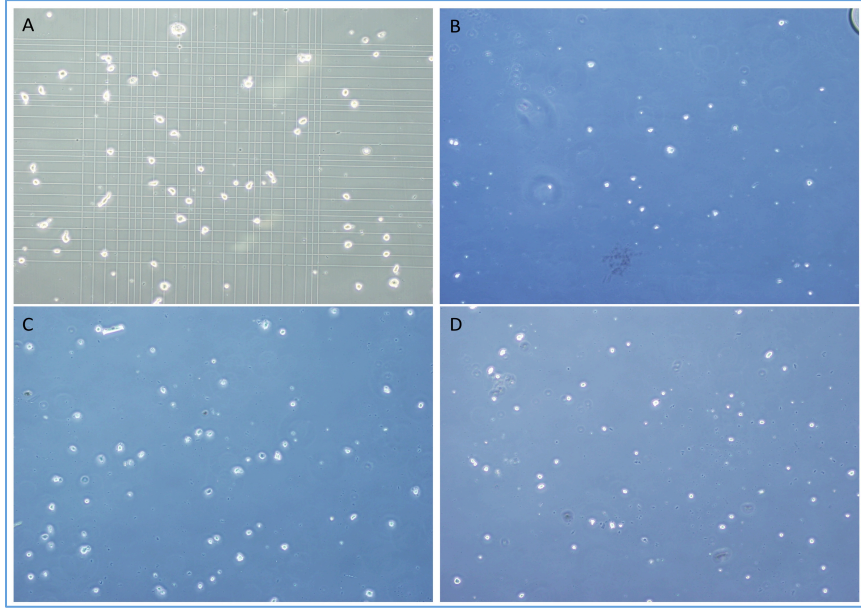
Vitrifikasyon grubunda, kriyoprezervasyon amaçlı soğutma işlemlerinin başlangıç noktası olan t₀ zamanında metilen mavisi ile hemositometre kullanılarak ölçülen hücresel canlılık değerleri tüm gruplar için benzer iken, inkübasyon zamanı ilerledikçe özellikle yüksek konsantrasyonda DMSO ve Etilen Glikol içeren VS1 ve VS2

solüsyonlarında inkübe edilen hücrelerin canlılık seviyelerinde Şekil 4.18'te belirtildiği şekilde belirgin azalmalar gözlemlendi. Bu azalmanın, özellikle VS1 ve VS2 solüsyonu içerisindeki hücreler için t_{20} zamanından başlayarak anlamlı olarak düşük olduğu görüldü.



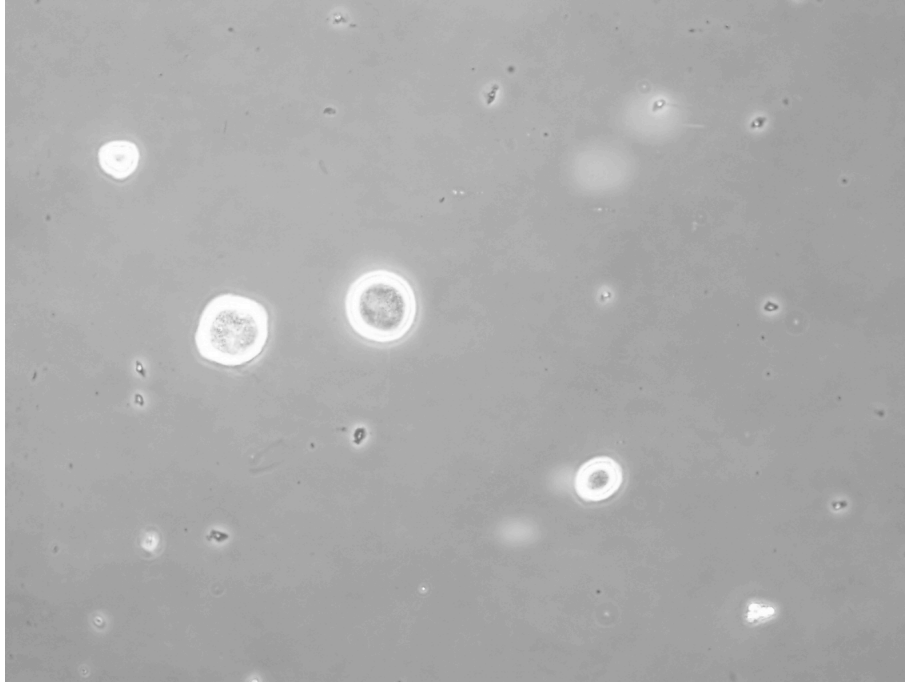
Şekil 4.18 Vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyon öncesi farklı kriyoprotektan ile inkübasyon sürelerinin hücresel canlılık üzerindeki etkisi

Deney dahilinde yüksek konsantrasyondaki kriyoprotektanlardan oluşan kokteyller ile inkübe edilen hücrelerde ilk 10 dakika süresince canlılık düzeylerinde herhangi bir farklılık görülmemesine rağmen (Şekil 4.19), sitoplazmik büzölmeler ve yapısal şekil bozuklukları kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti. Gruplar arası yapılan karşılaştırmalarda, yapısal değişikliklerin bir kısmının, solüsyonların içerdiği yüksek konsantrasyondaki sükroza bağlı olduğu anlaşıldı. Bununla birlikte, t_{20} zamanından itibaren özellikle VS2 grubundaki hücrelerdeki yüksek kriyoprotektan ve ozmotik stres seviyelerine bağlı oluşan toksik etkinin kendini hücre morfolojisi üzerinde de göstermeye başladığı, hücrelerdeki nekroza benzer sitoplazmik tomurcuklanmalar ve canlılık kaybının belirgin olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 4.20 - 4.29).

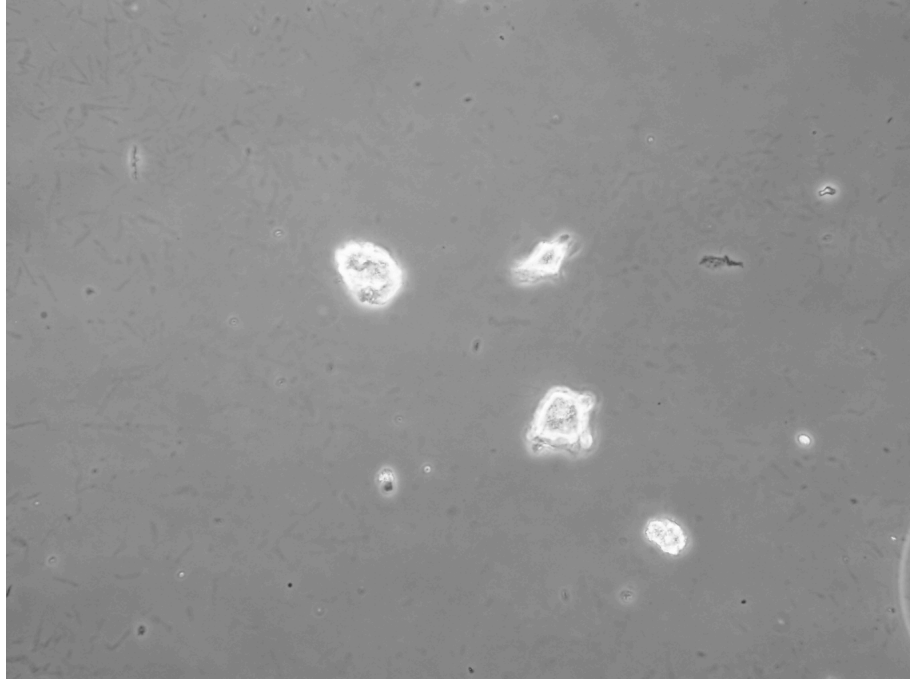


Şekil 4.19 Kriyoprezervasyon öncesi farklı kriyoprotektanlar ile inkübasyon sonrası canlılık değ erlendirmesi (t=10 dakika)

A) Kontrol; B) VS1; C) VS2; D) 0,5M Sükroz



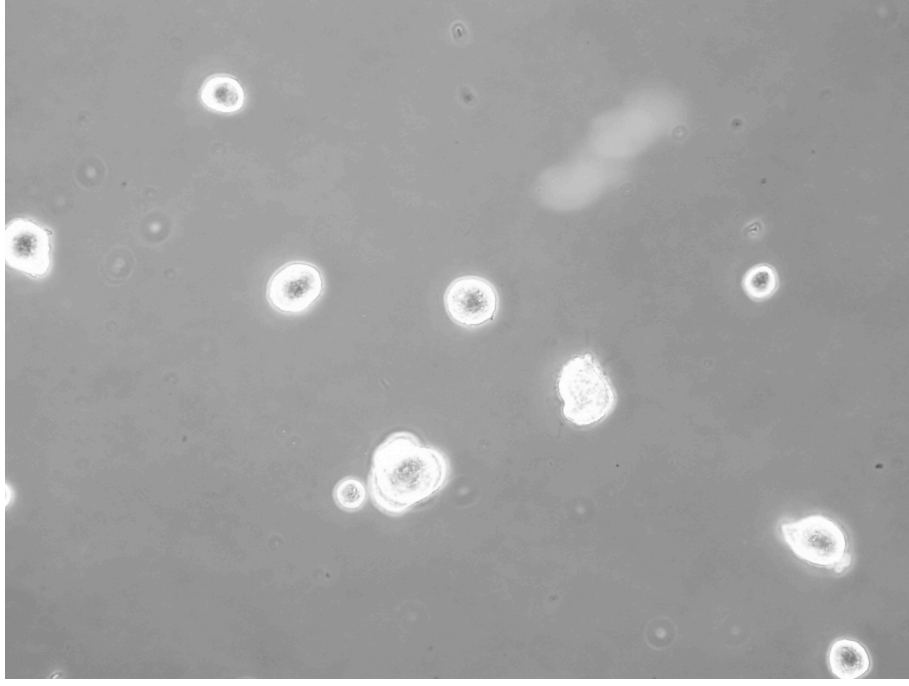
Şekil 4.20 Dengeleme solüsyonu ile 20 dakika inkübasyon sonrası- Kontrol grubu hücreleri (40X)



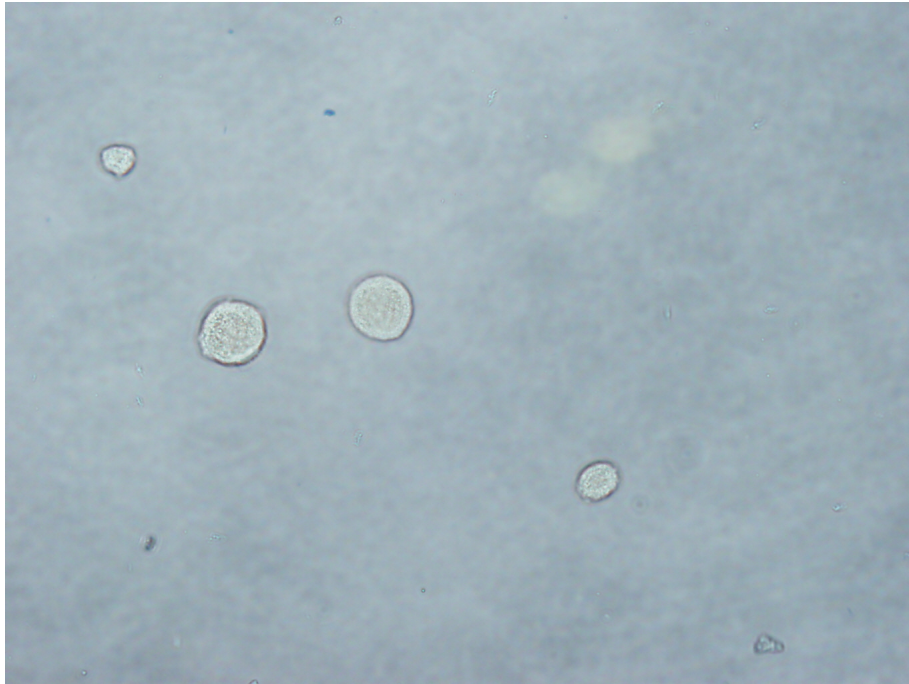
Şekil 4.21 Dengeleme solüsyonu ile 20 dakika inkübasyon sonrası-VS1 grubu hücreleri (40X)



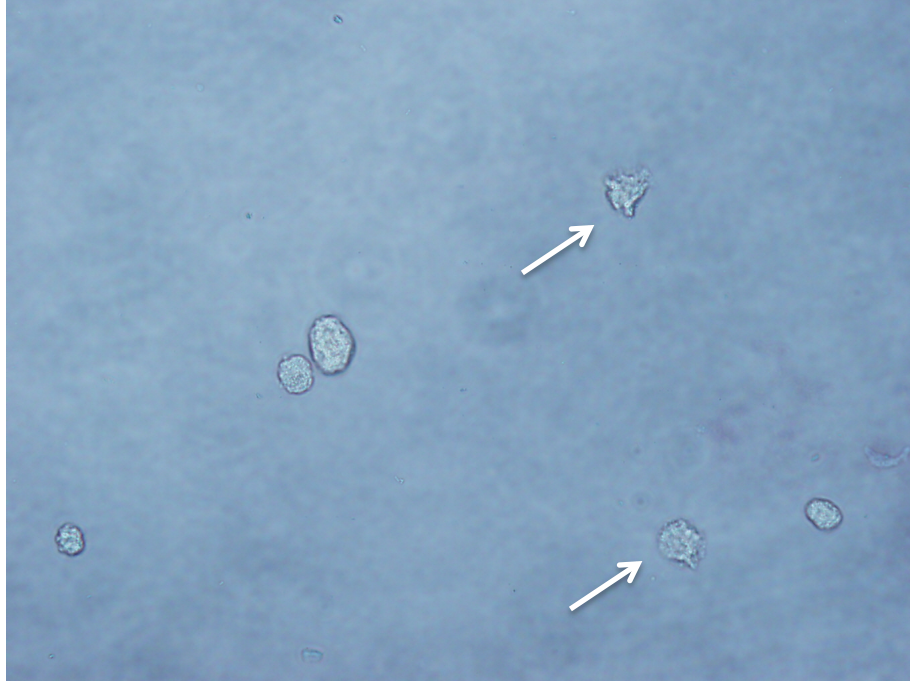
Şekil 4.22 Dengeleme solüsyonu ile 20 dakika inkübasyon sonrası -VS2 grubu hücreleri (40X)



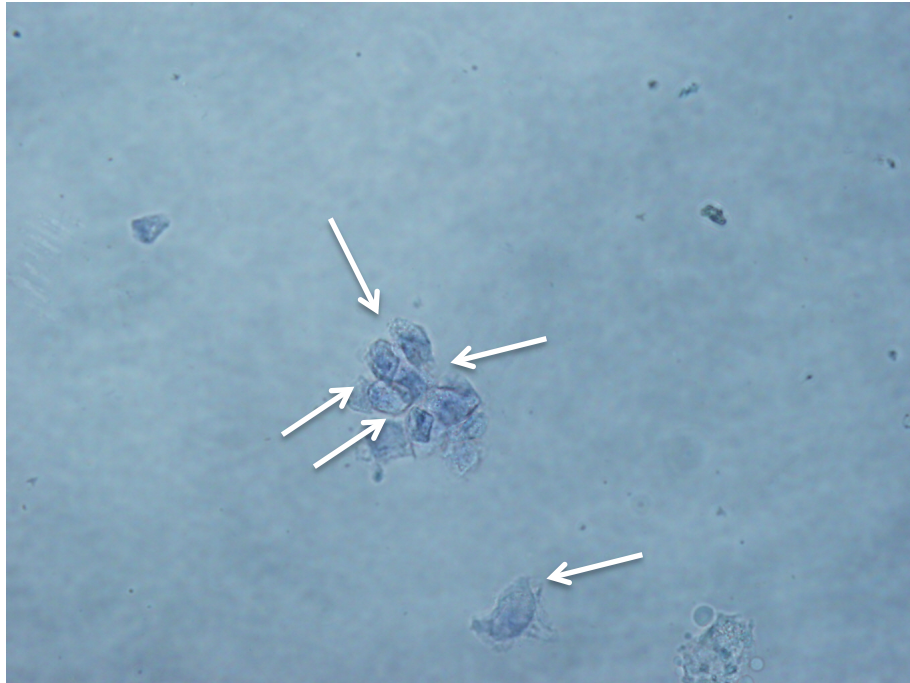
Şekil 4.23 Dengeleme solüsyonu ile 20 dakika inkübasyon sonrası-0,5M süktroz grubu hücreleri (40X)



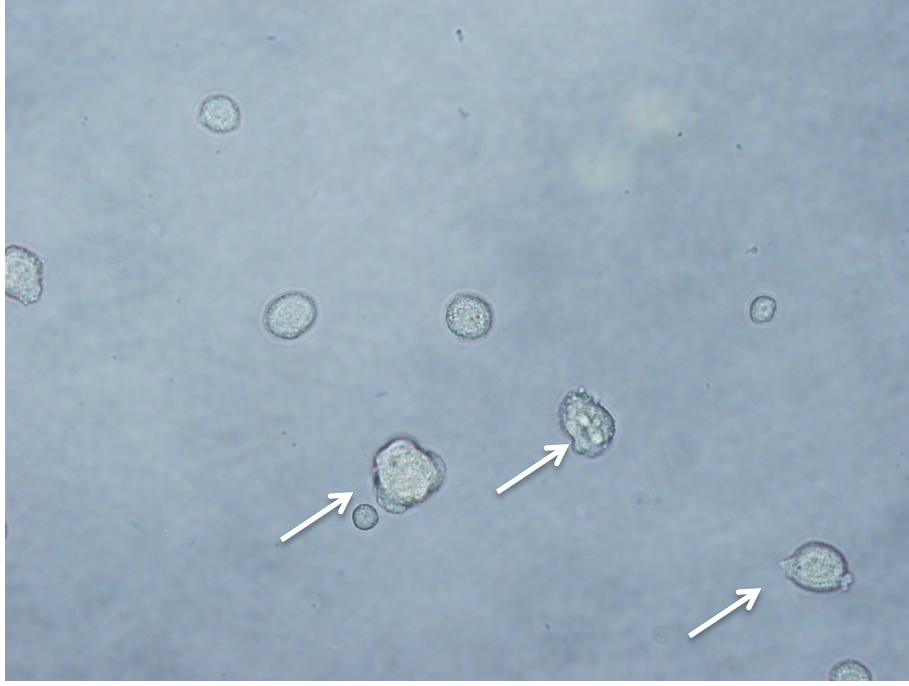
Şekil 4.24 Dengeleme solüsyonu ile 40 dakika inkübasyon sonrası-kontrol grubu hücreleri (40X)



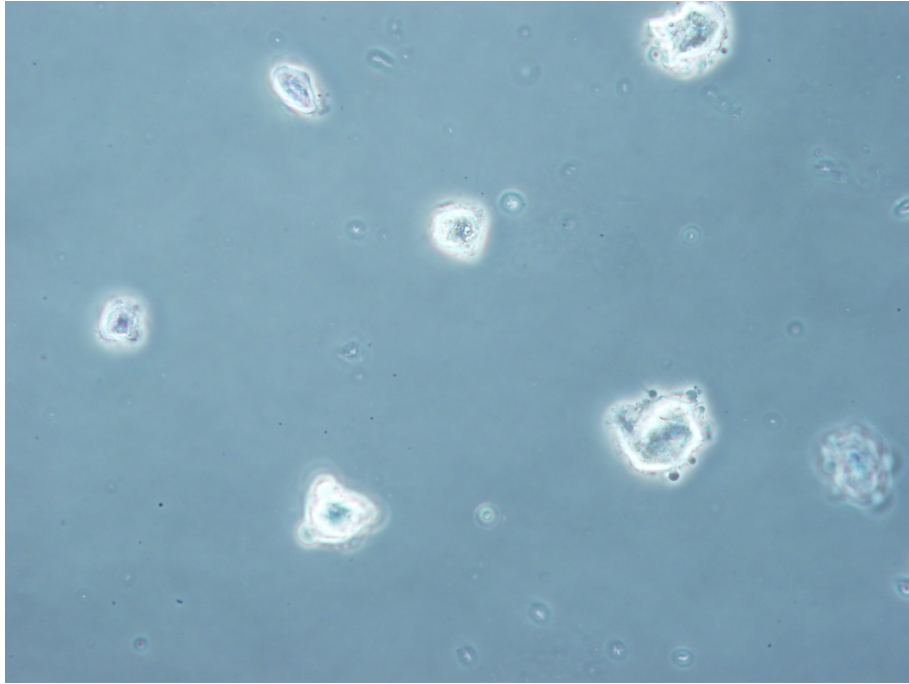
Şekil 4.25 Dengeleme solüsyonu ile 40 dakika inkübasyon sonrası-VS1 grubu hücreleri (40X)



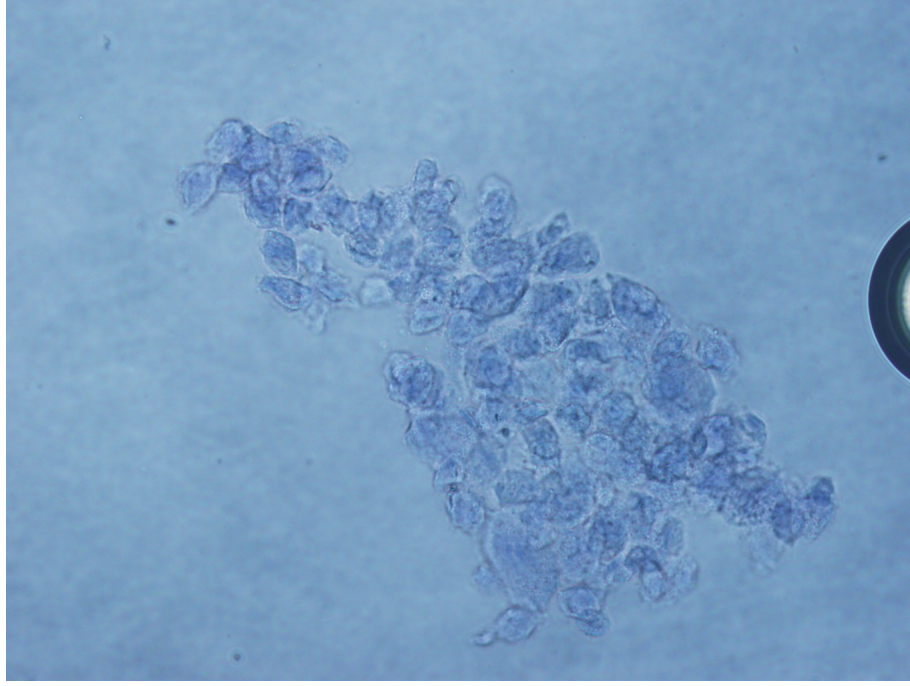
Şekil 4.26 Dengeleme solüsyonu ile 40 dakika inkübasyon sonrası-VS2 grubu hücreleri (40X)



Şekil 4.27 Dengeleme solüsyonu ile 40 dakika inkübasyon sonrası-0,5M süktroz grubu hücreleri (40X)



Şekil 4.28 VS2 grubunda 40 dakika dengeleme solüsyonu ile inkübasyon sonrası hücrelerde gözlenen sitoplazmik tomurcuklanma



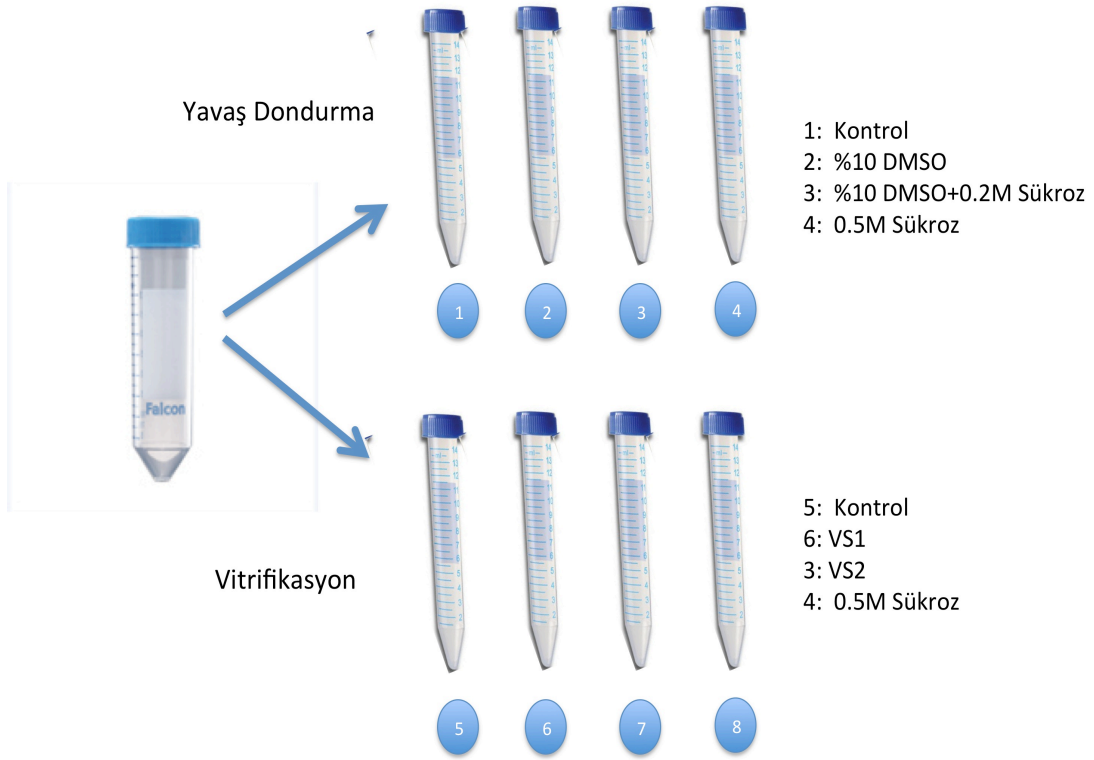
Şekil 4.29 VS2 grubunda 40 dakika dengeleme solüsyonu ile inkübasyon sonrası hücrelerin tripan mavisi boyaması ile canlılık değerlendirmesi

Bu sonuçlara göre vitrifikasyon için kullanılan VS1 ve VS2 kriyoprotektan kokteyllerinin 10 dakikadan fazla inkübasyon süreleri için ADK-MKH hücreleri üzerinde belirgin bir sitotoksik etki gösterdiği belirlendi.

4.5 İki Farklı Metod ile Dondurulan ADK-MKH'lerin Çözme Sonrası Canlılık, İn Vitro Ekspansiyon ve İn vitro Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

Önceki aşamalardaki bulgulara dayanarak çalışma kapsamında elde edilen ve büyütüldükleri kültür kabının %90'ını kaplamış olan 10. Pasaj aşamasındaki ADK-MKH hücreleri, Tripsin-EDTA kullanılarak bulundukları kapların yüzeyinden kaldırıldı, 300g 'de 10 dakika santrifüj edilerek tek bir tüpte toplandı. Hücreler daha sonra Şekil 5.30'da belirtilen deney planına göre 8 farklı grupta donduruldular ve -196°C'de 1 hafta boyunca saklandılar.

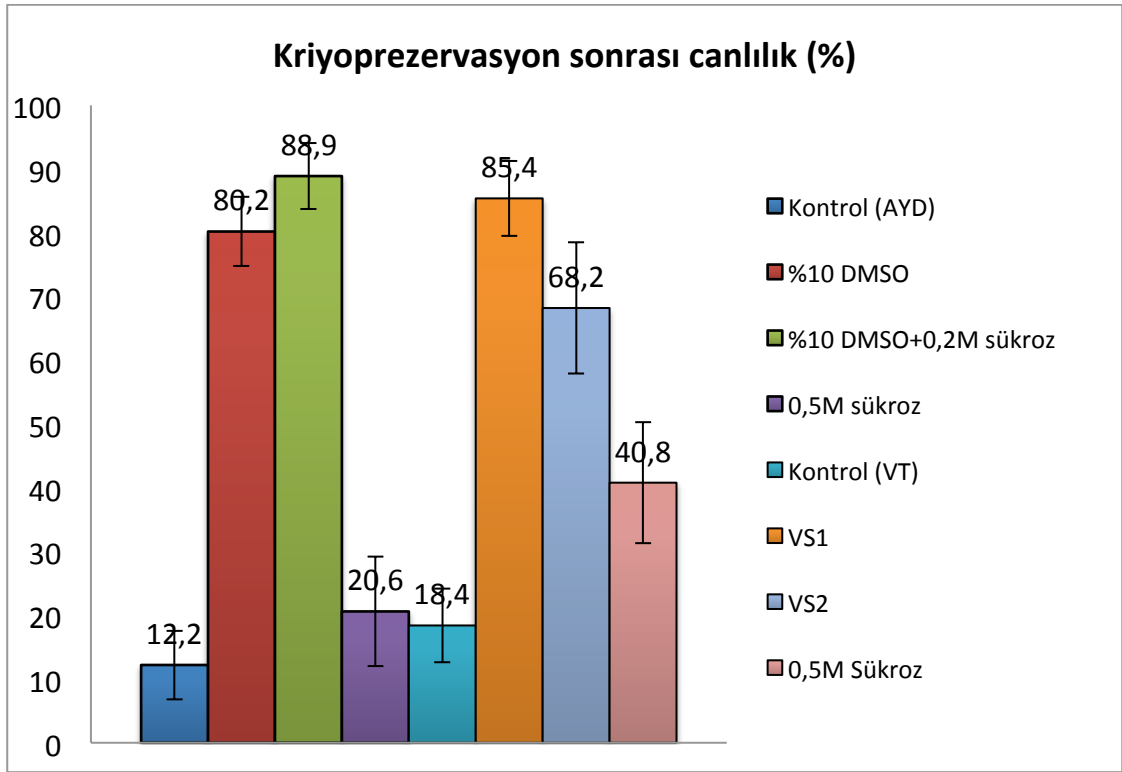
Saklama süresinin sonunda hücreler kullanılan tekniğe uygun şekilde çözülerek çözme sonrası viabiliteleri tripan mavisi testi ile incelendi.



Şekil 4.30 ADK-MKH'lerin farklı dondurma protokollerine göre gruplanması ve kriyoprezervasyonu

Şekil 4.31'da taze dokudan izole edilmiş ADK-MKH hücrelerinin deney planına göre 8 ayrı grupta dondurularak çözülmesi sonrasında elde edilen canlılık oranları gösterilmektedir. Her iki grupta da (aşamalı yavaş dondurma ve vitrifikasyon) kontrol grubu olarak dondurulup çözülen hücrelerde viabilitenin dramatik olarak düşük seviyelerde olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında en yüksek canlılık oranları sırası ile %10 DMSO+0,2M süzkroz grubu > VS1 grubu > %10 DMSO grubu > VS2 grubu şeklinde idi.

Kriyoprotektan olarak 0,5M süzkroz'un kullanıldığı hücreler ile gerçekleştirilen aşamalı yavaş dondurma ve vitrifikasyon uygulamalarında, çözme sonrası vitrifikasyon uygulanan grupta anlamlı olarak daha yüksek oranda canlı hücre elde edildi.

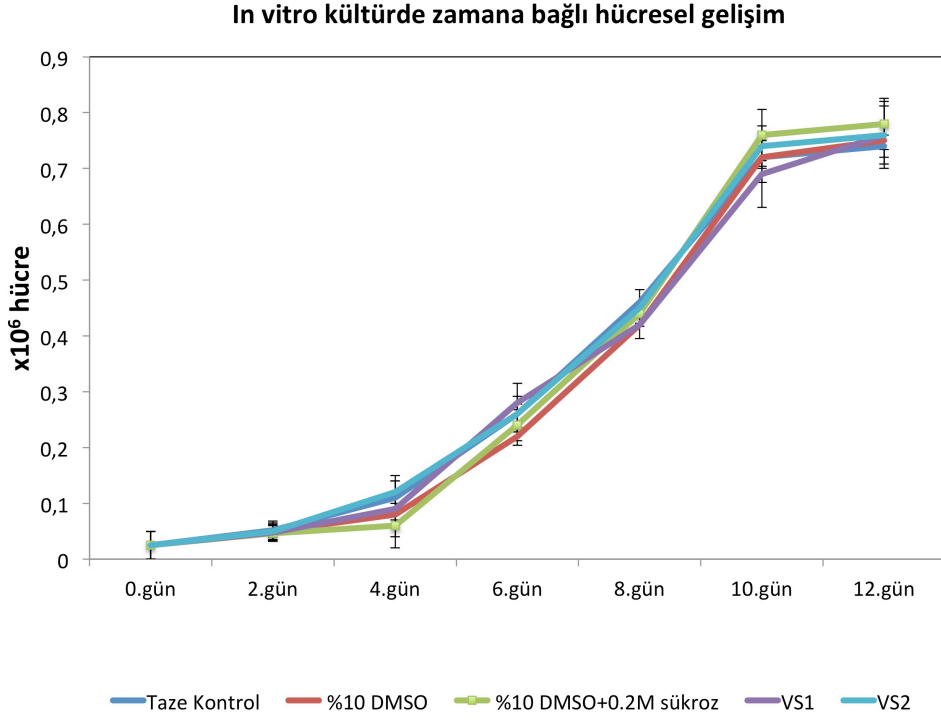


Şekil 4.31 Aşamalı yavaş dondurma ve vitrifikasyon ile kriyoprezervasyon uygulanan ADK-MKH'lerin çözme sonrası canlılık değerlendirilmesi

Çözme sonrası viabilite değerlendirmeleri yapılan hücreler 25cm² kültür kapları içerisine alınarak 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatör ortamında kültür edildi. Yaklaşık 4 günlük kültür süresi sonunda kontrol grubu ve 0,5M sükröz grubu hücrelerinde yeterli hücre gelişimi gözlenmediğinden çalışma dışı bırakıldı. Diğer kültür kaplarında hücreler kültür kaplarının yüzeylerini %90 kaplamalarını müteakip in vitro ekspansiyon incelemesine tabi tutuldular. Bu amaçla ilgili gruplara ait hücreler tripsin-EDTA solüsyonu ile pasajlanarak her bir kültür kabı içerisinde yaklaşık 25.000 hücre olacak şekilde 6 adet 25 cm²'lik kültür kabına ekim yapıldı. Ekim yapılan gün 0.gün olarak belirlendi ve sonrasında her 2 günde bir kültür kaplarındaki hücreler Tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırılarak hücre sayımı yapıldı.

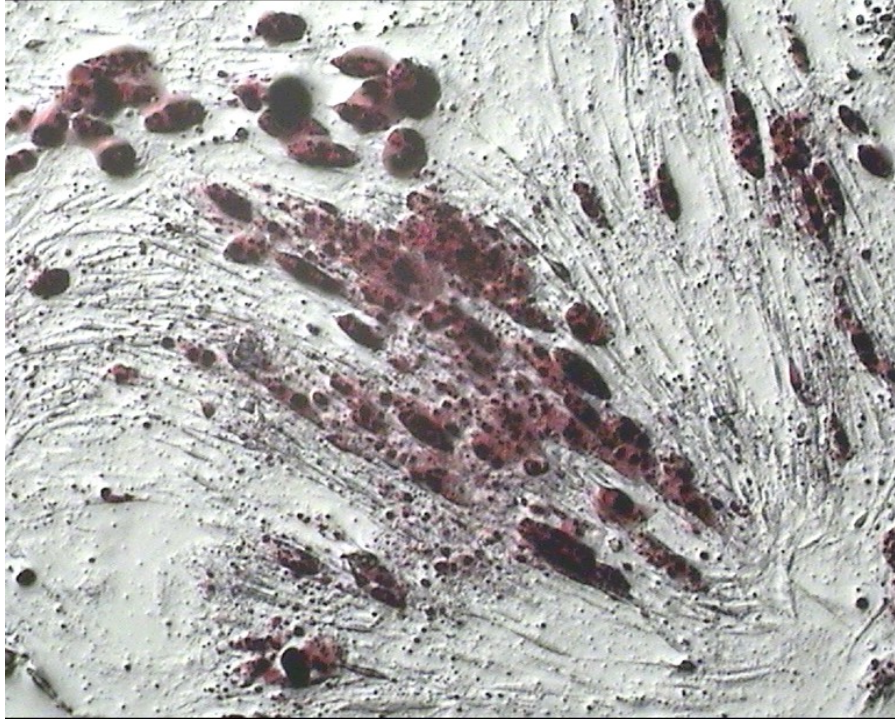
Şekil 4.32 'de 6 günlük hücre gelişimi takibi sonucunda elde edilen farklı kriyoprezervasyon gruplarına ait hücre gelişim eğrileri görülmektedir. Deney sonucunda çözme sonrası yüksek canlılık oranları gözlenen gruplardan elde edilen hücrelerin, taze hücreler ile elde edilen hücre gelişimine benzer bir gelişim

sergiledikleri gözlemlendi. Ayrıca gruplar arasında, çalışma kapsamında değerlendirilen dondurma teknikleri açısından hücre gelişimi bakımından bir fark gözlemlenmedi.

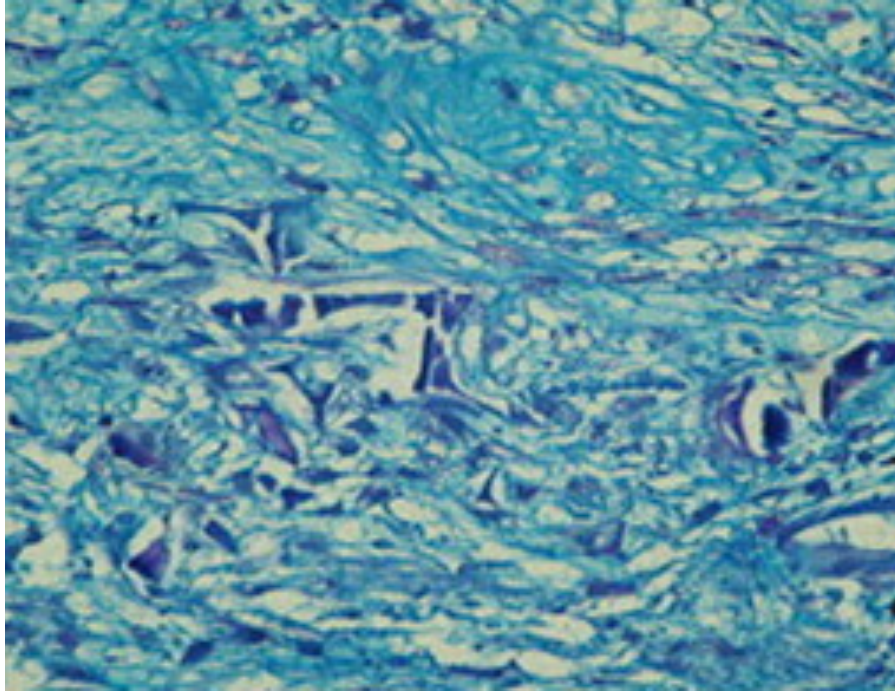


Şekil 4.32 Çözme sonrası farklı dondurma gruplarındaki hücrelere ait zaman bağlı hücre gelişimi

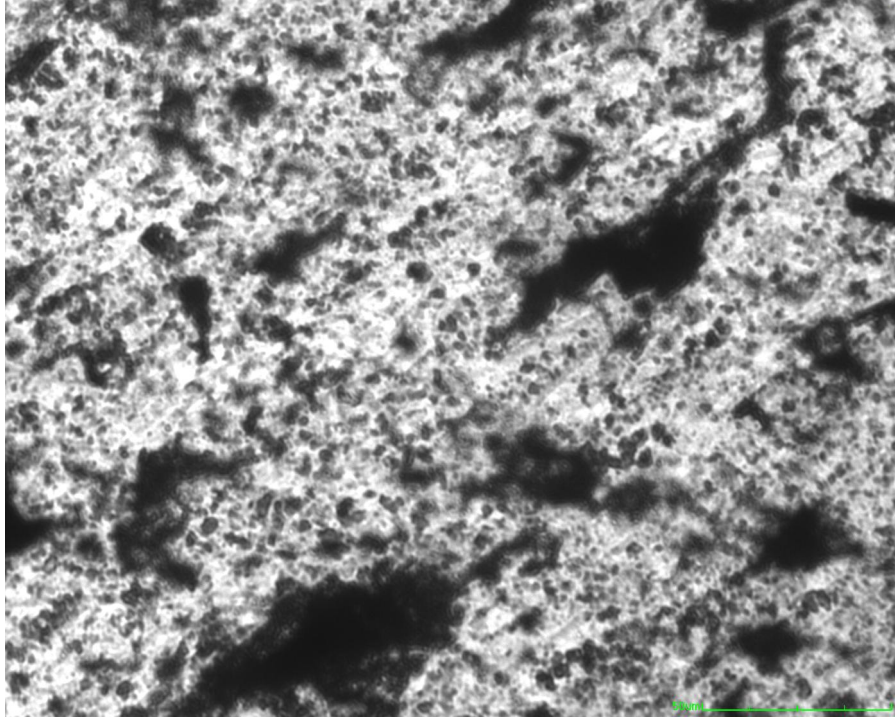
In vitro ekspansiyon aşaması sonrası kültürde büyütülen hücreler, çözme sonrası ayrıca in vitro farklılaşma testi kapsamında işlendiler ve adı geçen gruplara ait hücrelerin adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma özellikleri değerlendirildi. Bu aşamadaki hücre farklılaşmasına ait örnek görseller Şekil 4.33 – 4.35'te görülmektedir.



Şekil 4.33 Adipojenik farklılaşma (Oil red O boyaması)



Şekil 4.34 Kondrojenik farklılaşma (Alcian mavisi boyaması)

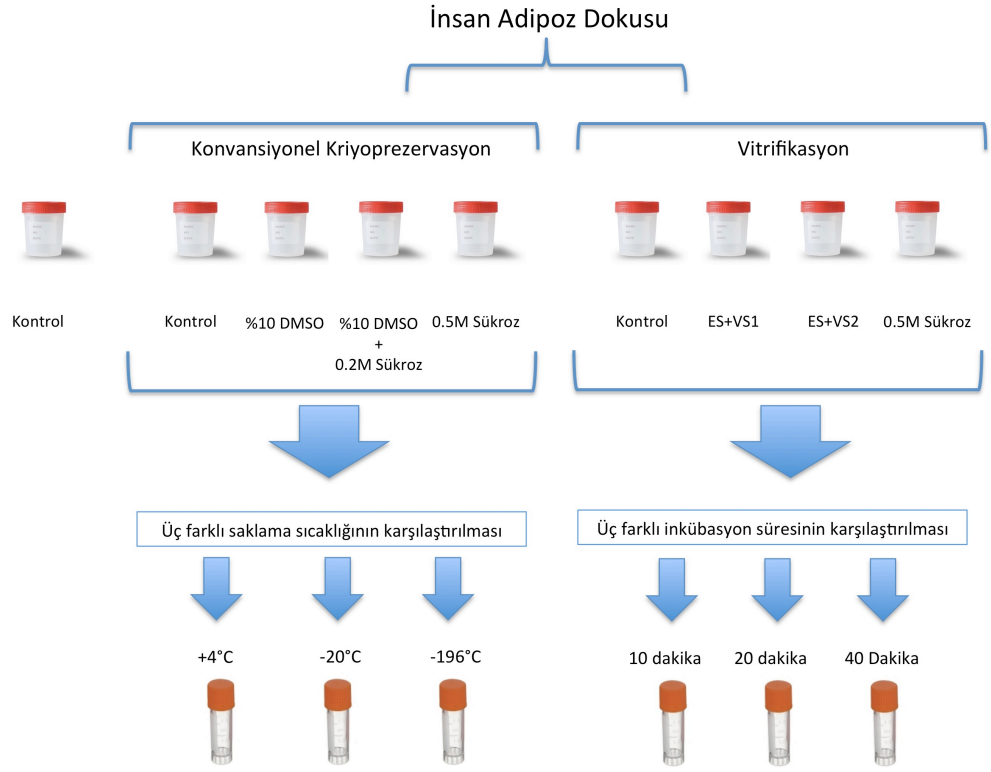


Şekil 4.35 Osteojenik farklılaşma (Alkalın fosfataz boyaması)

Elde edilen sonuçlar, çözme sonrası hücrelerin her iki protokol uygulaması sonrası ADK-MKH hücresi olma özelliklerini koruduklarını, in vitro kültür şartlarında çoğalma ve in vitro farklılaşma potansiyellerinin dondurma-çözme uygulamaları öncesine benzer ve karşılaştırılabilir bir şekilde yüksek olduğunu gösterdi.

4.6 İnsan Adipoz Dokularının Farklı Metodlarla Kriyoprezervasyonu

Çalışmanın doku incelemesi kısmında, bölüm 3.2.1’de detaylı olarak anlatılan şekilde elde edilmiş adipoz dokular, aşamalı yavaş dondurma ve vitrifikasyon olmak üzere iki ayrı yöntem dahilinde, şekil 4.36’da belirtilmiş deney planına göre farklı kriyoprotektan solüsyonları kullanılarak donduruldu.



Şekil 4.36 Doku düzeyinde kriyoprezervasyon inceleme çalışması planı

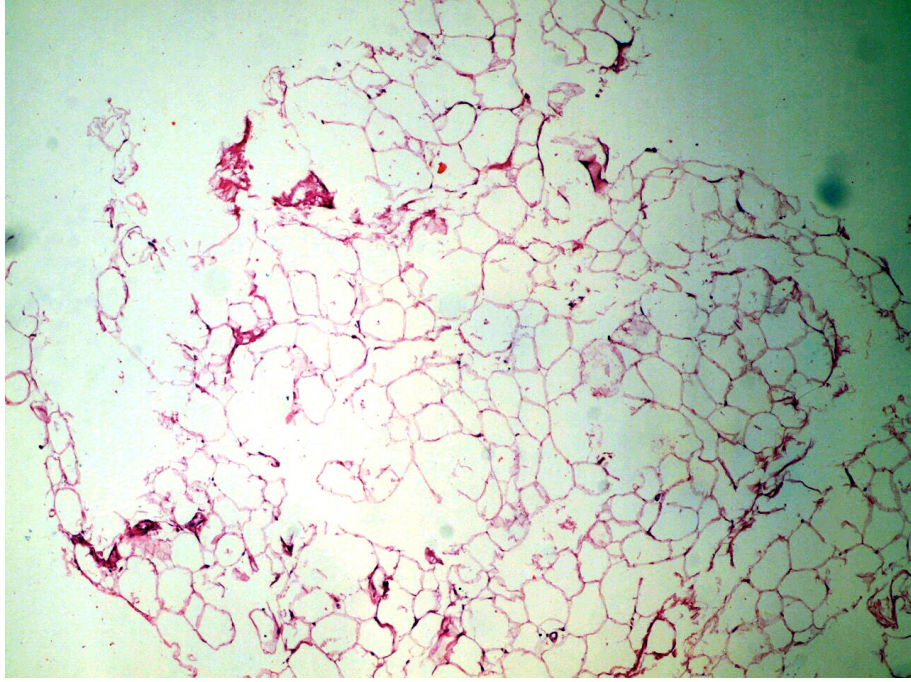
Yirmidört aylık bir saklama süresinin sonunda 1, 3, 12 ve 24 ay olarak daha önceden belirlenmiş zamansal noktalarda çözülerek belirtilen saklama süresi sonunda dokunun genelinde mevcut olabilecek olası değişiklikler, doku bütünlüğü ve yapısı bakımından histolojik inceleme gerçekleştirildi.

4.7 Histolojik İnceleme ve Bulgular

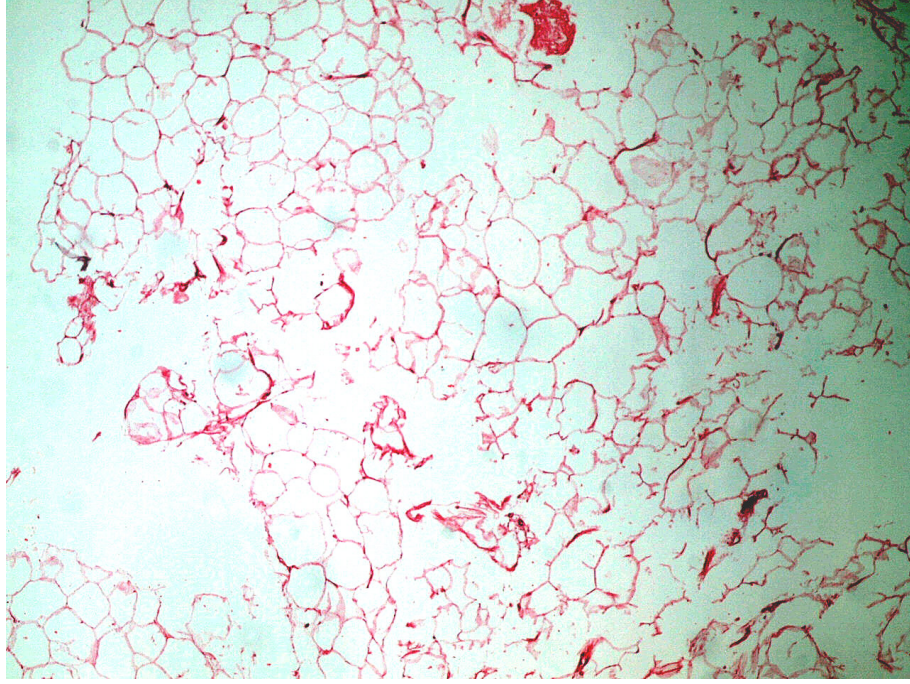
4.7.1 Konvansiyonel Koşullarda (+4°C, -20°C ve -196°C) Saklanan Doku Örneklerinin Çözme Sonrası Histolojik Değerlendirilmesi

Şekil 4.37-4.40 arasındaki resimlerde +4°C’de saklanan, Şekil 4.41 ve 5.42’de -20°C’de saklanan ve şekil 4.43-4.46 arasındaki resimlerde ise -196°C’de saklanan farklı doku örneklerine ait 24 aylık saklama süresinin sonunda fikse edilerek incelenen kesitlerin farklı mikroskopik büyütme altındaki görüntüleri görülmektedir.

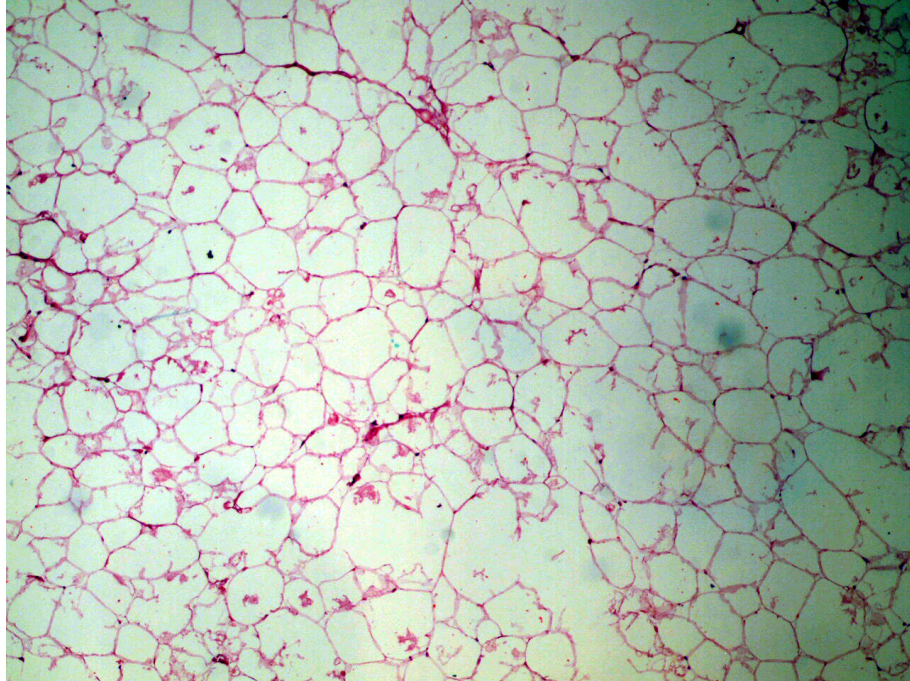
İncelenen farklı kesitlerde, tüm altgruplarda ve tüm zaman dilimlerinde doku mimarisinin korunduğu, adipositlerin yapısal olarak hasar düzeyinin oldukça düşük olduğu gözlemlendi. Bu gözlemlere dayanarak adı geçen saklama koşullarında ve kriyoprotektan ile muamele sonrası saklanan doku örneklerinde doku ve hücre bütünlüğünün korunduğu görüldü.



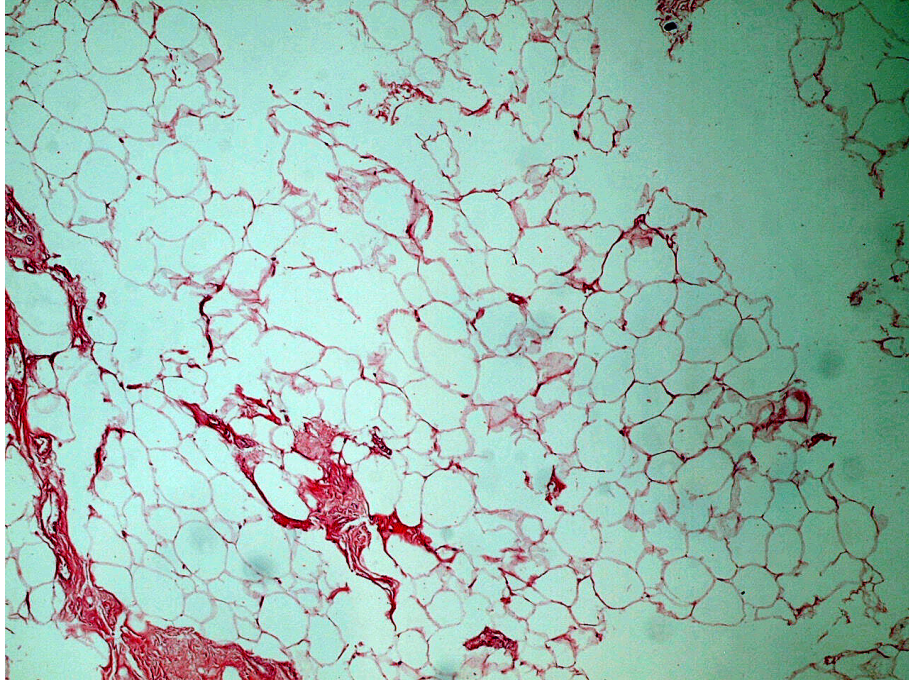
Şekil 4.37 +4°C'de saklanan kontrol grubu örneğine ait doku kesiti (10X)



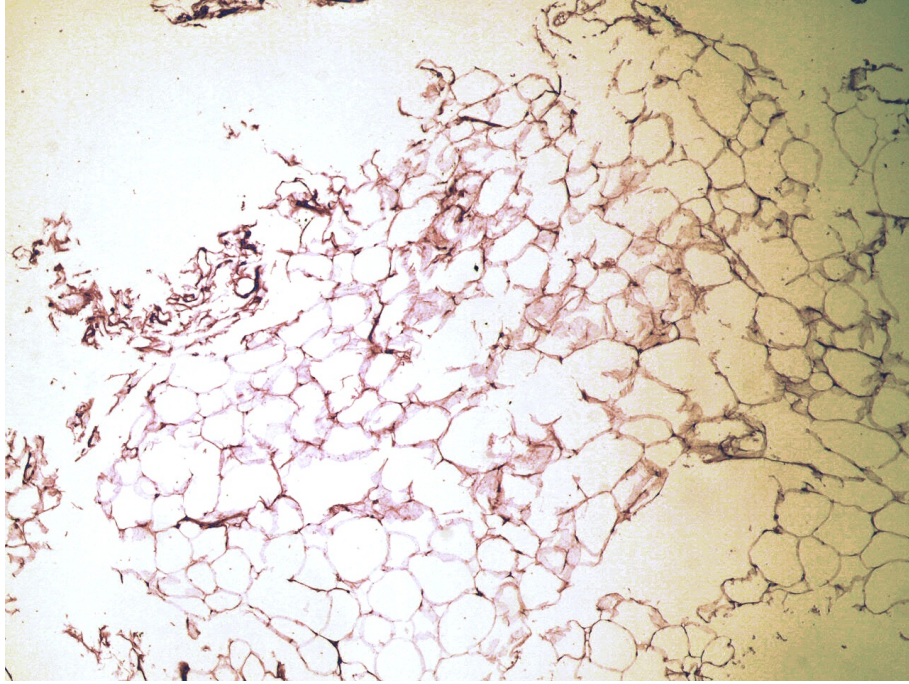
Şekil 4.38 +4°C'de saklanan %10 DMSO grubu örneğine ait doku kesiti (10X)



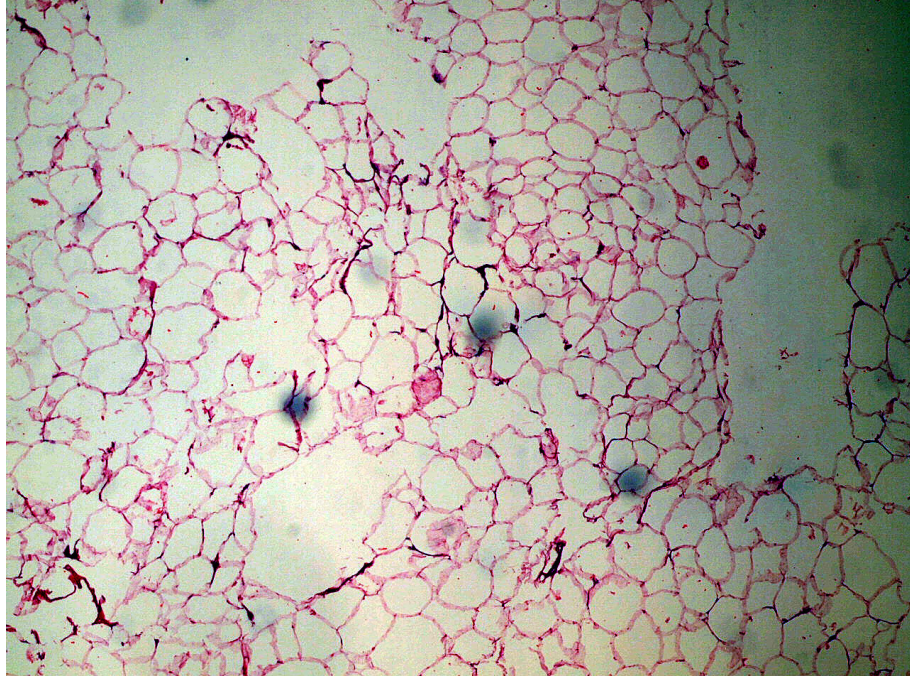
Şekil 4.39 +4°C'de saklanan %10 DMSO+0,2M süktroz grubu örn. ait doku kesiti (10X)



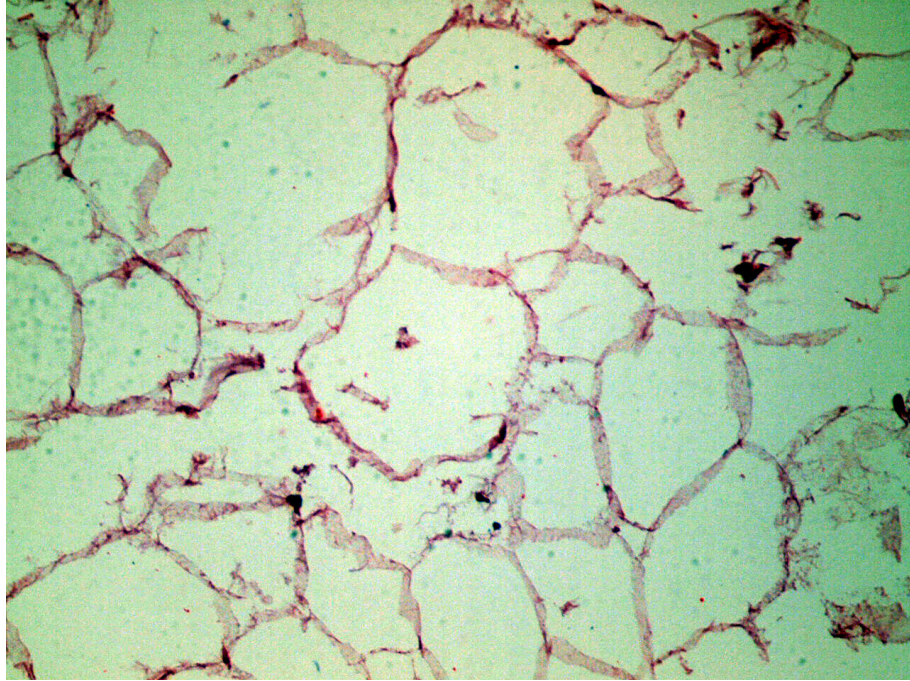
Şekil 4.40 +4°C'de saklanan 0,5M süktroz grubu örneğine ait doku kesiti (10X)



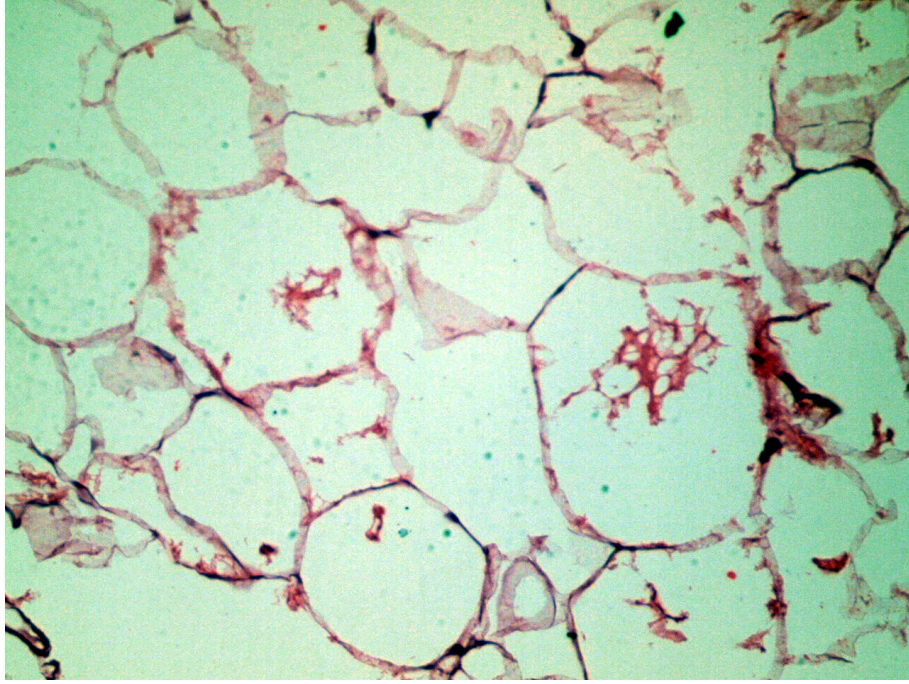
Şekil 4.41 -20°C'de saklanan kontrol grubu örneğine ait doku kesiti (10X)



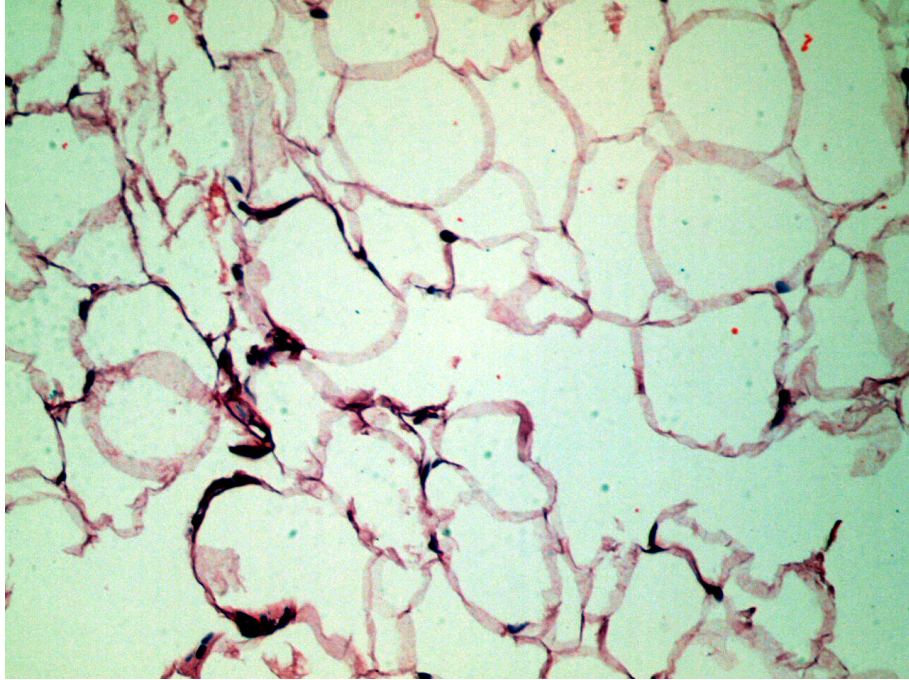
Şekil 4.42 -20°C'de saklanan %10 DMSO grubu örneğine ait doku kesiti (10X)



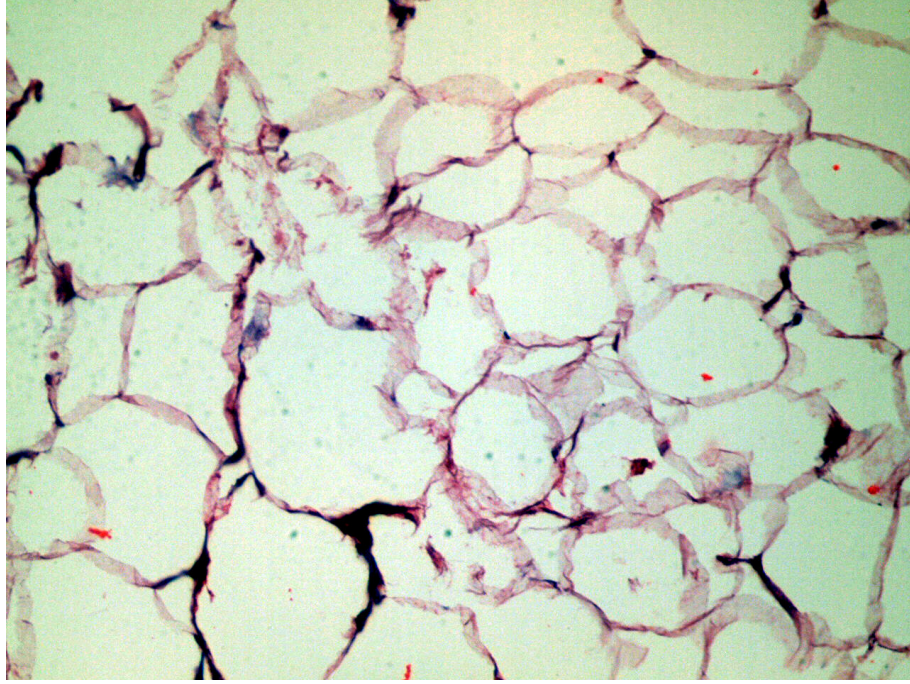
Şekil 4.43 -196°C'de saklanan kontrol grubu örneğine ait doku kesiti (40X)



Şekil 4.44 -196°C'de saklanan %10 DMSO grubu örneğine ait doku kesiti (40X)



Şekil 4.45 -196°C'de saklanan %10 DMSO+0,2M sükröz grubu örn. ait doku kesiti (40X)



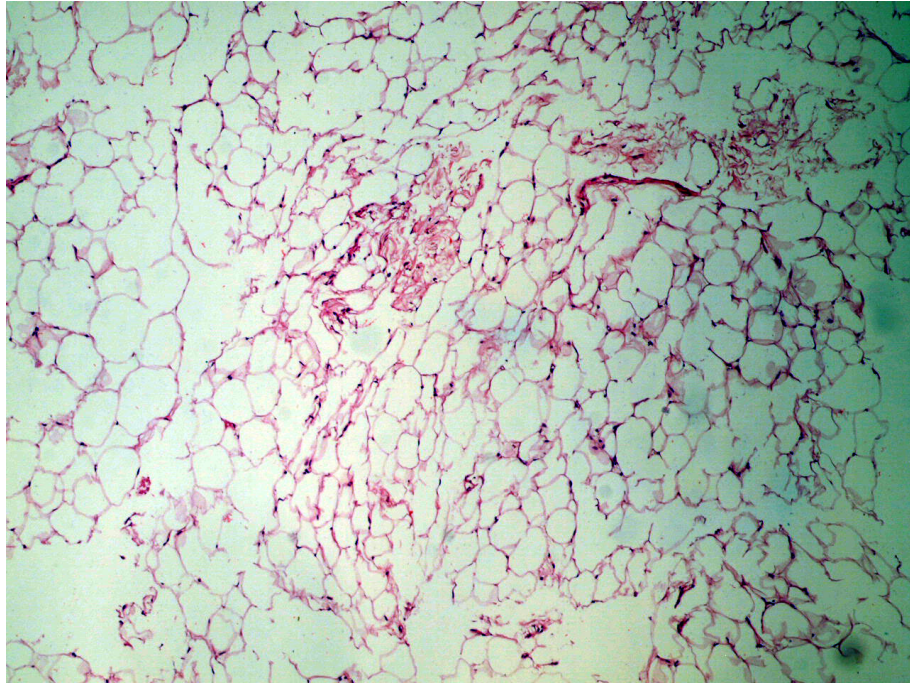
Şekil 4.46 -196°C'de saklanan 0,5M süktroz grubu örneğ.ne ait doku kesiti (40X)

4.7.2 Vitrifikasyon Sonrası -196°C'de Sıvı Nitrojen İçerisinde Saklanan Doku Örneklerinin Çözme Sonrası Histolojik Değerlendirilmesi

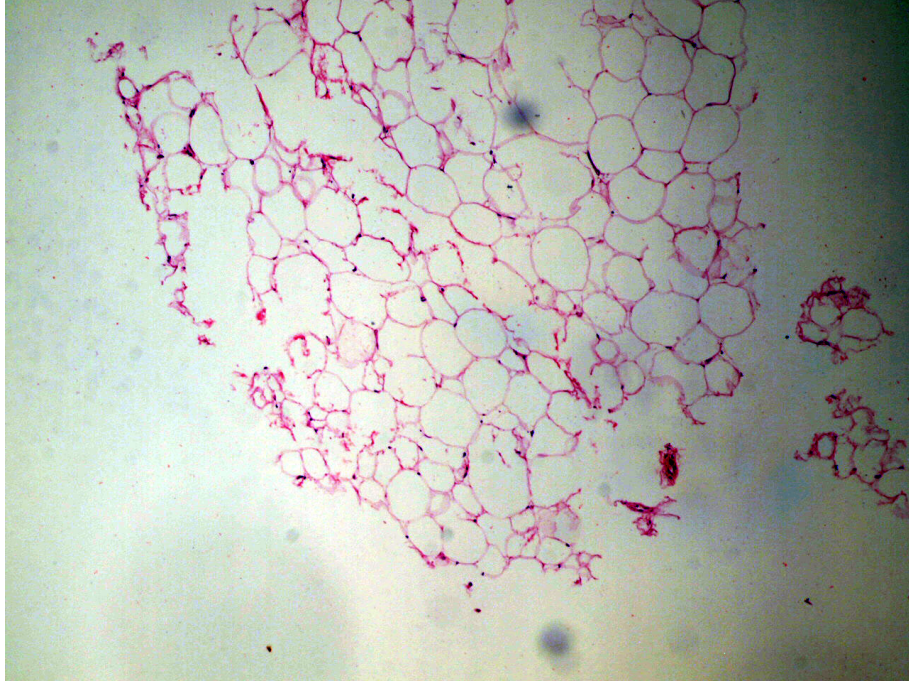
Şekil 4.47 – 4.50 arasındaki resimlerde farklı vitrifikasyon grupları ve dengeleme solüsyonu ile gerçekleştirilen farklı inkübasyon sürelerine ait doku kesitleri görülmektedir. Adipoz dokuların vitrifikasyon tekniği ile dondurulup incelendiği grupta da, konvansiyonel aşamalı yavaş dondurma yöntemi ile dondurulup saklanan doku örneklerinde olduğu gibi doku mimarisinin ve adiposit hücrelerin yapısal bütünlüğünün artan inkübasyon sürelerinden bağımsız şekilde belirgin olarak korunduğu görüldü. Bununla birlikte tek kör olarak yapılan histolojik değerlendirmeye göre, aşamalı yavaş dondurma grubunda elde edilen ve incelenen kesitler ile karşılaştırıldığında, vitrifikasyon grubunda incelenen örneklerin doku ve hücresel özelliklerin özellikle VS1 ve VS2 grubunda taze dokudan alınan kesitlere kıyasla daha yüksek düzeyde uyum gösterdiği gözlemlendi.

Histolojik incelemeler sırasında vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezervasyonu yapılan örneklerde gözlenen bir diğer belirgin farklılık; 0,5M süktroz ile dengelenen gruptaki

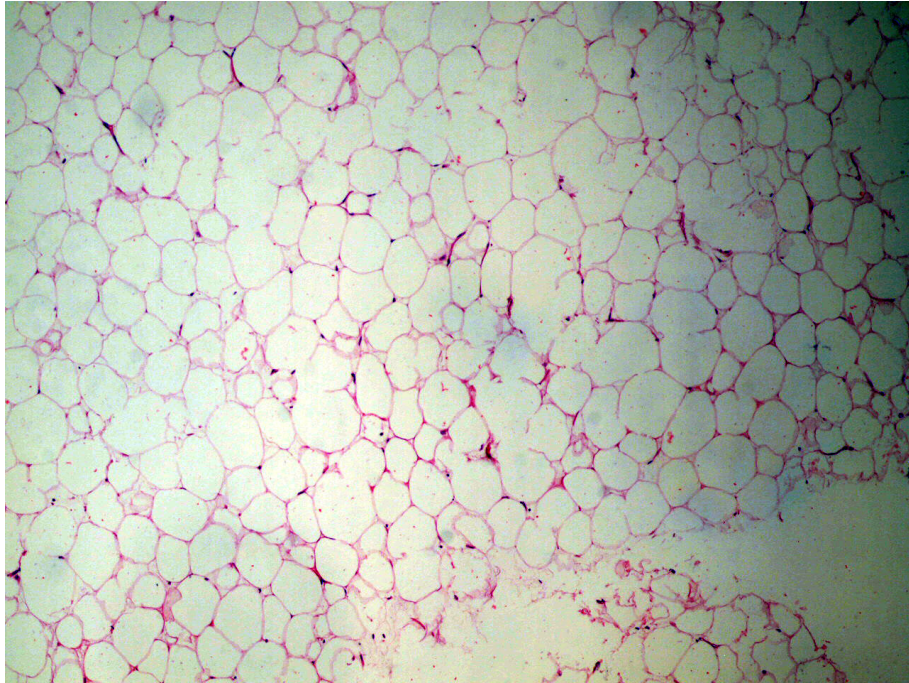
inkübasyona bağılı zamansal değişim sürecinde idi. Aşamalı yavaş dondurma grubunda 0,5M süktroz içeren grupta alınan kesitlerde diğır gruplara (kontrol, %10 DMSO ve %10 DMSO+0,2M süktroz) kıyasla belirgin bir histolojik farklılık gözlenmemiş iken, vitrifikasyon uygulanan 0,5M süktroz grubunda özellikle artan inkübasyon süreleri ile paralel olarak genel adiposit çeperlerinde küçülmeler ve düzensizlikler (volüm azalması ve dismorfizm artışı) belirgin olarak göze çarptı. Şekil 5.49'da 0,5M süktroz ile 20 dakika dengelenen ve vitrifiye edilen doku örneğinin 10X büyütme gücü altındaki histolojik yapısı ve Şekil 5.50'de 0,5M süktroz ile 40 dakika dengelenen ve vitrifiye edilen doku örneğinin 40X büyütme gücü altındaki histolojik yapısı görülmektedir.



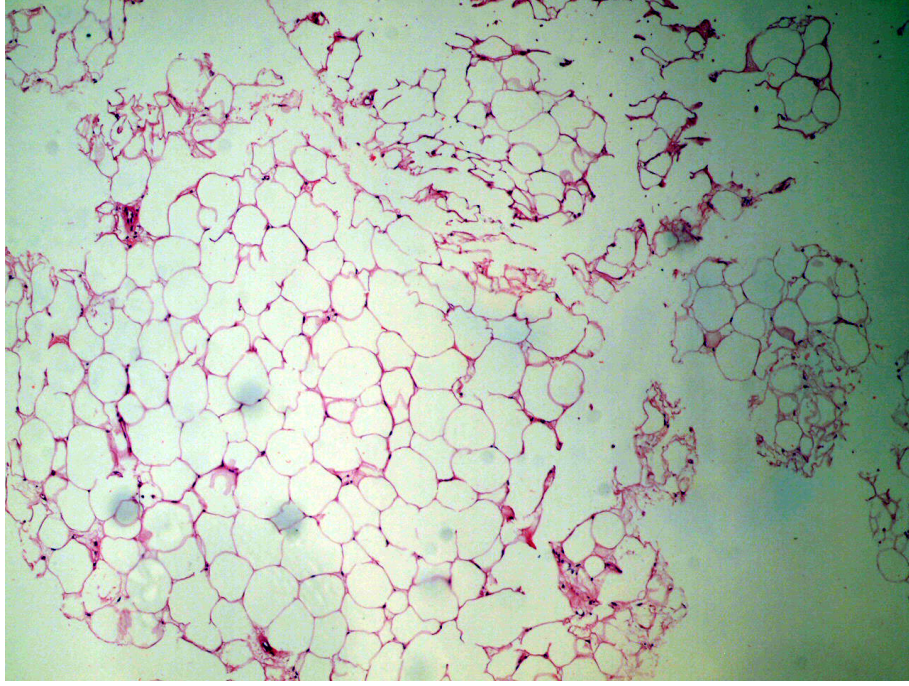
Şekil 4.47 Dengeleme aşamasında 10 dakika inkübasyon sonrası kontrol grubu doku örneği kesiti (10X)



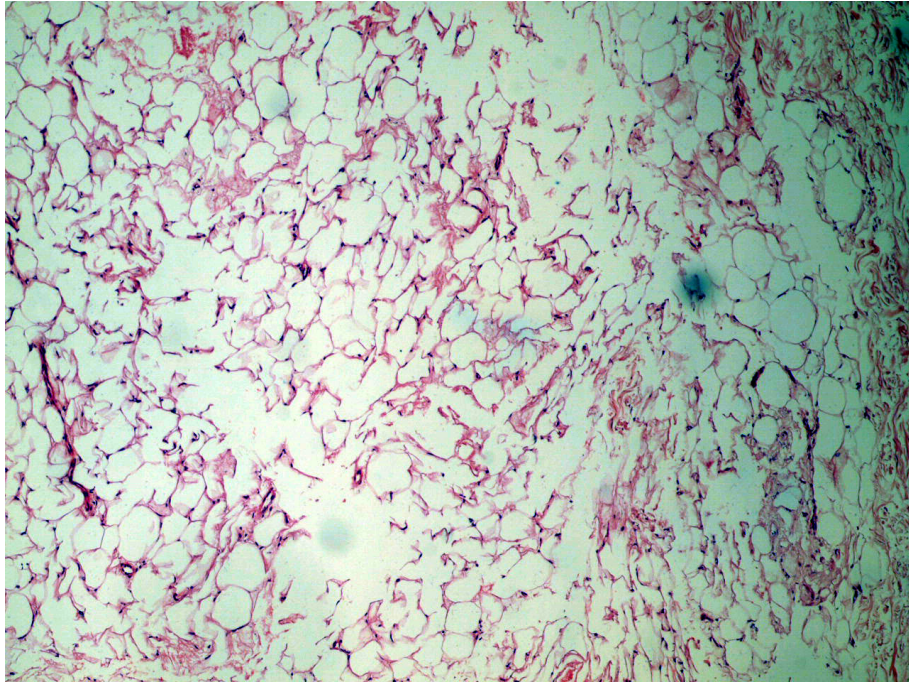
Şekil 4.48 Dengeleme aşamasında 10 dakika inkübasyon sonrası VS1 grubu doku örneği kesiti (10X)



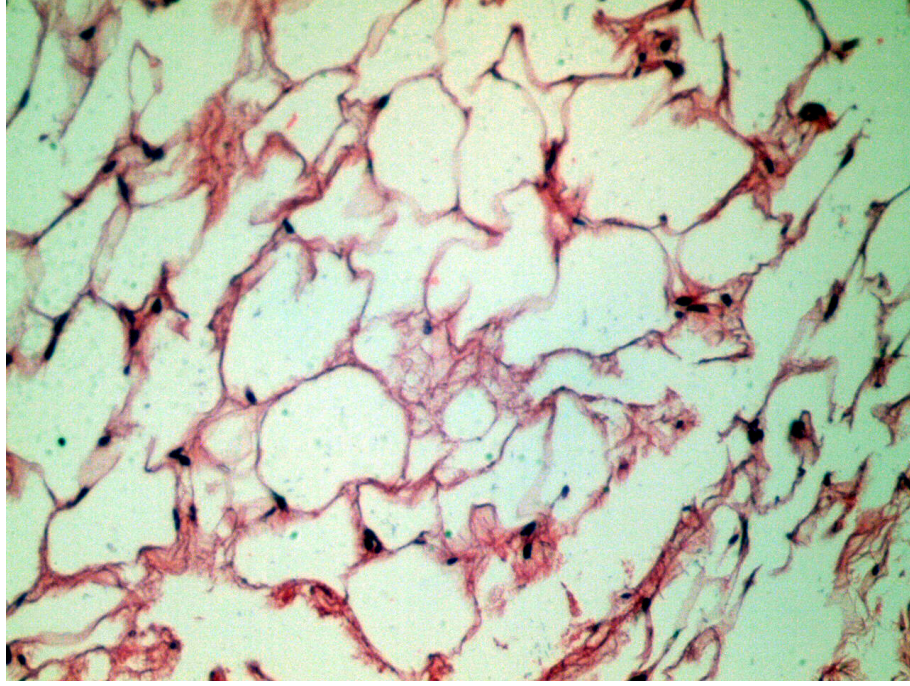
Şekil 4.49 Dengeleme aşamasında 10 dakika inkübasyon sonrası VS2 grubu doku örneği kesiti (10X)



Şekil 4.50 Dengeleme aşamasında 10 dakika inkübasyon sonrası 0,5M süktroz grubu doku örneği kesiti (10X)



Şekil 4.51 Dengeleme aşamasında 20 dakika inkübasyon sonrası 0,5M süktroz grubu doku örneği kesiti (10X)

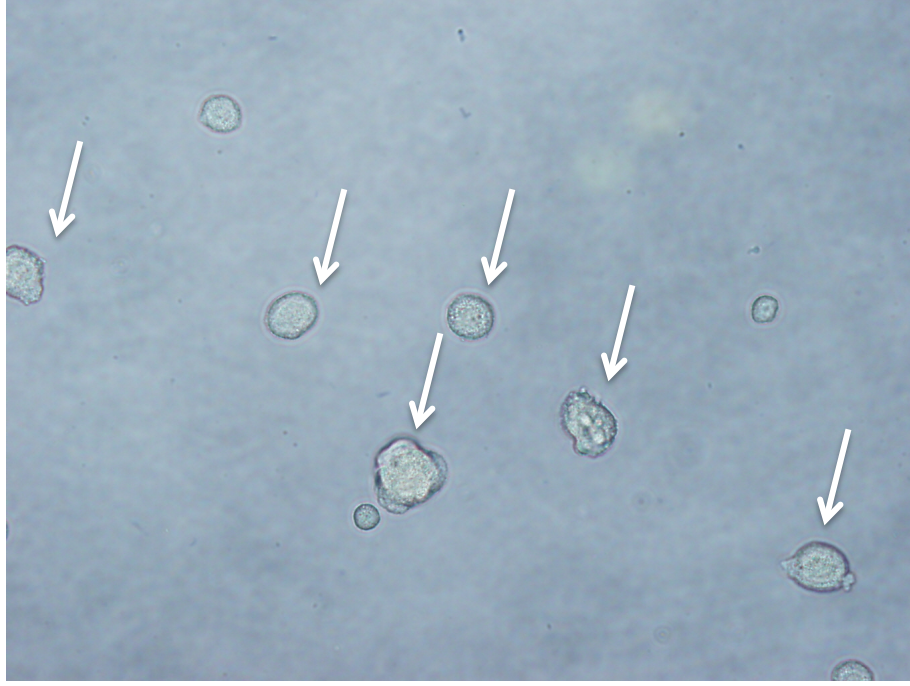


Şekil 4.52 Dengeleme aşamasında 40 dakika inkübasyon sonrası 0,5M süktroz grubu doku örneği kesiti (40X)

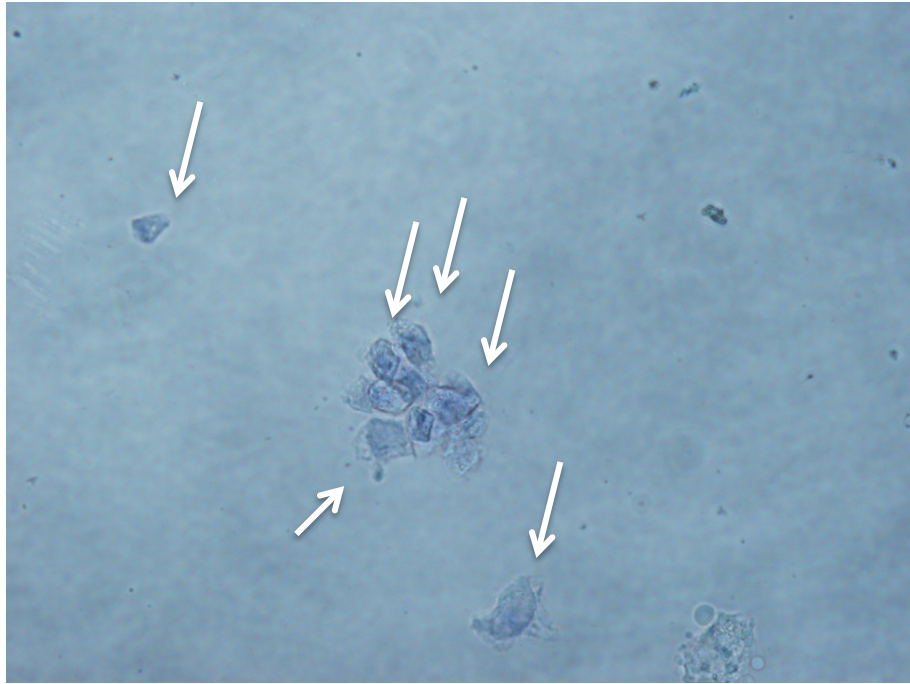
4.8 Dondurulmuş/Çözölmüş Dokulardan Elde Edilen Hücrelerin Viabilite İncelemesi Sonuçları

Şekil 4.36'da gösterilen çalışma protokolü doğrultusunda dondurulmuş olan doku örneklerinden, çalışma süresi boyunca farklı saklama zamanlarında (1., 3., 12. ve 24.ncü aylarda) çözme işlemi uygulanarak bölüm 3.2.2'de belirtilen hücre izolasyonu gerçekleştirildi.

Elde edilen hücre süspansiyonlarında, bölüm 3.2.5'te belirtilen Tripan mavisi boya dışlama testi kullanılarak hücresel canlılık ölçüldü. Boyanın hücre içine giremediği için ışık mikroskobu altında sitoplazması parlak ve beyaz gözlenen hücreler canlı (Şekil 4.53), hücre membranının fonksiyonunu kaybetmesi nedeni ile Tripan mavisi boyasını hücre içine alarak mavi renkli olarak gözlenen hücreler ölü hücre olarak değerlendirildi (Şekil 4.54).



Şekil 4.53 Tripan mavisi boyaması sonrası canlılık tayini (canlı hücreler)



Şekil 4.54 Tripan mavisi boyaması sonrası canlılık tayini (ölü hücreler)

Çalışma kapsamında tüm gruplarda elde edilen hücresel canlılık değerleri, aşamalı yavaş dondurma grubunda farklı saklama için Çizelge 4.6'de ve vitrifikasyon grubunda dengeleme solüsyonu ile farklı sürede yapılan inkübasyonlar için Çizelge 4.7'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.6 Aşamalı yavaş dondurma uygulanan adipoz doku örneklerinde farklı saklama sıcaklıklarının canlılık üzerindeki etkisi

% Canlılık (Ort±SD) ¹	Saklama süresi (ay)	No Kriyo	%10 DMSO	%10 DMSO+0,2M Sükroz	0,5M Sükroz
Aşamalı yavaş dondurma (+4°C)					
	0	94,2±3,6	94,8±2,8	94,2±3,8	94,2±3,9
	1	3,5±4,8	4,8±5,2	3,5±4,10	3,5±4,11
	3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	12	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	24	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Aşamalı yavaş dondurma (-20°C)					
	0	97,2±2,5	97,8±1,8	97,1±2,0	97,3±2,0
	1	5,8±6,7	16,9±6,2	20,4±6,8	12,0±7,8
	3	2,8±4,6	4,6±5,7	6,8±5,9	4,0±4,8
	12	0,0±0,0	5,2±4,6	4,0±3,9	3,0±4,2
	24	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Aşamalı yavaş dondurma (-196°C)					
	0	92,4±4,2	94,2±4,5	96,0±2,9	95,6±4,0
	1	5,8±5,0	65,2±8,2	68,0±6,8	60,2±7,0
	3	4,8±3,9	62,0±5,0	68,4±6,2	58,4±4,9
	12	3,4±2,8	52,2±5,0	65,2±6,2	48,4±6,8
	24	4,0±3,0	50,0±5,2	62,8±6,4	40,2±4,2

¹ Canlılık değerlendirmesi her bir örnek için 4 farklı ölçüm şeklinde yapıldı ve sonuçlar ortama± standart sapma olarak ifade edildi.

Çizelge 4.7 Vitrifikasyon uygulanan adipoz doku örneklerinde farklı inkübasyon sürelerinin hücresel canlılık üzerindeki etkileri

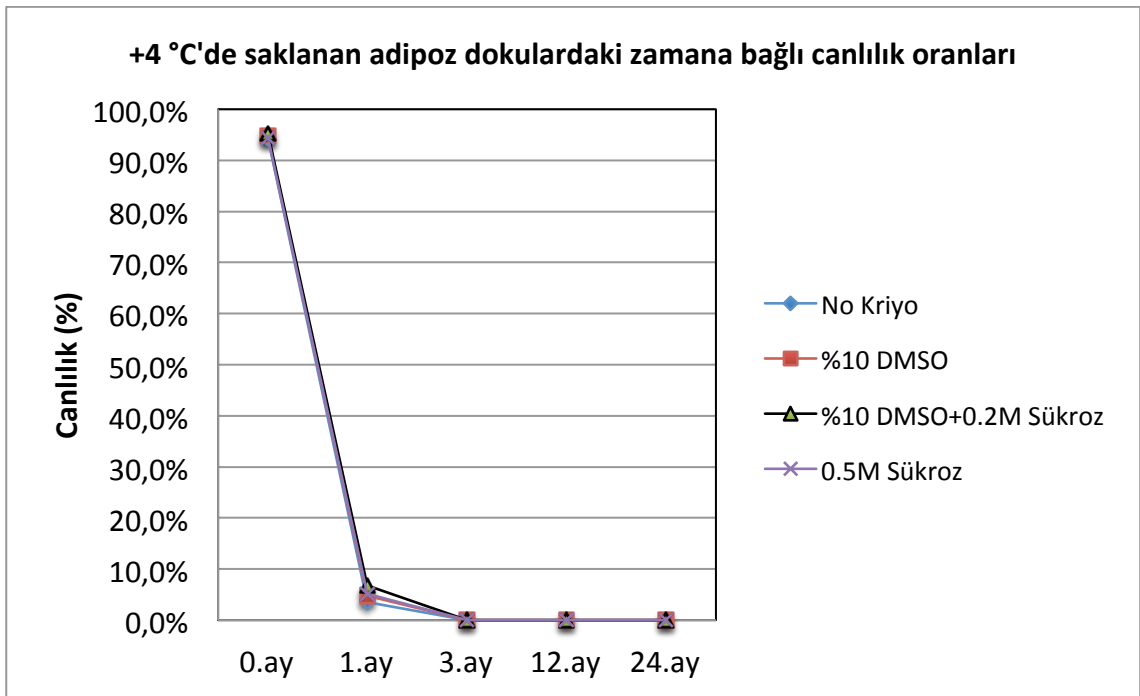
% Canlılık (Ort±SD) ¹	Saklama süresi (ay)	No Kriyo (Ort±SD)	VS1 (Ort±SD)	VS2 (Ort±SD)	0,5M Sükroz (Ort±SD)
Vitrifikasyon (1. Aşama solüsyonu ile inkübasyon süresi 10 dakika)					
	0	95,0±4,0	94,8±3,8	95,2±4,2	94,4±4,2
	1	18,2±5,0	90,2±5,2	85,0±4,8	62,0±2,9
	3	15,2±3,9	88,0±4,9	82,2±5,8	55,2±3,8
	12	12,0±2,8	88,6±2,0	80,0±2,8	55,0±2,0
	24	10,2±3,0	90,2±4,3	82,0±3,8	48,8±3,0
Vitrifikasyon (1. Aşama solüsyonu ile inkübasyon süresi 20 dakika)					
	0	92,4±4,2	94,8±2,8	95,2±4,2	94,4±4,2
	1	15,8±5,0	90,2±5,2	80,4±4,8	62,0±2,9
	3	14,8±3,9	88,0±4,9	80,2±5,8	52,4±3,8
	12	18,4±2,8	86,6±2,0	74,5±2,8	0,0±0,0
	24	17,2±3,0	85,2±4,3	75,4±3,8	0,0±0,0
Vitrifikasyon (1. Aşama solüsyonu ile inkübasyon süresi 40 dakika)					
	0	94,4±4,2	95,4±1,8	96,1±2,0	95,6±2,0
	1	12,8±5,0	78,0±6,2	52,6±6,8	65,0±7,8
	3	12,3±3,9	75,6±5,7	48,2±5,9,	54,0±4,8
	12	12,4±2,8	60,0±4,6	38,0±3,9	58,0±4,2
	24	10,4±3,0	58,2±4,8	35,2±5,0	48,2±3,8

Ölçülen hücresel canlılık değerlerinin gruplara göre şematik sonuçları farklı sıcaklıklarda saklanan aşamalı yavaş dondurma uygulanmış örnekler için Şekil 4.55 –

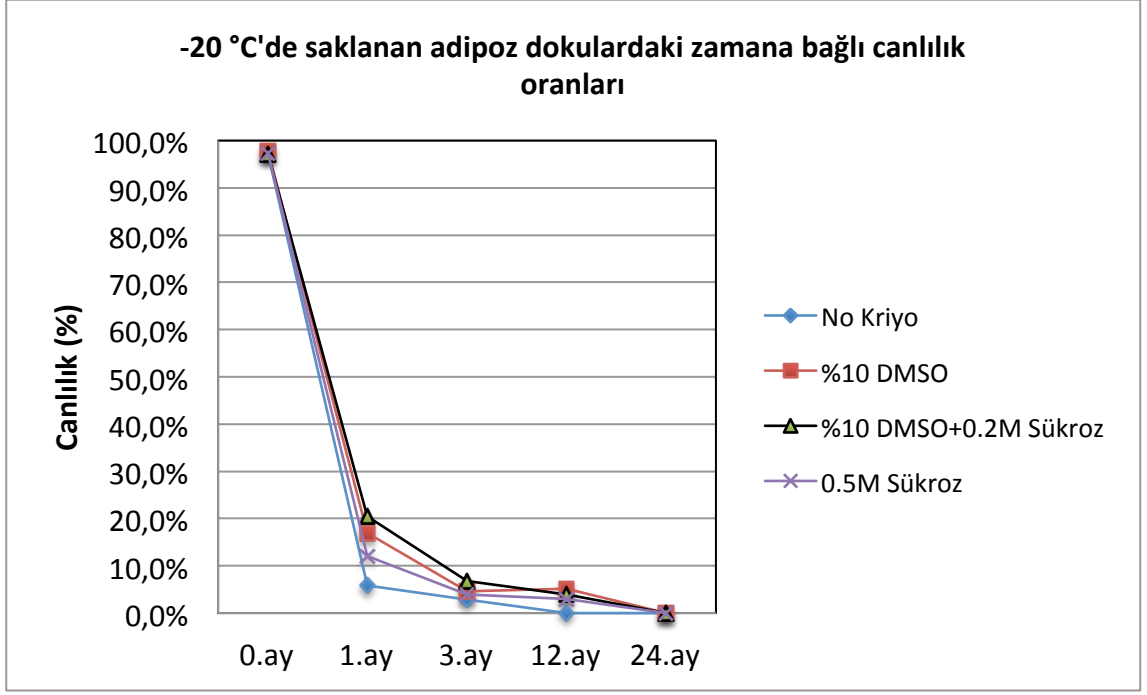
¹ Canlılık değerlendirmesi her bir örnek için 4 farklı ölçüm şeklinde yapıldı ve sonuçlar ortama± standart sapma olarak ifade edildi.

4.57 arasında, dengeleme aşamasında farklı inkübasyon süreleri uygulanarak vitrifikasyon gerçekleştirilmiş örnekler için Şekil 4.58 – 4.61 arasında gösterilmektedir.

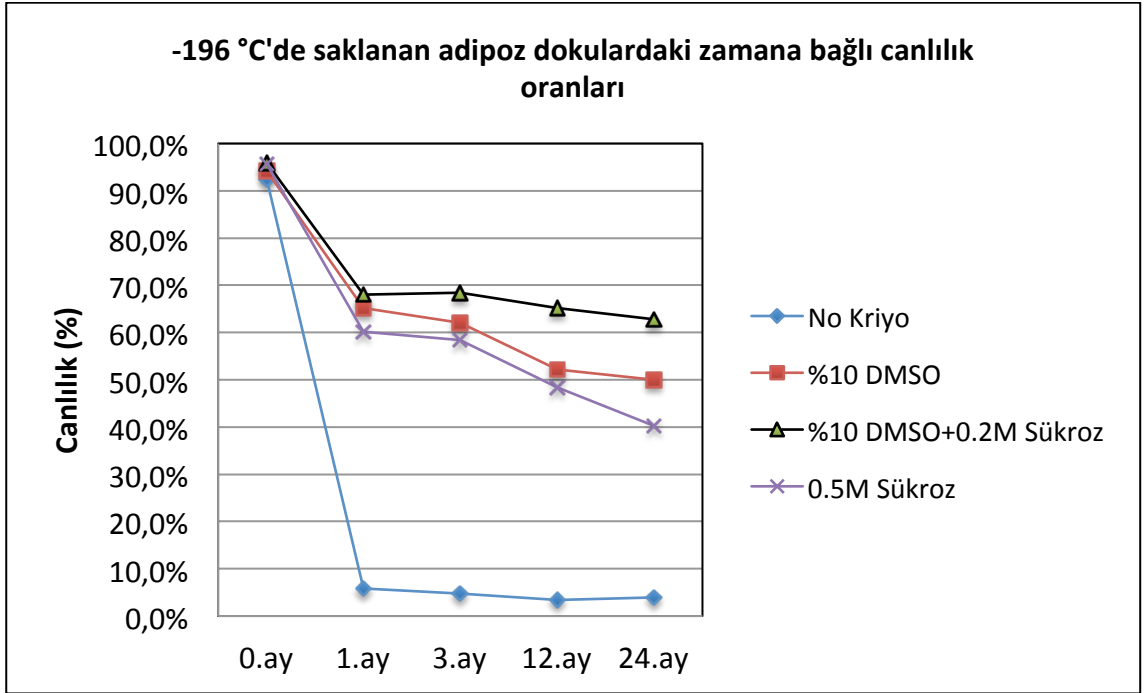
Bu aşamada sonuçlar, bölüm 4.1.1’de elde edilen histolojik sonuçların aksine, 1. aydan itibaren özellikle +4°C’de ve -80°C’de saklanan grupta ciddi ve dramatik oranda canlılık kaybının oluştuğunu gösterdi.



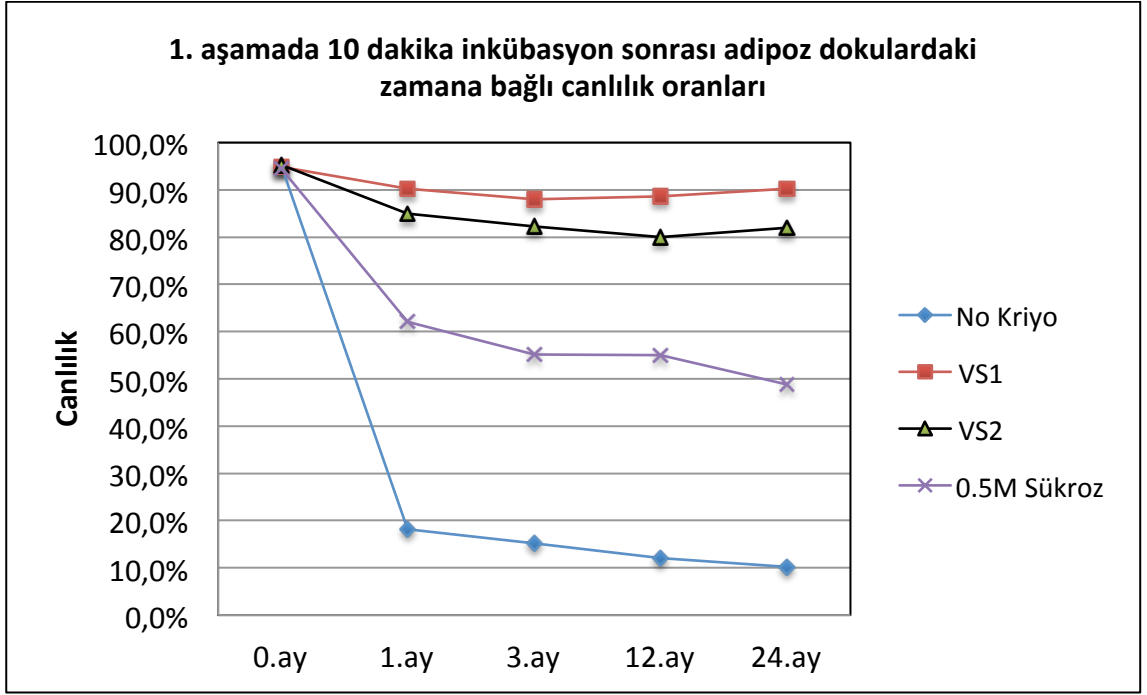
Şekil 4.55 +4 °C’de saklanan aşamalı yavaş dondurma protokolü uygulanmış adipoz doku örneklerinde çözme sonrası hücresel canlılık oranları



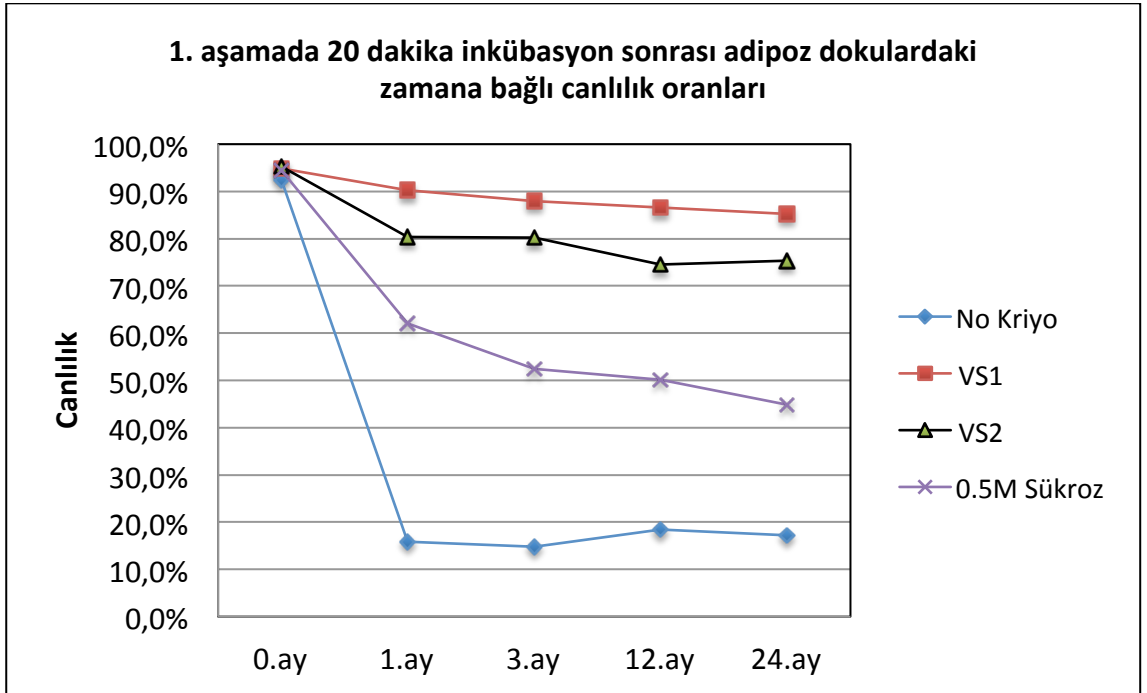
Şekil 4.56 -20°C'de saklanan aşamalı yavaş dondurma protokolü uygulanmış adipoz doku örneklerinde çözme sonrası hücresel canlılık oranları



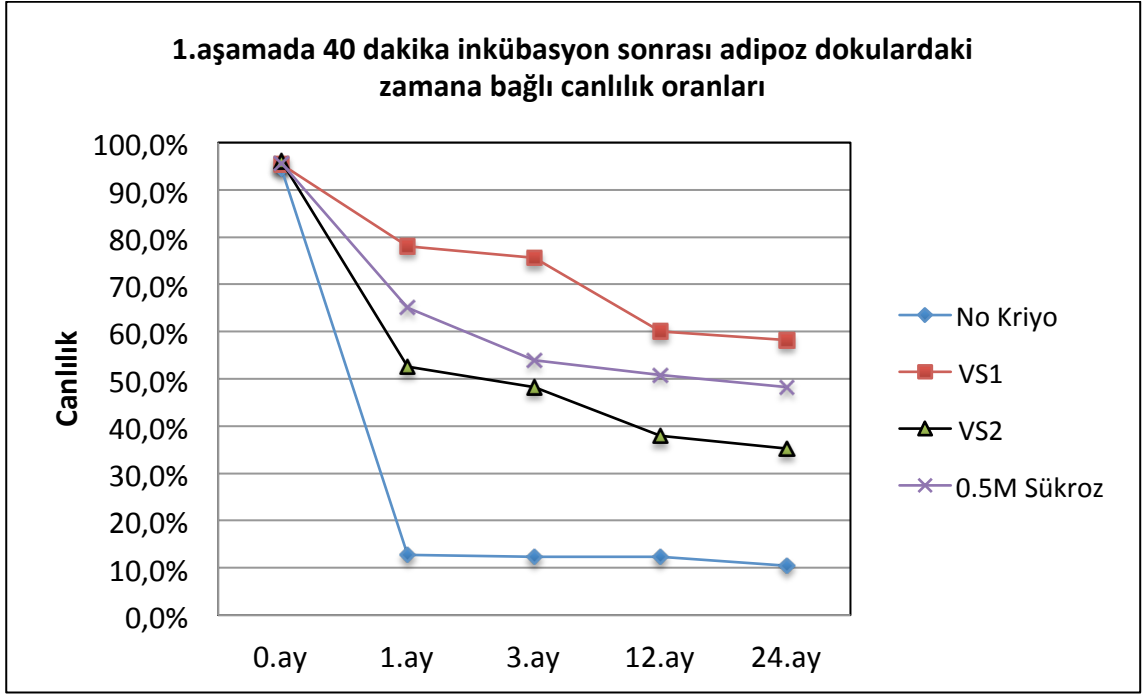
Şekil 4.57 -196°C'de saklanan aşamalı yavaş dondurma protokolü uygulanmış adipoz doku örneklerinin çözme sonrası hücresel canlılık oranları



Şekil 4.58 Dengeleme solüsyonu ile 10 dakika inkübe edilen adipoz doku örneklerinde çözme sonrası canlılık oranları



Şekil 4.59 Dengeleme solüsyonu ile 20 dakika inkübe edilen adipoz doku örneklerinde çözme sonrası hücresel canlılık oranları



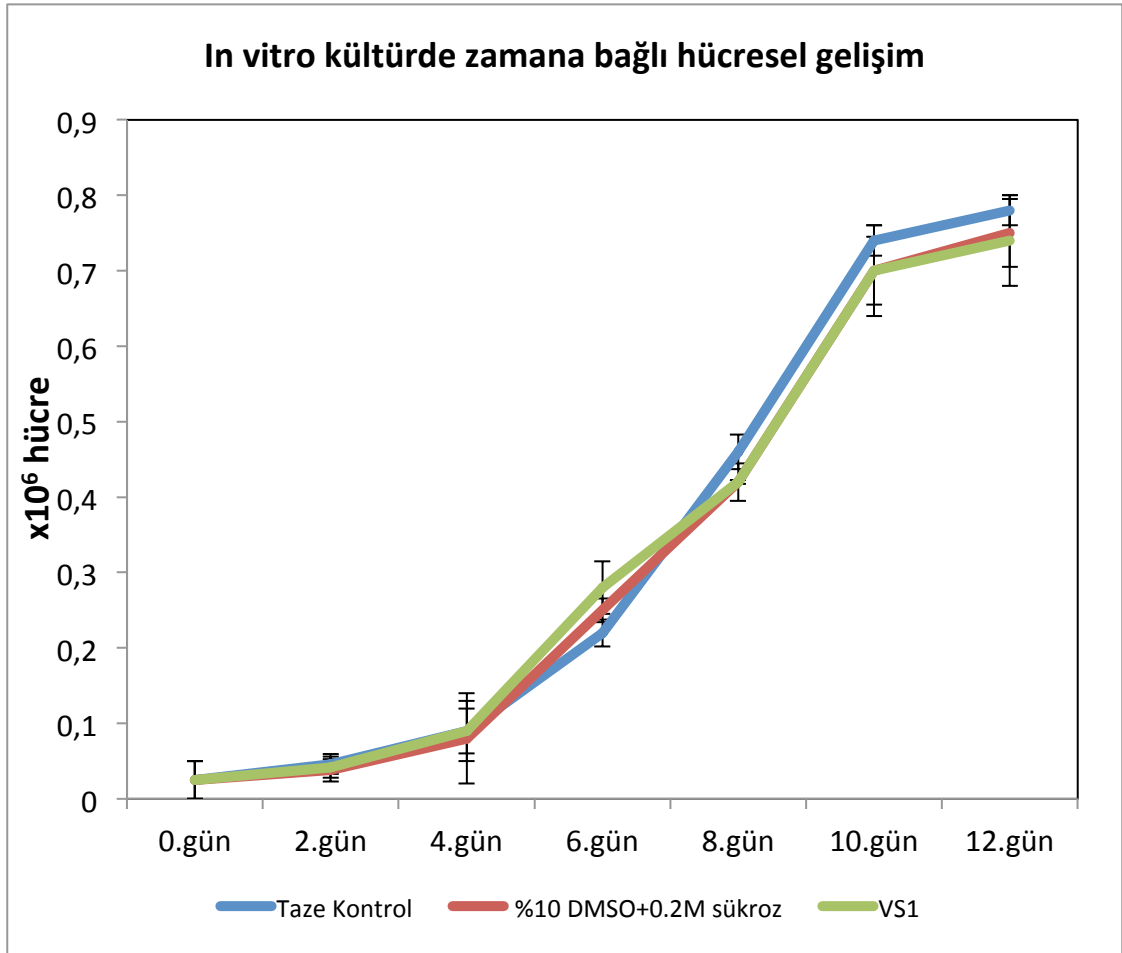
Şekil 4.60 Dengeleme solüsyonu ile 40 dakika inkübe edilen adipoz doku örneklerinde çözme sonrası hücresel canlılık oranları

4.9 Dondurulmuş/Çözölmüş Dokulardan Elde Edilen Hücrelerin In Vitro Kültürde Ekspansiyonu

Adipoz dokuların aşamalı yavaş dondurma ve vitrifikasyon tekniğı ile kriyoprezervasyonu sonrası kabul edilebilir seviyede canlılık gözlenen gruplardan %10 DMSO+0,2M süktroz ve VS1 gruplarına ait ADK-MKH'ler, aşamalı yavaş dondurma ve vitrifikasyon metodlarının hücrelerin in vitro ekspansiyon potansiyelleri üzerindeki olası etkilerinin değeriendirilmesi amacı ile in vitro kültüre alındı. Bir önceki aşamada viabilite tayini sonrası 25cm²'lik kültür kaplarına ekilen hücreler, %80 kabın yüzeyini kaplamalarını takiben pasajlandı ve cm²'ye 25000 hücre gelecek şekilde 6 adet yeni 25cm²'lik kaplara ekildiler. Ekim yapılan gün 0.gün olarak belirlendi ve sonrasında her 2 günde bir kültür kaplarındaki hücreler Tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırılarak hücre sayımı yapıldı.

Şekil 4. 61'de 6 günlük hücre gelişimi takibi sonucunda elde edilen farklı kriyoprezervasyon gruplarına ait hücre gelişim eğrileri görölmektedir.

Deney sonucunda çözme sonrası yüksek canlılık oranları gözlenen gruplardan elde edilen hücrelerin, taze hücreler ile elde edilen hücre gelişimine benzer bir gelişim sergiledikleri gözlendi. Ayrıca gruplar arasında, çalışma kapsamında değeriendirilen dondurma teknikleri açısından hücre gelişimi üzerinde bir fark gözlenmedi.



Şekil 4.61 Çözme sonrasında yüksek canlılık gözlenen gruplarda in vitro ekspansiyon değerlendirilmesi

4.10 Dondurulmuş/Çözülmüş Dokulardan Elde Edilen Hücrelerin In Vitro Farklılaşma Potansiyelleri

In vitro ekspansiyon aşaması sonrası kültürde büyütülen hücreler, çözme sonrası ayrıca in vitro farklılaşma testi kapsamında işlendiler ve adı geçen gruplara ait hücrelerin adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma özellikleri değerlendirildi. Çözülmüş dokulardan elde edilen hücrelerin kısa süreli ekspansiyonu ve sonrasında gerçekleştirilen in vitro farklılaşma testi sonuçları Çizelge 4.8 'de verilmiştir.

Çizelge 4.8 Dondurulmuş ve 24 ay sonra çözülmüş dokulardan elde edilen hücrelerin in vitro ekspansiyon ve in vitro farklılaşma sonuçları

	Aşamalı yavaş dondurma (-196 C)				Vitrifikasyon			
	Kontrol	%10 DMSO	%10 DMSO +0,2M sükröz	0,5Msük.	Kontrol	VS1	VS2	0,5M sük.
ADK-MKH eldesi ¹	+	++	++	++	+	+++	+++	++
Adipojenik farklılaşma	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Kondrojenik farklılaşma	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Osteojenik farklılaşma	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Dondurulmuş dokudan elde edilen ve sonrasında kültür kaplarına ekimi yapılan hücrelerin gerçekleştirilen in vitro ekspansiyonunda, tripan mavisi boya dışlama testi sonuçları ile paralel veriler elde edildi. Aşamalı yavaş dondurma grubunda +4°C’de ve -20°C’de saklanan doku örneklerinden elde edilen çok düşük orandaki canlı hücreler ile başarılı bir in vitro kültür ve hücre ekspansiyonu sağlanamadı.

Aşamalı yavaş dondurma uygulanmış ve -196°C’de saklanan doku örneklerinden ve vitrifikasyon metodu uygulanmış doku örneklerinden izole edilen hücrelerde, tüm gruplarda in vitro ekspansiyon gözlemlendi. Bununla birlikte gözlenen in vitro ekspansiyon başarısı, tripan mavisi testi ile elde edilen canlılık oranlarından belirgin olarak daha düşük idi.

Birbirinden farklı sayıda hücre ile başlayan in vitro hücre kültürü ve ekspansiyonu sonrasında elde edilen in vitro farklılaşma sonuçlarında dondurma yöntemleri, farklı

¹ (+): Başlangıç hücre yoğunluğu 20000 hücre/ml’den az, (++) : Başlangıç hücre yoğunluğu 100000 hücre/ml’den az, (+++) : Başlangıç hücre yoğunluğu 100000 hücre/ml’den fazla.

kriyoprotektan konsantrasyonları ve farklı inkübasyon sürelerine bağlı belirgin farklılıklar gözlenmedi. Tüm gruplarda hücrelerin adipojenik, kondrojenik ve miyojenik farklılaşmalarının etkin ve birbirine benzer olduğu görüldü.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yumuşak doku defektleri, kazalar, ciddi ve derin yanıklar, tümörlü bir dokunun çıkarılması sonrası meydana gelen doku çevresi hasarlar veya konjenital anomaliler gibi nedenler ortaya çıkmaktadır. Defektin büyüklüğüne ve lokasyonuna göre hastalar, çoğu zaman sadece kozmetik olarak rahatsız olmakla kalmayıp aynı zamanda fonksiyonel yetmezlik te yaşayabilmektedir. Bu durumlarda dokunun mümkün olan en kısa süre içinde ve etkin bir şekilde tamiri klinik açıdan büyük önem taşımaktadır [51].

Adipoz doku mühendisliği kullanılarak elde edilen doğal veya sentetik iskeletler, iskelet ile birlikte hücre nakli uygulamaları, belirli bir düzeye kadar etkin olabilseler de halen adı geçen yapay bağlı yaşanan sorunlar (nakil bölgesinde uyumsuzluk, sınırlı fonksiyonellik vb.) nedeni ile en çok tercih edilen yöntem otolog adipoz doku naklidir. Günümüzde otolog adipoz doku nakilleri, yumuşak doku defekti tamiri yanında ayrıca plastik/estetik cerrahide meme ve göğüs ucu rekonstrüksiyonlarında, yüz ve el gençleştirme uygulamalarında ve HIV'e bağlı lipodistrofilerde de her geçen yıl artan oranda tercih edilmektedir [125]. Sayıca az olmalarına karşın, bu uygulamalara son yıllarda radyasyon tedavisi sonrası oluşmuş doku hasarlarının tamiri, Poland's sendromu ve Parry-Romberg sendromu gibi asimetric doku oluşumlarının iyileştirilmesi gibi uygulamalar da eklenmiştir [126], [127], [128].

Adipoz doku insan vücudundaki en zengin mezenkimal kök hücre kaynaklarından biridir. Pek çok diğer organ ve dokuya kıyasla kolay örneklenebiliyor oluşu (kemik iliğine kıyasla çok daha az invaziv), alınabilecek uygun doku miktarının ve dokunun

içerdiği kök/progenitör hücre miktarının diğer mezenkimal kök hücre kaynaklarına kıyasla yüksek oluşu (Adipoz dokudan elde edilen SVF süspansiyonu içindeki multipotent kök hücre oranı %2, kemik iliğindeki multipotent kök hücre oranı ise %0,002'dir) adipoz dokuyu özellikle son 10 yılda pek çok doku araştırma, klinik öncesi ve klinik uygulamada birincil tercih edilen bir kök hücre kaynağı konumuna getirmiştir [42], [129], [130]. Araştırma ve klinik kullanımdaki yüksek potansiyellerinin yanında halen otolog adipoz doku transplantasyonlarında önemli bazı sorunlar da mevcuttur. Bu sorunların başında, nakledilen dokunun canlılığının değişkenliği veya dokunun alıcı bölge tarafından öngörüleemeyen oranda absorbe edilmesi nedeniyle karşılaşılan düzensizlikler gelmektedir [131].

İlk uygulamalardan günümüze kadar geçen süreçte bazı araştırmacılar otolog adipoz doku nakli uygulamalarında daha etkin bir yöntem geliştirebilmek amacı ile metod ile ilgili değişkenleri (donör yaşı, vücut kitle indeksi, adipoz dokunun örneklediği bölge, anestezi kullanımı, lipoaspirasyonda kullanılan kanülün ebadı vb.) ve sonuçlarla olan bağlantılarını sorgulamışlardır. Literatürde her ne kadar bazı çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmiş olsa da genel sonuçlar ve mevcut bulgular donör yaşının, vücut kitle indeksinin, adipoz doku örneklenen bölgenin ve lipoaspirasyon sırasında kullanılan anestezinin aspire edilen adipoz dokunun canlılık oranlarında bir farklılık oluşturmadığı yönündedir [132], [133], [134], [135], [136], [137], [138]. Otolog adipoz doku nakillerinde, işlemlerin başarısında rolü olabileceği düşünülen ve sorgulanan parametrelerden biri de adipoz dokunun örneklenme şeklidir ve çalışmalar doku örneklemesinde kullanılan “cerrahi eksizyon” ve “lipoaspirasyon” yöntemlerinin, işlem sırasında canlılığını yitiren adipoz hücre oranı açısından anlamlı bir fark yaratmadığını göstermektedir [69], [139], [140], [141], [142], [143], [144], [145], [146], [147]. Çalışmamızda kullanılan ve toplam 10 farklı donörden alınan adipoz doku örneklerinin 8'i lipoaspirasyon sonrası, 2'si ise cerrahi eksizyon sonrası elde edilmiştir. Çalışma dahilinde hücre izolasyonu ve in vitro kültür sonrası elde edilen sonuçlara göre, lipoaspirasyon veya cerrahi eksizyon sonrası elde edilen ADK-MKH hücreleri arasında morfoloji, hücre gelişimi parametreleri, in vitro farklılaşma potansiyelleri ve çalışmanın temel hedefi olan kriyoprezervasyon sonrası etkinlik açısından belirgin ve anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu sonuçlar adı geçen cerrahi işlemlerin sadece doku

kaynağı açısından değil aynı zamanda cerrahi işleme göre alınan dokuların içerdikleri ADK-MKH'ler açısından da birbiri ile eşdeğer olduklarını göstermektedir.

Çalışmamızda hücre izolasyonu aşamasında ilk olarak, elde edilen SVF süspansiyonlarında mevcut literatürde en sık kullanılan doğrudan kültür kaplarına ekim yaklaşımı ile, aynı SVF hücrelerinin manyetik tabanlı hücre ayırıştırma tekniği ile saflaştırılması sonrası ekimi arasındaki olası hücre morfolojik ve gelişim farklılıkları incelendi. Manyetik tabanlı hücre ayırıştırma, güncel literatürde insan ADK-MKH'lerin klinik kullanımı sırasında tercih edilen bir yöntem olup, nakledilen hücrelerin belirli bir grupta olarak saflaştırılması ve böylece hücre etkinliklerinin artırılması amacı ile kullanılmaktadır [148]. Çalışmamızda, manyetik tabanlı hücre ayırıştırma tekniğinin kullanımı sonrası elde edilen ve kültüre ekimi yapılan hücre popülasyonunun, ayırıştırma öncesi mevcut hücre popülasyonuna kıyasla ciddi olarak azaldığı, bununla birlikte hücre gelişim ve in vitro ekspansiyon özellikleri bakımından bir farklılık oluşturmadığı gözlemlendi. Morfolojik olarak homojen bir hücre kültürü oluştursa da, elde edilen sonuçlar manyetik-tabanlı hücre ayırıştırma metodunun doğrudan kültür kaplarına ekim metoduna kıyasla anlamlı bir avantaj sağlamadığını gösterdi. Bu sonuçlar, Griesche ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçlar ile benzer olup, in vitro ekspansiyon planlanan uygulamalarda veya çalışmalarda klasik izolasyon ve kültür yönteminin tercih edilmesinin daha başarılı sonuçlar vereceği düşüncesini de doğrulamaktadır [149].

Çalışmamızda elde ettiğimiz bir diğer önemli sonuç, çok düşük miktarlarda elde edilebilen kaynaklardan da mikrokapiler kültür metodu ile verimli bir kök hücre izolasyonu sağlanabildiğidir. Mikro kapiler kültür metodu hücrelerin karbondioksit bakımından zengin, hücrelerin proliferasyonunun ve adaptasyonunun optimize edilebildiği bir mikroaerofil çevre yaratma amacı ile ilk olarak Allahverdiyev ve arkadaşları tarafından 2005 yılında kullanılmıştır [150]. Adı geçen yaklaşım, çalışmamızda çok düşük sayılarda elde edilen mononükleer hücre süspansiyonlarından etkin, tekrarlanabilir, düşük maliyetli kök hücre izolasyonu amacı ile ADK-MKH izolasyonu ve ekspansiyonunda ilk kez kullanılmıştır. Böylece, konvansiyonel kültür sonrası elde edilen adipoz kaynaklı kök hücreler ile aynı özellikleri gösteren ve fonksiyonlara sahip ADK-MKH'leri elde edilmiştir[25]. Elde ettiğimiz bulgular, bu yaklaşımın sadece düşük miktarlarda elde edilen adipoz

dokudan ADK-MKH eldesi için değil, aynı zamanda elde edilmesi son derece kısıtlı ve düşük miktarlardaki kök hücre kaynaklarından da kök hücre izolasyonunda etkin olarak kullanılabileceğini göstermesi açısından önemlidir.

Yumuşak doku hasarları veya problemlerinin tedavisi amaçlı gerçekleştirilen otolog adipoz doku nakillerinde karşılaşılan problemlerin azaltılması veya ortadan kaldırılması amacı ile son yıllarda klinikte uygulanmaya başlanan yaklaşım hücre yardımcı lipotransfer (HYL) yaklaşımıdır. HYL, otolog doku nakli amaçlı aspire edilen adipoz dokunun iki kısma ayrılarak ilk kısımdaki dokudan enzimatik metodla SVF hücreleri ayrılması, elde edilen hücrelerin doku olarak ayrılmış ikinci kısım ile karıştırılarak ilgili bölgeye nakledilmesi şeklinde uygulanmaktadır ve bu yöntem ile gerçekleştirilen çalışmalarda nakledilen dokunun geri emilmesi probleminin büyük ölçüde azaldığı ve olguların pek çoğunda ardışık operasyonlara gerek kalmadığı bildirilmektedir [40], [41], [42], [151]. Yakın bir süre önce gerçekleştirdiğimiz ve aynı zamanda bu çalışmamızda doku kaynağı olarak kullanılan örneklerin bazılarının elde edildiği klinik bir çalışmamızda, YHL benzeri bir yaklaşım kullanılarak, insan adipoz doku örnekleri ve bu örneklerin bir kısmından paralel olarak izole edilen SVF hücreleri, iyileşme amaçlanan bölgeye ayrı ayrı nakledilerek rekonstrüktif amaçlı olarak kullanılmıştır [42]. Adı geçen çalışmamızda 29 hasta üzerinde elde edilen sonuçlar, klinik açıdan doku ve hücrelerin birlikte kullanımının konvansiyonel doku nakli uygulamalarına kıyasla anlamlı olarak daha başarılı (işlem sonrası takip sürecinde operasyon tekrarı gereken hasta sayısı belirgin olarak azalmıştır) olduğunu göstermekle birlikte, işlemsel olarak doku ve hücrelerin nakil öncesi aynı gün elde edilip işlenmesi gereğini de ortaya koymaktadır. Mevcut çalışmalarımızda elde ettiğimiz sonuçlar, adipoz dokuların ve içerdikleri ADK-MKH'lerin ayrı protokoller dahilinde dondurulup saklanması ile, gerektiğinde HYL uygulamalarına paralel bir şekilde çözülerek hasarlı veya iyileştirme gereken bölgede kullanımına imkan vermesi açısından son derece önemlidir.

Kriyobiyoloji, solid organ ve dokulardan, süspansiyon halindeki hücrelere kadar çok geniş bir yelpazedeki farklı örneklerin dondurularak uzun süreli saklanmaya çalışıldığı bir bilim alanıdır. Çok düşük sıcaklıklar metabolizmanın tümüyle durmasına sebep olduğundan, uzun yıllardır savunulan genel bilimsel yaklaşım, doku ve hücrelerin uzun

sürelili kriyoprezervasyonu ve saklanmasında çok düşük sıcaklıklarda sıvı nitrojen içerisinde muhafaza edilmeleri (-196°C 'de) gerektiğidir [79], [152]. Güncel literatürde, adipoz dokular veya ADK-MKH'ler ile gerçekleştirilen kriyoprezervasyon çalışmalarında genellikle birkaç günden birkaç aya kadar değışen saklama süreleri kullanıldığı bildirilmektedir [125]. Mevcut literatürdeki bu heterojen saklama koşulları, adı geçen bilimsel çalışmaların çoğunlukla plastik cerrahi kliniklerinde gerçekleştirilmesine ve modern bir kriyoprezervasyon altyapısının (sıvı nitrojen-tabanlı soğutma ve saklama olanakları) olmayışına bağlıdır. Teorik olarak sıvı nitrojen içerisinde saklanan doku veya hücre örneklerinde saklama süresinin örnek üzerindeki canlılığa zamansal olarak bir etki yapması beklenmemektedir fakat literatürde bildirilen -196°C den yüksek saklama sıcaklıklarının ($+4^{\circ}\text{C}$ — 80°C arasında) hücre metabolizması ve membran yapısı üzerindeki geridönüşü olmayan olumsuz etkileri nedeniyle ciddi farklılıklar raporlanmıştır. Çalışmamızda güncel mevcut doku ve hücre dondurma/çözme stratejileri aynı donörlerden alından doku ve hücrelerde kısa/uzun saklama süreleri ve farklı saklama sıcaklıkları ($+4^{\circ}\text{C}$ 'den -196°C 'ye kadar) bakımından değeriendirilmiştir. Böylelikle yüksek saklama sıcaklıklarının uzun saklama sürelerinde yetersiz olduğu ve hücresel canlılığın hem doku hem de hücre düzeyinde kaybolduğu açık bir şekilde gösterilmiştir.

Thirumala ve arkadaşları yayınladıkları bir çalışmalarında ADK-MKH'ler ile gerçekleştirilen kriyoprezervasyon uygulamalarında kullanılan kriyoprotektan cinsi ve konsantrasyonunun yanında soğutma ve çözme sıcaklıklarının ve sıcaklık değışim hızının da çözme sonrası hücresel canlılık üzerinde önemli etkiler oluşturduğunu bildirmişlerdir. Adı geçen çalışmada ayrıca çözme sonrası elde edilen sonuçların aynı hücre suşunun farklı pasaj aşamalarında farklılık gösterdiği de bildirilmektedir [153]. Çalışmamız dahilinde kullanılan aşamalı yavaş dondurma yaklaşımı, uzun yıllardır kök hücreler de dahil olmak üzere pek çok hücrenin başarılı bir şekilde dondurulup geri kazanılabildiği bir protokoldür. Dolayısı ile gerek çalışma sonuçlarımız, gerekse mevcut literatür değeriendirildiğinde, yüksek dondurma sıcaklıklarının kullanıldığı ($+4^{\circ}\text{C}$, -20°C) dondurma ve saklama koşullarının uzun süreli (1 ay ve sonrası) optimal olmadığı, bu şekilde dondurulan ve saklanan doku örneklerinde histolojik olarak yapının korunduğu görölse de kök hücre/progenitör hücresel seviyesinde ciddi

kayıplar yaşandığı görülmektedir. Diğer taraftan -196°C 'de saklanan doku örnekleri dondurma ve saklama sıcaklığı düşük olduğundan çözme sonrası ciddi azalmış bir oranda da olsa hücresel canlılık belirtileri göstermiştir. Bu sonuçlara göre, pek çok plastik ve rekonstrüktif cerrahi kliniğinde halen adı geçen şartlarda saklanmakta olan adipoz dokuların çözme sonrası etkinlik düzeyleri ciddi olarak bozulmuş olarak beklenmektedir.

Doku ve hücre kriyoprezervasyonunda çözülmesi gereken bir diğer önemli problem, düşük soğutma ve saklama sıcaklıklarında hücre içi ve dışında bulunan su moleküllerinin kristalize olması sebebi ile oluşan hücresel ve yapısal hasarlardır. Bu problemin ortadan kaldırılması amacı ile kriyoprezervasyon uygulamalarında donma sıcaklıkları sudan daha düşük olan kriyoprotektanlar kullanılmaktadır. Bu konuda günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalarda en sık ve yoğun tercih edilen kriyoprotektan DMSO'dur. DMSO, genellikle %10'luk bir konsantrasyonda, %5'ten %90'a kadar değişen oranlarda FBS veya insan serumu ile karıştırılarak kullanılmaktadır. Son yıllarda özellikle klinikte gerçekleştirilen bazı kök hücre transplantasyonu uygulamalarında DMSO ile ilişkilendirebilen problemler görülmesi sonrası DMSO'nun özellikle klinik tedavi amaçlı kriyoprezervasyon uygulamalarında kullanımı ve olası toksik etkileri sorgulanmaktadır ve güncel çalışmalar DMSO oranlarının azaltılabildiği veya DMSO içermeyen alternatif kriyoprotektan kullanımı ile başarılı bir kriyoprezervasyon protokolü oluşturma konusunda yoğunlaşmaktadır [154], [155], [156], [157], [158]. Thirumbala ve arkadaşları DMSO ve metil selüloz ile 11 farklı kombinasyon yaratarak insan ADK-MKH'leri ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, metil selüloz ile birlikte kullanıldığında %2'lik bir DMSO oranının, sadece %10 DMSO içeren klasik kriyoprezervasyon mediumu ile elde edilen viabilite ve in vitro farklılaşma sonuçları ile benzer olduğunu göstermiştir [115]. Aynı çalışmada elde edilen bir diğer önemli sonuç, ADK-MKH'lerin kriyoprezervasyonu için mevcut koşullarda DMSO içermeyen bir kriyoprezervasyon mediumunun oldukça düşük viabiliteye ve artmış apoptoza (2-10 kat) neden olduğudur [115]. DMSO'dan sonra en yoğun olarak tercih edilen diğer kriyoprotektanlar etilen glikol (EG) ve propanedioldür (PrOH). EG, özellikle son yıllarda vitrifikasyon protokollerinde DMSO ile birlikte yüksek konsantrasyonda ve kokteyl olarak kullanılmaktadır. PrOH ise daha

yakın bir zaman içinde, DMSO'nun klinik kullanımı sonrasında bağlantılı olduğu düşünülen (yukarıda adı geçen) bazı yan etkileri ve riskleri azaltmak amacı ile DMSO'ya alternatif olarak vitrifikasyon protokollerinde yer almaya başlamıştır. Her üç kriyoprotektan da uzun yıllardır doku ve hücre bankacılığında kullanılıyor olsa da, bu maddelerin özellikle kök hücreler ile birlikte kullanımları ve hücreler üzerindeki olası etkileri konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır [159], [160]. Kriyoprotektanların sitotoksik etkileri zamana, ortam sıcaklığına ve konsantrasyona bağlı olarak değişebilmektedir [161]. Çalışmamızda bu kriyoprotektanlardan DMSO ve EG'nin farklı konsantrasyonları ve inkübasyon sürelerinin insan ADK-MKH hücreleri üzerindeki olası sitotoksik ve genotoksik etkileri değerlendirilmiş ve %30'a kadar kullanılan konsantrasyonların kısa inkübasyon sürelerinde (< 20 dakika) hücreler üzerinde belirgin olumsuz bir etki oluşturmadığı, sırası ile tripan mavisi vitalite testi ve TUNEL in situ apoptoz testi ile gösterilmiştir. Sonuçlar, yakın bir süre önce Aye ve arkadaşları tarafından CHO hücreleri ile gerçekleştirilen sonuçlar ile de büyük ölçüde benzer bulunmuştur [162]. Sonuçlar ayrıca literatürde adı geçen kriyoprotektanlar konusunda raporlanmış olası yan etki veya beklenmedik problemlerin, kriyoprezervasyon işlemleri için gerekli olan süreden çok daha uzun (>12 saat) inkübasyon süreleri neticesinde geliştiği, daha kısa süreli inkübasyon sürelerinde (< 3 saat) adı geçen kriyoprotektanların hücre üzerindeki olumsuz ve zararlı etki oluşturmadığı sonuçlarını da doğrulamaktadır. Çalışmamızın sonuçlarına göre, ayrıca 20 dakikadan uzun süreli inkübasyon sonrasında hücresel canlılık düzeylerinde gözlenen azalmanın doğrudan kriyoprotektan toksisitesine değil, hücrelerin oda sıcaklığında inkübe edilmesine ve kullanılan solüsyonların getirdiği ozmotik strese bağlı olabileceğini işaret etmektedir.

Histolojik inceleme, taze veya işlenmiş dokular ile gerçekleştirilen in vitro çalışmalarda sıklıkla kullanılan ve dolaylı olarak işlem yapılan doku içerisindeki hücresel aktiviteyi değerlendiren indirekt bir analiz yöntemidir. Bununla birlikte dokunun canlılık düzeyinin tayinindeki başarısı ve rolü sorgulanmaktadır [98]. Çalışmamızın doku kriyoprezervasyonu kısmında, farklı dondurma metodları ve saklama sıcaklıkları kullanılarak kriyoprezervasyonu gerçekleştirilen adipoz dokuların histolojik incelemeleri sonrası elde edilen olumlu sonuçların, aynı dokudan enzimatik

yolla elde edilen ADK-MKH hücre popülasyonu viabilitesi ile korelasyon göstermediği gözlenmiştir. Doku düzeyindeki inceleme (Eozin-hematoksilin ile histolojik analiz) ve hücresel analiz yöntemi (tripan mavisi viabilite testi) arasındaki adı geçen belirgin farklılıklar özellikle in vivo çalışmalarda histolojik incelemelerin yanında ek tetkiklerin eklenmesi gerekliliğini göstermiştir. Doku nakillerinde karşılaşılan öngörülemez geri emilme sonuçlarının da histolojik olarak pozitif görünen fakat hücresel viabilite veya metabolizma bakımından zarar görmüş örneklerdeki farklılık nedeni ile oluşabileceği, çalışmamızda ortaya çıkan sonuçlardan biridir.

Adipoz doku ve içerdiği hücrelerin analizi konusunda günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalarda hücresel viabilite için pek çok farklı testin kullanımı gündeme gelmiştir. Çalışmalarda en sık tercih edilen metod adipoz dokunun kolajenaz enzimi ile ayrıştırılması sonrası hücre süspansiyonu üzerinde uygulanan tripan mavisidir [163]. Güncel hücre kültür çalışmalarında sıklıkla kullanılan MTT testi, içerdiği formazan'ın suda çözünür olması sebebi ile adipoz doku çalışmalarında anlamlı sonuçlar vermemektedir [164]. XTT, AnnexinV, Glukoz transport testi ve G3PDH testi doku bütünlüğünü bozmadan adipoz dokuda viabilite tayinine imkan verseler de, bu testlerde olgun adiposit/kök hücre ayrımı yapılması mümkün değildir [106], [165] [133], [140]. Çalışmamızda hücre viabilitesinin dokunun rejenerasyon kapasitesinde etkin olan SVF/ADK-MKH hücreleri kullanılarak ölçülmesi planlandığından, viabilite tayini testi olarak adı geçen testlerin kullanımlarının bir avantaj sağlamadığına karar verilmiş ve tercih edilmemiştir.

Çalışmamızda elde edilen bulgular, pek çok hücre veya doku kriyoprezervasyonu sonuçları ile kıyaslandığında kriyoprotektan kullanmaksızın veya sadece sükrozun kriyoprotektan olarak kullanıldığı çalışma gruplarında da çözme sonrası bir miktar canlılık görüldüğünü göstermektedir. Etkin bir doku veya hücre kriyoprezervasyon protokolü oluşturulması çalışmalarında nihai amaç her zaman mevcut membran yapısal bütünlüğünü koruyarak hücre içi buz kristali oluşumunu engellemektir. Bu açıdan adipoz doku ve içerdiği adiposit hücreleri, yapılarının büyük bir miktarı lipidlerden oluştuğundan ve düşük oranda sitoplazmik organel/intrasitoplazmik su molekülleri içerdiklerinden, kriyoprezervasyon uygulamalarına bağlı hücresel hasar görme olasılıkları da orantısız olarak daha düşük olarak beklenmektedir. Nitekim

çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile uyumlu olarak yakın geçmişte gerçekleştirilen bazı çalışmalarda, herhangi bir kriyoprotektan kullanılmadığı halde düşük oranda da olsa gözlenen viabilite ve hücre gelişimi, matür adipositlerin sitoplazmalarında bulunan düşük su oranı ile ilişkilendirilebilir.

Dondurma protokollerinde aşamalı yavaş dondurma ve belirli oranda kriyoprotektan kullanımı beraberinde düşük canlılık oranlarını kabul edilebilir rakamlara çıkarabilmektedir. Diğer taraftan, mevcut canlılık ölçen boyama teknikleri ile yapılan değerlendirmeler gerçek hücre viabilite oranlarını olduğundan daha yüksek bir seviyede de gösterebilir. Bu anlamda hücresel canlılığın en etkin ölçüm yolu ve yöntemi, dokuların farklı metodlar ile dondurulup çözülmesi sonrası dokudan hücre izolasyonu ve izole edilen hücrelerin kültür ortamındaki gelişimi ve in vitro farklılaşma gibi fonksiyonel testlerin sonuçlarıdır. Çalışmamızda farklı metodlar ile dondurma/çözme uygulanan adipoz doku ve ADK-MKH'lerin canlılık düzeyleri sadece çözme sonrası membran permeabilitesi bakımından incelenmemiş, aynı zamanda doku ve hücrelerin in vitro şartlarda hücresel ve fonksiyonel verimliliği de in vitro farklılaşma testleri kullanılarak ölçülmüştür. Böylece, mevcut koşullarda doku ve hücre seviyesinde en uygun kriyoprezervasyon yaklaşımı belirlenmeye çalışılmıştır.

Vitrifikasyon tekniği, özellikle son yıllarda doku ve hücrelerin etkin ve verimli olarak dondurulması çalışmalarında sıklıkla kullanılmaya başlanan bir tekniktir. Özellikle son 10 yılda memeli kaynaklı pek çok dokunun ve hücre tipinin vitrifikasyon tekniği ile başarılı bir şekilde dondurulduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte tekniğin adipoz doku ve içerdiği kök hücreler üzerindeki etkinliğini değerlendiren bir çalışma henüz literatürde mevcut değildir. Çalışmamız, güncel literatürde vitrifikasyon tekniğinin adipoz doku ve içerdiği kök hücrelerin kriyoprezervasyonunda etkin kullanılabilirliğinin test edildiği ilk çalışma olması açısından önemlidir. Özellikle doku düzeyinde konvansiyonel kriyoprezervasyon sonrası gözlenen düşük canlılık oranları çalışmamızda bu metod ile aşılmış ve dokunun yapısı korunarak içerdiği ADK-MKH'lerin de fonksiyonel olarak etkin geri kazanımları sağlanmıştır. Bununla birlikte, hücresel düzeyde gerçekleştirilen vitrifikasyon deneylerinde, kısa inkübasyon süreleri ve hücrelerin farklı kriyoprotektan kokteylleri ile inkübasyon aşamaları arasında gerekli olan yıkama amaçlı ardışık sentrifügasyon uygulamaları, tekniğin hücre

düzeyinde kullanımını zorlaştırmıştır ve adı geçen zorluklar vitrifikasyon metodu dışında, tamamen işlem kaynaklı hücre ve canlılık kaybını arttırabildiği görülmüştür. Dolayısı ile çalışmamızda elde edilen deneysel sonuçlar, adipoz doku ve ADK-MKH'lerin sırasıyla vitrifikasyon ve aşamalı yavaş dondurma yöntemleri ile ayrı ayrı dondurularak saklanması en etkin kriyobank yöntemi olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda elde edilen ve mevcut teknikler ile kök hücre oldukları tanımlanmış ADK-MKH'ler ile, çalışmanın amacı doğrultusunda kurum içi bir kriyobank oluşturulmuştur ve bu hücreler mevcut çalışmalarımızda ve projelerimizde etkin birer hücre kaynağı olarak literatüre geçmiştir ve halen kullanılmaktadır [25], [26].

Çalışmamızda elde edilen bulgular, ayrıca adipoz dokudan enzimatik yolla elde edilen ADK-MKH hücreleri ile izolasyonları sonrası programlı ve uygun kriyoprotektanlar kullanılarak dondurulması ve saklanması adipoz dokunun doğrudan dondurulup saklanması yaklaşımına kıyasla anlamlı olarak avantajlı olduğunu göstermektedir. Gerek volümetrik açıdan gerekse kriyoprezervasyon ve saklama koşulları açısından doku yerine hücrelerin saklanması özellikle çözme sonrası kabul edilebilir hücresel canlılık, hücresel bütünlüğünün ve fonksiyonelliğin korunması, dondurma ve saklama alanı ihtiyacını ciddi oranda azaltması gibi avantajlar sebebi ile yakın gelecekte yüksek oranda tercih edilecek bir yaklaşımdır.

Çalışmamızda elde edilen ve mevcut güncel literatüre önemli katkılar sağlayabilen sonuçlar yanında, çalışma süresi içerisinde gerçekleştirilmesi mümkün olmayan veya cevaplanamayan sorular da mevcuttur. Bu sorulardan ilki, deneylerde kullanılan serum kaynağının doku ve hücre dondurulması sonuçlarına etkisidir. Çalışma süresince tüm doku/hücre kültürü uygulamalarında ve kriyoprezervasyon/çözme protokollerinde serum kaynağı olarak %10'luk oranda FBS kullanılmıştır. Bazı hassas doku ve hücrelerin gerek izolasyonunda gerekse dondurma ve saklanmasında yüksek oranlı FBS kullanımının çözme sonrası viabiliteyi anlamlı olarak arttırabildiği de bilinen bir gerçektir. Bununla birlikte ADK-MKH hücreleri ile her gün artan sayıda klinik öncesi ve klinik tedavi çalışmaları gerçekleştirmekte, bu durum da beraberinde patojenik olmayan ve hayvan kaynaklı-olmayan etkin bir alternatif arayışlarını getirmektedir. Kocaoemer ve arkadaşları bu amaçla gerçekleştirdikleri çalışmalarında FBS'ye alternatif olarak havuz halinde birkaç bireyden toplanmış ve hücre kültürü için

hazırlanmış AB grubu insan serumu ile trombin-aktive edilmiş Trombosit yönünden zengin plazmayı (PRP) karşılaştırmışlar, her iki alternatifin de gerek hücre gelişim, viabilite ve immünofenotipleme yönünden, gerekse farklı dokulara ve hücrelere farklılaşma potansiyelleri yönünden daha etkin olduklarını göstermişlerdir [166]. Yukarıda da belirtildiği gibi çalışmamızda tüm aşamalarda serum olarak hayvan kaynaklı FBS kullanıldığından, elde edilen sonuçların insan serumu veya PRP kullanımı sonrası ne olacağı bilinmemektedir ve bu soru tartışmaya açık bir konu olarak beraberinde yeni araştırmaları da indüklemektedir. Son yıllarda özellikle klinik kullanıma uygun kök hücre-tabanlı tedavilerde kullanılan kök hücre kaynaklarının, tedavi edici etkilerinin yanında beraberinde farklı patojen veya parazit enjeksiyonu riskini de arttırabildiği, bu çalışmamızda elde edilen ADK-MKH'ler ile gerçekleştirdiğimiz başka bir çalışmamızda bildirilmiştir[26].

Çalışmamız doğrultusunda tüm deneyler kriyoprezervasyon protokollerinin in vitro etkinliğini test etmek amacıyla gerçekleştirildiğinden, araştırması ve optimizasyonu yapılan protokollerin ve etkinliklerinin in vivo şartlardaki sonuçları bilinmemektedir. Güncel literatürde, farklı kriyoprezervasyon modelleri ile gerçekleştirilmiş ve deney hayvanları modellerinde testi yapılmış çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu amaçla, çalışmamızda elde edilen sonuçların in vivo hayvan modellerinde veya preklinik çalışmalarda incelenmesi ve klinik kullanımdaki performanslarının detaylı olarak test edilmesi amacıyla laboratuvarımızda yeni bir çalışma başlatılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada, yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere, insan adipoz dokusu ve içerdiği ADK-MKH'lerinin kriyoprezervasyonunda kullanılan farklı kriyoprotektanların adipoz doku ve içerdiği kök hücreler üzerindeki toksik etkileri belirlenmiştir. Mevcut konvansiyonel aşamalı yavaş dondurma yöntemi ve literatürde ilk kez vitrifikasyon yöntemi kullanılarak kriyoprezervasyonlarının gerçekleştirilmesi sonucunda, bu yöntemlerin doku ve kök hücreler üzerinde oluşturduğu olası yapısal ve fonksiyonel değişiklikler saptanmıştır. Elde edilen verilere dayanarak insan adipoz dokusu ve içerdiği ADK-MKH'lerin kriyoprezervasyon protokolleri optimize edilmiş, böylece güncel çalışmalarda veya yakın gelecekte araştırma veya klinik kullanım amaçlı doku ve kök hücre kriyobankı oluşturulmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Hammerle, C.H. Giannobile, W.V. ve Working Group 1 of the European Workshop on, P., (2014). "Biology of soft tissue wound healing and regeneration--consensus report of Group 1 of the 10th European Workshop on Periodontology", J Clin Periodontol, 41 Suppl 15:1-5.
- [2] Shandalov, Y. Egozi, D. Koffler, J. Dado-Rosenfeld, D. Ben-Shimol, D. Freiman, A. Shor, E. Kabala, A. ve Levenberg, S., (2014). "An engineered muscle flap for reconstruction of large soft tissue defects", Proc Natl Acad Sci U S A, 111: 6010-6015.
- [3] Philips, B.J. Marra, K.G. ve Rubin, J.P., (2014). "Healing of grafted adipose tissue: current clinical applications of adipose-derived stem cells for breast and face reconstruction", Wound Repair Regen, 22 Suppl 1: 11-13.
- [4] Coleman, S.R., (2001). "Structural fat grafts: the ideal filler?", Clin Plast Surg, 28: 111-119.
- [5] Sommer, B. ve Sattler, G., (2000). "Current concepts of fat graft survival: histology of aspirated adipose tissue and review of the literature", Dermatol Surg, 26: 1159-1166.
- [6] Illouz, Y.G., (1988). "Present results of fat injection", Aesthetic Plast Surg, 12: 175-181.
- [7] Fournier, P.F., (1990). "Facial recontouring with fat grafting", Dermatol Clin, 8: 523-537.
- [8] Li, B.W. Liao, W.C. Wu, S.H. ve Ma, H., (2012). "Cryopreservation of fat tissue and application in autologous fat graft: in vitro and in vivo study", Aesthetic Plast Surg, 36: 714-722.
- [9] Kuran, I. ve Tumerdem, B., (2005). "A new simple method used to prepare fat for injection", Aesthetic Plast Surg, 29: 18-22.
- [10] Casadei, A. Epis, R. Ferroni, L. Tocco, I. Gardin, C. Bressan, E. Sivoletta, S. Vindigni, V. Pinton, P. Mucci, G. ve Zavan, B., (2012). "Adipose tissue regeneration: a state of the art", J Biomed Biotechnol, 2012: 462543.

- [11] Wang, W.Z. Fang, X.H. Williams, S.J. Stephenson, L.L. Baynosa, R.C. Wong, N. Khiabani, K.T. ve Zamboni, W.A., (2013). "The effect of lipoaspirates cryopreservation on adipose-derived stem cells", *Aesthet Surg J*, 33: 1046-1055.
- [12] Schaffler, A. ve Buchler, C., (2007). "Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies", *Stem Cells*, 25: 818-827.
- [13] Caplan, A.I. ve Dennis, J.E., (2006). "Mesenchymal stem cells as trophic mediators", *J Cell Biochem*, 98: 1076-1084.
- [14] Cannon, B. ve Nedergaard, J., (2008). "Developmental biology: Neither fat nor flesh", *Nature*, 454: 947-948.
- [15] Owen, M. ve Friedenstein, A.J., (1988). "Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors", *Ciba Found Symp*, 136: 42-60.
- [16] Caplan, A.I., (1991). "Mesenchymal stem cells", *J Orthop Res*, 9: 641-650.
- [17] Sensebe, L. Krampera, M. Schrezenmeier, H. Bourin, P. ve Giordano, R., (2010). "Mesenchymal stem cells for clinical application", *Vox Sang*, 98: 93-107.
- [18] Philippe, B. Luc, S. Valerie, P.B. Jerome, R. Alessandra, B.R. ve Louis, C., (2010). "Culture and Use of Mesenchymal Stromal Cells in Phase I and II Clinical Trials", *Stem Cells Int*, 2010: 503593.
- [19] da Silva Meirelles, L. Chagastelles, P.C. ve Nardi, N.B., (2006). "Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues", *J Cell Sci*, 119: 2204-2213.
- [20] Crisan, M. Yap, S. Casteilla, L. Chen, C.W. Corselli, M. Park, T.S. Andriolo, G. Sun, B. Zheng, B. Zhang, L. Norotte, C. Teng, P.N. Traas, J. Schugar, R. Deasy, B.M. Badylak, S. Buhring, H.J. Giacobino, J.P. Lazzari, L. Huard, J. ve Peault, B., (2008). "A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs", *Cell Stem Cell*, 3: 301-313.
- [21] Zuk, P.A. Zhu, M. Mizuno, H. Huang, J. Futrell, J.W. Katz, A.J. Benhaim, P. Lorenz, H.P. ve Hedrick, M.H., (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies", *Tissue Eng*, 7: 211-228.
- [22] Strem, B.M. Hicok, K.C. Zhu, M. Wulur, I. Alfonso, Z. Schreiber, R.E. Fraser, J.K. ve Hedrick, M.H., (2005). "Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells", *Keio J Med*, 54: 132-141.
- [23] Zuk, P.A. Zhu, M. Ashjian, P. De Ugarte, D.A. Huang, J.I. Mizuno, H. Alfonso, Z.C. Fraser, J.K. Benhaim, P. ve Hedrick, M.H., (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells", *Mol Biol Cell*, 13: 4279-4295.
- [24] De Ugarte, D.A. Morizono, K. Elbarbary, A. Alfonso, Z. Zuk, P.A. Zhu, M. Drago, J.L. Ashjian, P. Thomas, B. Benhaim, P. Chen, I. Fraser, J. ve Hedrick, M.H., (2003). "Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow", *Cells Tissues Organs*, 174: 101-109.
- [25] Allahverdiyev, A.M. Baydar, S.Y. Bagirova, M. ve Findikli, N., (2012). "Microcapillary culture method: a novel tool for in vitro expansion of stem cells from scarce sources", *Arch Med Res*, 43: 423-430.

- [26] Allahverdiyev, A.M. Bagirova, M. Elcicek, S. Koc, R.C. Baydar, S.Y. Findikli, N. ve Oztel, O.N., (2011). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a new host cell in latent leishmaniasis", *Am J Trop Med Hyg*, 85: 535-539.
- [27] Roux, C. Pisani, D.F. Yahia, H.B. Djedaini, M. Beranger, G.E. Chambard, J.C. Ambrosetti, D. Michiels, J.F. Breuil, V. Ailhaud, G. Euller-Ziegler, L. ve Amri, E.Z., (2013). "Chondrogenic potential of stem cells derived from adipose tissue: a powerful pharmacological tool", *Biochem Biophys Res Commun*, 440: 786-791.
- [28] Zeisberger, S.M. Schulz, J.C. Mairhofer, M. Ponsaerts, P. Wouters, G. Doerr, D. Katsen-Globa, A. Ehrbar, M. Hescheler, J. Hoerstrup, S.P. Zisch, A.H. Kolbus, A. ve Zimmermann, H., (2011). "Biological and physicochemical characterization of a serum- and xeno-free chemically defined cryopreservation procedure for adult human progenitor cells", *Cell Transplant*, 20: 1241-1257.
- [29] Ikebe, C. ve Suzuki, K., (2014). "Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: optimization of cell preparation protocols", *Biomed Res Int*, 2014: 951512.
- [30] Kim, Y.J. ve Jeong, J.H., (2014). "Clinical application of adipose stem cells in plastic surgery", *J Korean Med Sci*, 29: 462-467.
- [31] Liu, G. Zhou, H. Li, Y. Li, G. Cui, L. Liu, W. ve Cao, Y., (2008). "Evaluation of the viability and osteogenic differentiation of cryopreserved human adipose-derived stem cells", *Cryobiology*, 57: 18-24.
- [32] Coleman, S.R., (2006). "Structural fat grafting: more than a permanent filler", *Plast Reconstr Surg*, 118: 108S-120S.
- [33] Jackson, I.T. Simman, R. Tholen, R. ve DiNick, V.D., (2001). "A successful long-term method of fat grafting: recontouring of a large subcutaneous postradiation thigh defect with autologous fat transplantation", *Aesthetic Plast Surg*, 25: 165-169.
- [34] Rigotti, G. Marchi, A. Galie, M. Baroni, G. Benati, D. Krampera, M. Pasini, A. ve Sbarbati, A., (2007). "Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells", *Plast Reconstr Surg*, 119: 1409-1422; discussion 1423-1404.
- [35] Choi, Y.C. Choi, J.S. Woo, C.H. ve Cho, Y.W., (2014). "Stem cell delivery systems inspired by tissue-specific niches", *J Control Release*.
- [36] Schofield, R., (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell", *Blood Cells*, 4: 7-25.
- [37] Moore, K.A. ve Lemischka, I.R., (2006). "Stem cells and their niches", *Science*, 311: 1880-1885.
- [38] Jeon, I.K. Lee, H. Shin, J.Y. ve Oh, S.H., (2014). "Cryopreserved autologous fat injections as a filler agent for facial augmentation: are they still safe?", *Yonsei Med J*, 55: 280-281.
- [39] Yoshimura, K. Sato, K. Aoi, N. Kurita, M. Inoue, K. Suga, H. Eto, H. Kato, H. Hirohi, T. ve Harii, K., (2008). "Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy:

- efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells", *Dermatol Surg*, 34: 1178-1185.
- [40] Yoshimura, K. Sato, K. Aoi, N. Kurita, M. Hirohi, T. ve Harii, K., (2008). "Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells", *Aesthetic Plast Surg*, 32: 48-55; discussion 56-47.
 - [41] Zhu, M. Zhou, Z. Chen, Y. Schreiber, R. Ransom, J.T. Fraser, J.K. Hedrick, M.H. Pinkernell, K. ve Kuo, H.C., (2010). "Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention", *Ann Plast Surg*, 64: 222-228.
 - [42] Tiryaki, T. Findikli, N. ve Tiryaki, D., (2011). "Staged stem cell-enriched tissue (SET) injections for soft tissue augmentation in hostile recipient areas: a preliminary report", *Aesthetic Plast Surg*, 35: 965-971.
 - [43] Poels, J. Van Langendonck, A. Dehoux, J.P. Donnez, J. ve Wyns, C., (2012). "Vitrification of non-human primate immature testicular tissue allows maintenance of proliferating spermatogonial cells after xenografting to recipient mice", *Theriogenology*, 77: 1008-1013.
 - [44] Chang, H.J. Moon, J.H. Lee, J.R. Jee, B.C. Suh, C.S. ve Kim, S.H., (2011). "Optimal condition of vitrification method for cryopreservation of human ovarian cortical tissues", *J Obstet Gynaecol Res*, 37: 1092-1101.
 - [45] Rodriguez-Wallberg, K.A. ve Oktay, K., (2012). "Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation", *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 26: 391-405.
 - [46] Vajta, G., (2013). "Vitrification in human and domestic animal embryology: work in progress", *Reprod Fertil Dev*, 25: 719-727.
 - [47] Amorim, C.A. Curaba, M. Van Langendonck, A. Dolmans, M.M. ve Donnez, J., (2011). "Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue", *Reprod Biomed Online*, 23: 160-186.
 - [48] Abazari, A. Jomha, N.M. Elliott, J.A. ve McGann, L.E., (2013). "Cryopreservation of articular cartilage", *Cryobiology*, 66: 201-209.
 - [49] Fujita, T. Takami, Y. Ezoe, K. Saito, T. Sato, A.K. Takeda, N. Yamamoto, Y. Homma, K. Jimbow, K. ve Sato, N., (2000). "Successful preservation of human skin by vitrification", *J Burn Care Rehabil*, 21: 304-309.
 - [50] Dahl, S.L. Chen, Z. Solan, A.K. Brockbank, K.G. Niklason, L.E. ve Song, Y.C., (2006). "Feasibility of vitrification as a storage method for tissue-engineered blood vessels", *Tissue Eng*, 12: 291-300.
 - [51] Patrick, C.W., Jr., (2001). "Tissue engineering strategies for adipose tissue repair", *Anat Rec*, 263: 361-366.
 - [52] Lavik, E. ve Langer, R., (2004). "Tissue engineering: current state and perspectives", *Appl Microbiol Biotechnol*, 65: 1-8.

- [53] Lin, S.D. Wang, K.H. ve Kao, A.P., (2008). "Engineered adipose tissue of predefined shape and dimensions from human adipose-derived mesenchymal stem cells", *Tissue Eng Part A*, 14: 571-581.
- [54] Choi, Y.S. Park, S.N. ve Suh, H., (2005). "Adipose tissue engineering using mesenchymal stem cells attached to injectable PLGA spheres", *Biomaterials*, 26: 5855-5863.
- [55] Mauney, J.R. Nguyen, T. Gillen, K. Kirker-Head, C. Gimble, J.M. ve Kaplan, D.L., (2007). "Engineering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds", *Biomaterials*, 28: 5280-5290.
- [56] Cronin, K.J. Messina, A. Knight, K.R. Cooper-White, J.J. Stevens, G.W. Penington, A.J. ve Morrison, W.A., (2004). "New murine model of spontaneous autologous tissue engineering, combining an arteriovenous pedicle with matrix materials", *Plast Reconstr Surg*, 113: 260-269.
- [57] Vashi, A.V. Abberton, K.M. Thomas, G.P. Morrison, W.A. O'Connor, A.J. Cooper-White, J.J. ve Thompson, E.W., (2006). "Adipose tissue engineering based on the controlled release of fibroblast growth factor-2 in a collagen matrix", *Tissue Eng*, 12: 3035-3043.
- [58] Hiraoka, Y. Yamashiro, H. Yasuda, K. Kimura, Y. Inamoto, T. ve Tabata, Y., (2006). "In situ regeneration of adipose tissue in rat fat pad by combining a collagen scaffold with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor", *Tissue Eng*, 12: 1475-1487.
- [59] Kimura, Y. Ozeki, M. Inamoto, T. ve Tabata, Y., (2003). "Adipose tissue engineering based on human preadipocytes combined with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor", *Biomaterials*, 24: 2513-2521.
- [60] Halbleib, M. Skurk, T. de Luca, C. von Heimburg, D. ve Hauner, H., (2003). "Tissue engineering of white adipose tissue using hyaluronic acid-based scaffolds. I: in vitro differentiation of human adipocyte precursor cells on scaffolds", *Biomaterials*, 24: 3125-3132.
- [61] Solchaga, L.A. Dennis, J.E. Goldberg, V.M. ve Caplan, A.L., (1999). "Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage", *J Orthop Res*, 17: 205-213.
- [62] Polykandriotis, E. Arkudas, A. Horch, R.E. ve Kneser, U., (2008). "To matrigel or not to matrigel", *Am J Pathol*, 172: 1441; author reply 1441-1442.
- [63] Abberton, K.M. Bortolotto, S.K. Woods, A.A. Findlay, M. Morrison, W.A. Thompson, E.W. ve Messina, A., (2008). "Myogel, a novel, basement membrane-rich, extracellular matrix derived from skeletal muscle, is highly adipogenic in vivo and in vitro", *Cells Tissues Organs*, 188: 347-358.
- [64] Brey, E.M. ve Patrick, C.W., Jr., (2000). "Tissue engineering applied to reconstructive surgery", *IEEE Eng Med Biol Mag*, 19: 122-125.

- [65] Giordano, A. Galderisi, U. ve Marino, I.R., (2007). "From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells", *J Cell Physiol*, 211: 27-35.
- [66] Patrick, C.W., Jr. Chauvin, P.B. Hobbey, J. ve Reece, G.P., (1999). "Preadipocyte seeded PLGA scaffolds for adipose tissue engineering", *Tissue Eng*, 5: 139-151.
- [67] Gimble, J.M., (2003). "Adipose tissue-derived therapeutics", *Expert Opin Biol Ther*, 3: 705-713.
- [68] Gimble, J.M. Katz, A.J. ve Bunnell, B.A., (2007). "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine", *Circ Res*, 100: 1249-1260.
- [69] Eto, H. Suga, H. Matsumoto, D. Inoue, K. Aoi, N. Kato, H. Araki, J. ve Yoshimura, K., (2009). "Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue", *Plast Reconstr Surg*, 124: 1087-1097.
- [70] Gimble, J.M. Guilak, F. ve Bunnell, B.A., (2010). "Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells", *Stem Cell Res Ther*, 1: 19.
- [71] Patrikoski, M. Juntunen, M. Boucher, S. Campbell, A. Vemuri, M.C. Mannerstrom, B. ve Miettinen, S., (2013). "Development of fully defined xeno-free culture system for the preparation and propagation of cell therapy-compliant human adipose stem cells", *Stem Cell Res Ther*, 4: 27.
- [72] Lim, M.H. Ong, W.K. ve Sugii, S., (2014). "The current landscape of adipose-derived stem cells in clinical applications", *Expert Rev Mol Med*, 16: e8.
- [73] Casiraghi, F. Remuzzi, G. Abbate, M. ve Perico, N., (2013). "Multipotent mesenchymal stromal cell therapy and risk of malignancies", *Stem Cell Rev*, 9: 65-79.
- [74] Klopp, A.H. Gupta, A. Spaeth, E. Andreeff, M. ve Marini, F., 3rd, (2011). "Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth?", *Stem Cells*, 29: 11-19.
- [75] Pegg, D.E., (2002). "The history and principles of cryopreservation", *Semin Reprod Med*, 20: 5-13.
- [76] Pegg, D.E., (1987). "Mechanisms of freezing damage", *Symp Soc Exp Biol*, 41: 363-378.
- [77] Muldrew, K. ve McGann, L.E., (1990). "Mechanisms of intracellular ice formation", *Biophys J*, 57: 525-532.
- [78] Leibo, S.P. McGrath, J.J. ve Cravalho, E.G., (1978). "Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate", *Cryobiology*, 15: 257-271.
- [79] Pegg, D.E., (2007). "Principles of cryopreservation", *Methods Mol Biol*, 368: 39-57.
- [80] Lovelock, J.E., (1953). "The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing", *Biochim Biophys Acta*, 10: 414-426.

- [81] Mazur, P., (1963). "Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing", *J Gen Physiol*, 47: 347-369.
- [82] Lovelock, J.E., (1954). "The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing", *Biochem J*, 56: 265-270.
- [83] Polge, C. Smith, A.U. ve Parkes, A.S., (1949). "Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures", *Nature*, 164: 666.
- [84] Lovelock, J.E. ve Bishop, M.W., (1959). "Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide", *Nature*, 183: 1394-1395.
- [85] Pegg, D.E. Wusteman, M.C. ve Wang, L., (2006). "Cryopreservation of articular cartilage. Part 1: conventional cryopreservation methods", *Cryobiology*, 52: 335-346.
- [86] Anchordoguy, T.J. Rudolph, A.S. Carpenter, J.F. ve Crowe, J.H., (1987). "Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing", *Cryobiology*, 24: 324-331.
- [87] Crowe, J.H. Crowe, L.M. Carpenter, J.F. Rudolph, A.S. Wistrom, C.A. Spargo, B.J. ve Anchordoguy, T.J., (1988). "Interactions of sugars with membranes", *Biochim Biophys Acta*, 947: 367-384.
- [88] Doebbler, G.F. ve Rinfret, A.P., (1965). "Rapid freezing of human blood. Physical and chemical considerations of injury and protection", *Cryobiology*, 1: 205-211.
- [89] Connor, W. ve Ashwood-Smith, M.J., (1973). "Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with polymers; possible mechanisms", *Cryobiology*, 10: 488-496.
- [90] Fahy, G.M., (1986). "The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology", *Cryobiology*, 23: 1-13.
- [91] Edgar, D.H. ve Gook, D.A., (2012). "A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos", *Hum Reprod Update*, 18: 536-554.
- [92] Hubel, A. Spindler, R. ve Skubitz, A.P., (2014). "Storage of human biospecimens: selection of the optimal storage temperature", *Biopreserv Biobank*, 12: 165-175.
- [93] Pu, L.L., (2009). "Cryopreservation of adipose tissue", *Organogenesis*, 5: 138-142.
- [94] MacRae, J.W. Tholpady, S.S. Ogle, R.C. ve Morgan, R.F., (2004). "Ex vivo fat graft preservation: effects and implications of cryopreservation", *Ann Plast Surg*, 52: 281-282; discussion 283.
- [95] Shoshani, O. Ullmann, Y. Shupak, A. Ramon, Y. Gilhar, A. Kehat, I. ve Peled, I.J., (2001). "The role of frozen storage in preserving adipose tissue obtained by suction-assisted lipectomy for repeated fat injection procedures", *Dermatol Surg*, 27: 645-647.

- [96] Atik, B. Ozturk, G. Erdogan, E. ve Tan, O., (2006). "Comparison of techniques for long-term storage of fat grafts: an experimental study", *Plast Reconstr Surg*, 118: 1533-1537.
- [97] Cui, X. ve Pu, L.L., (2009). "The search for a useful method for the optimal cryopreservation of adipose aspirates: part I. In vitro study", *Aesthet Surg J*, 29: 248-252.
- [98] Moscatello, D.K. Dougherty, M. Narins, R.S. ve Lawrence, N., (2005). "Cryopreservation of human fat for soft tissue augmentation: viability requires use of cryoprotectant and controlled freezing and storage", *Dermatol Surg*, 31: 1506-1510.
- [99] Wolter, T.P. von Heimburg, D. Stoffels, I. Groeger, A. ve Pallua, N., (2005). "Cryopreservation of mature human adipocytes: in vitro measurement of viability", *Ann Plast Surg*, 55: 408-413.
- [100] Pu, L.L. Cui, X. Fink, B.F. Cibull, M.L. ve Gao, D., (2004). "Long-term preservation of adipose aspirates after conventional lipoplasty", *Aesthet Surg J*, 24: 536-541.
- [101] Gonda, K. Shigeura, T. Sato, T. Matsumoto, D. Suga, H. Inoue, K. Aoi, N. Kato, H. Sato, K. Murase, S. Koshima, I. ve Yoshimura, K., (2008). "Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation", *Plast Reconstr Surg*, 121: 401-410.
- [102] Choudhery, M.S. Badowski, M. Muise, A. Pierce, J. ve Harris, D.T., (2014). "Cryopreservation of whole adipose tissue for future use in regenerative medicine", *J Surg Res*, 187: 24-35.
- [103] Matsumoto, D. Shigeura, T. Sato, K. Inoue, K. Suga, H. Kato, H. Aoi, N. Murase, S. Gonda, K. ve Yoshimura, K., (2007). "Influences of preservation at various temperatures on liposuction aspirates", *Plast Reconstr Surg*, 120: 1510-1517.
- [104] Erdim, M. Tezel, E. Numanoglu, A. ve Sav, A., (2009). "The effects of the size of liposuction cannula on adipocyte survival and the optimum temperature for fat graft storage: an experimental study", *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 62: 1210-1214.
- [105] Grewal, N. Yacomotti, L. Melkonyan, V. Massey, M. Bradley, J.P. ve Zuk, P.A., (2009). "Freezing adipose tissue grafts may damage their ability to integrate into the host", *Connect Tissue Res*, 50: 14-28.
- [106] Son, D. Oh, J. Choi, T. Kim, J. Han, K. Ha, S. ve Lee, K., (2010). "Viability of fat cells over time after syringe suction lipectomy: the effects of cryopreservation", *Ann Plast Surg*, 65: 354-360.
- [107] Lee, J.E. Kim, I. ve Kim, M., (2010). "Adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells obtained from cryopreserved adipose aspirates", *Dermatol Surg*, 36: 1078-1083.
- [108] Chaput, B. Orio, J. Garrido, I. De Bonnezaze, G. Espagnolle, N. Gadelorge, M. Chavoïn, J.P. Grolleau-Raoux, J.L. Casteilla, L. Planat, V. ve Bourin, P., (2014).

- "A clinical scalable cryopreservation method of adipose tissue for reconstructive surgery assessed by stromal vascular fraction and mice studies", *Plast Reconstr Surg*, 133: 815-826.
- [109] Moscatiello, F. Aznar-Benitah, S. Grella, R. ve Jover, J.H., (2010). "Gluteal augmentation with cryopreserved fat", *Aesthet Surg J*, 30: 211-216.
 - [110] Erol, O.O. ve Agaoglu, G., (2013). "Facial rejuvenation with staged injections of cryopreserved fat and tissue cocktail: clinical outcomes in the past 10 years", *Aesthet Surg J*, 33: 639-653.
 - [111] Ullmann, Y. Shoshani, O. Fodor, L. Ramon, Y. Carmi, N. Shupak, A. Lincoln, R. ve Gilhar, A., (2004). "Long-term fat preservation", *J Drugs Dermatol*, 3: 266-269.
 - [112] Ko, M.S. Jung, J.Y. Shin, I.S. Choi, E.W. Kim, J.H. Kang, S.K. ve Ra, J.C., (2011). "Effects of expanded human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on the viability of cryopreserved fat grafts in the nude mouse", *Int J Med Sci*, 8: 231-238.
 - [113] James, A.W. Levi, B. Nelson, E.R. Peng, M. Commons, G.W. Lee, M. Wu, B. ve Longaker, M.T., (2011). "Deleterious effects of freezing on osteogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells in vitro and in vivo", *Stem Cells Dev*, 20: 427-439.
 - [114] Thirumala, S. Wu, X. Gimble, J.M. ve Devireddy, R.V., (2010). "Evaluation of polyvinylpyrrolidone as a cryoprotectant for adipose tissue-derived adult stem cells", *Tissue Eng Part C Methods*, 16: 783-792.
 - [115] Thirumala, S. Gimble, J.M. ve Devireddy, R.V., (2010). "Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells", *Stem Cells Dev*, 19: 513-522.
 - [116] De Rosa, A. De Francesco, F. Tirino, V. Ferraro, G.A. Desiderio, V. Paino, F. Pirozzi, G. D'Andrea, F. ve Papaccio, G., (2009). "A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: an attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology", *Tissue Eng Part C Methods*, 15: 659-667.
 - [117] Rodriguez, A.M. Pisani, D. Dechesne, C.A. Turc-Carel, C. Kurzenne, J.Y. Wdziekonski, B. Villageois, A. Bagnis, C. Breittmayer, J.P. Groux, H. Ailhaud, G. ve Dani, C., (2005). "Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse", *J Exp Med*, 201: 1397-1405.
 - [118] Zaragosi, L.E. Ailhaud, G. ve Dani, C., (2006). "Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells", *Stem Cells*, 24: 2412-2419.
 - [119] Denker, A.E. Nicoll, S.B. ve Tuan, R.S., (1995). "Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1", *Differentiation*, 59: 25-34.

- [120] Maenpaa, K. Ella, V. Mauno, J. Kellomaki, M. Suuronen, R. Ylikomi, T. ve Miettinen, S., (2010). "Use of adipose stem cells and polylactide discs for tissue engineering of the temporomandibular joint disc", *J R Soc Interface*, 7: 177-188.
- [121] Haimi, S. Suuriniemi, N. Haaparanta, A.M. Ella, V. Lindroos, B. Huhtala, H. Raty, S. Kuokkanen, H. Sandor, G.K. Kellomaki, M. Miettinen, S. ve Suuronen, R., (2009). "Growth and osteogenic differentiation of adipose stem cells on PLA/bioactive glass and PLA/beta-TCP scaffolds", *Tissue Eng Part A*, 15: 1473-1480.
- [122] Dominici, M. Le Blanc, K. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, I. Marini, F. Krause, D. Deans, R. Keating, A. Prockop, D. ve Horwitz, E., (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement", *Cytotherapy*, 8: 315-317.
- [123] Lv, F.J. Tuan, R.S. Cheung, K.M. ve Leung, V.Y., (2014). "Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells", *Stem Cells*, 32: 1408-1419.
- [124] Abdallah, B.M. ve Kassem, M., (2008). "Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications", *Gene Ther*, 15: 109-116.
- [125] Wilson, A. Butler, P.E. ve Seifalian, A.M., (2011). "Adipose-derived stem cells for clinical applications: a review", *Cell Prolif*, 44: 86-98.
- [126] Sterodimas, A. Huanquipaco, J.C. de Souza Filho, S. Bornia, F.A. ve Pitanguy, I., (2009). "Autologous fat transplantation for the treatment of Parry-Romberg syndrome", *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 62: e424-426.
- [127] Pinsolle, V. Chichery, A. Grolleau, J.L. ve Chavoin, J.P., (2008). "Autologous fat injection in Poland's syndrome", *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 61: 784-791.
- [128] Phulpin, B. Gangloff, P. Tran, N. Bravetti, P. Merlin, J.L. ve Dolivet, G., (2009). "Rehabilitation of irradiated head and neck tissues by autologous fat transplantation", *Plast Reconstr Surg*, 123: 1187-1197.
- [129] Strem, B.M. ve Hedrick, M.H., (2005). "The growing importance of fat in regenerative medicine", *Trends Biotechnol*, 23: 64-66.
- [130] Vallee, M. Cote, J.F. ve Fradette, J., (2009). "Adipose-tissue engineering: taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells", *Pathol Biol (Paris)*, 57: 309-317.
- [131] Butterwick, K.J. Niotheti, P.K. Hsu, J.W. ve Goldman, M.P., (2007). "Autologous fat transfer: an in-depth look at varying concepts and techniques", *Facial Plast Surg Clin North Am*, 15: 99-111, viii.
- [132] Padoin, A.V. Braga-Silva, J. Martins, P. Rezende, K. Rezende, A.R. Grechi, B. Gehlen, D. ve Machado, D.C., (2008). "Sources of processed lipoaspirate cells: influence of donor site on cell concentration", *Plast Reconstr Surg*, 122: 614-618.
- [133] Rohrich, R.J. Sorokin, E.S. ve Brown, S.A., (2004). "In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site", *Plast Reconstr Surg*, 113: 391-395; discussion 396-397.

- [134] Carpaneda, C.A., (1996). "Study of aspirated adipose tissue", *Aesthetic Plast Surg*, 20: 399-402.
- [135] Horl, H.W. Feller, A.M. ve Biemer, E., (1991). "Technique for liposuction fat reimplantation and long-term volume evaluation by magnetic resonance imaging", *Ann Plast Surg*, 26: 248-258.
- [136] Moore, J.H., Jr. Kolaczynski, J.W. Morales, L.M. Considine, R.V. Pietrzkowski, Z. Noto, P.F. ve Caro, J.F., (1995). "Viability of fat obtained by syringe suction lipectomy: effects of local anesthesia with lidocaine", *Aesthetic Plast Surg*, 19: 335-339.
- [137] Skidmore, R.A. Patterson, J.D. ve Tomsick, R.S., (1996). "Local anesthetics", *Dermatol Surg*, 22: 511-522; quiz 523-514.
- [138] Eriksson, A.S. Sinclair, R. Cassuto, J. ve Thomsen, P., (1992). "Influence of lidocaine on leukocyte function in the surgical wound", *Anesthesiology*, 77: 74-78.
- [139] Lalikos, J.F. Li, Y.Q. Roth, T.P. Doyle, J.W. Matory, W.E. ve Lawrence, W.T., (1997). "Biochemical assessment of cellular damage after adipocyte harvest", *J Surg Res*, 70: 95-100.
- [140] Smith, P. Adams, W.P., Jr. Lipschitz, A.H. Chau, B. Sorokin, E. Rohrich, R.J. ve Brown, S.A., (2006). "Autologous human fat grafting: effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival", *Plast Reconstr Surg*, 117: 1836-1844.
- [141] von Heimburg, D. Hemmrich, K. Haydarlioglu, S. Staiger, H. ve Pallua, N., (2004). "Comparison of viable cell yield from excised versus aspirated adipose tissue", *Cells Tissues Organs*, 178: 87-92.
- [142] Pu, L.L. Coleman, S.R. Cui, X. Ferguson, R.E., Jr. ve Vasconez, H.C., (2008). "Autologous fat grafts harvested and refined by the Coleman technique: a comparative study", *Plast Reconstr Surg*, 122: 932-937.
- [143] Ferguson, R.E. Cui, X. Fink, B.F. Vasconez, H.C. ve Pu, L.L., (2008). "The viability of autologous fat grafts harvested with the LipiVage system: a comparative study", *Ann Plast Surg*, 60: 594-597.
- [144] Piasecki, J.H. Gutowski, K.A. Lahvis, G.P. ve Moreno, K.I., (2007). "An experimental model for improving fat graft viability and purity", *Plast Reconstr Surg*, 119: 1571-1583.
- [145] Park, H. Williams, R. Goldman, N. Choe, H. Kobler, J. Lopez-Guerra, G. Heaton, J.T. Langer, R. ve Zeitels, S.M., (2008). "Comparison of effects of 2 harvesting methods on fat autograft", *Laryngoscope*, 118: 1493-1499.
- [146] Crawford, J.L. Hubbard, B.A. Colbert, S.H. ve Puckett, C.L., (2010). "Fine tuning lipoaspirate viability for fat grafting", *Plast Reconstr Surg*, 126: 1342-1348.
- [147] Nguyen, A. Pasyk, K.A. Bouvier, T.N. Hassett, C.A. ve Argenta, L.C., (1990). "Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and

transplanted by different techniques", *Plast Reconstr Surg*, 85: 378-386; discussion 387-379.

- [148] Indumathi, S. Mishra, R. Harikrishnan, R. Rajkumar, J.S. Kantawala, N. ve Dhanasekaran, M., (2014). "Lineage depletion of stromal vascular fractions isolated from human adipose tissue: a novel approach towards cell enrichment technology", *Cytotechnology*, 66: 219-228.
- [149] Griesche, N. Luttmann, W. Luttmann, A. Stammermann, T. Geiger, H. ve Baer, P.C., (2010). "A simple modification of the separation method reduces heterogeneity of adipose-derived stem cells", *Cells Tissues Organs*, 192: 106-115.
- [150] Allahverdiyev, A.M. Bagirova, M. Uzun, S. Alabaz, D. Aksaray, N. Kocabas, E. ve Koksai, F., (2005). "The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood", *Am J Trop Med Hyg*, 73: 276-280.
- [151] Yoshimura, K. Asano, Y. Aoi, N. Kurita, M. Oshima, Y. Sato, K. Inoue, K. Suga, H. Eto, H. Kato, H. ve Harii, K., (2010). "Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications", *Breast J*, 16: 169-175.
- [152] Mazur, P. Leibo, S.P. ve Chu, E.H., (1972). "A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells", *Exp Cell Res*, 71: 345-355.
- [153] Thirumala, S. Zvonic, S. Floyd, E. Gimble, J.M. ve Devireddy, R.V., (2005). "Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells", *Biotechnol Prog*, 21: 1511-1524.
- [154] Freimark, D. Sehl, C. Weber, C. Hudel, K. Czermak, P. Hofmann, N. Spindler, R. ve Glasmacher, B., (2011). "Systematic parameter optimization of a Me(2)SO- and serum-free cryopreservation protocol for human mesenchymal stem cells", *Cryobiology*, 63: 67-75.
- [155] Benekli, M. Anderson, B. Wentling, D. Bernstein, S. Czuczman, M. ve McCarthy, P., (2000). "Severe respiratory depression after dimethylsulphoxide-containing autologous stem cell infusion in a patient with AL amyloidosis", *Bone Marrow Transplant*, 25: 1299-1301.
- [156] Higman, M.A. Port, J.D. Beauchamp, N.J., Jr. ve Chen, A.R., (2000). "Reversible leukoencephalopathy associated with re-infusion of DMSO preserved stem cells", *Bone Marrow Transplant*, 26: 797-800.
- [157] Zambelli, A. Poggi, G. Da Prada, G. Pedrazzoli, P. Cuomo, A. Miotti, D. Perotti, C. Preti, P. ve Robustelli della Cuna, G., (1998). "Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion", *Anticancer Res*, 18: 4705-4708.
- [158] Windrum, P. ve Morris, T.C., (2003). "Severe neurotoxicity because of dimethyl sulphoxide following peripheral blood stem cell transplantation", *Bone Marrow Transplant*, 31: 315.

- [159] Edgar, D.H. ve Gook, D.A., (2007). "How should the clinical efficiency of oocyte cryopreservation be measured?", *Reprod Biomed Online*, 14: 430-435.
- [160] Lawson, A. Ahmad, H. ve Sambanis, A., (2011). "Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions", *Cryobiology*, 62: 115-122.
- [161] Wang, X. Hua, T.C. Sun, D.W. Liu, B. Yang, G. ve Cao, Y., (2007). "Cryopreservation of tissue-engineered dermal replacement in Me2SO: Toxicity study and effects of concentration and cooling rates on cell viability", *Cryobiology*, 55: 60-65.
- [162] Aye, M. Di Giorgio, C. De Mo, M. Botta, A. Perrin, J. ve Courbiere, B., (2010). "Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol", *Food Chem Toxicol*, 48: 1905-1912.
- [163] Ozsoy, Z. Kul, Z. ve Bilir, A., (2006). "The role of cannula diameter in improved adipocyte viability: a quantitative analysis", *Aesthet Surg J*, 26: 287-289.
- [164] Suga, H. Matsumoto, D. Inoue, K. Shigeura, T. Eto, H. Aoi, N. Kato, H. Abe, H. ve Yoshimura, K., (2008). "Numerical measurement of viable and nonviable adipocytes and other cellular components in aspirated fat tissue", *Plast Reconstr Surg*, 122: 103-114.
- [165] Xie, Y. Zheng, D. Li, Q. Chen, Y. Lei, H. ve Pu, L.L., (2010). "The effect of centrifugation on viability of fat grafts: an evaluation with the glucose transport test", *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 63: 482-487.
- [166] Kocaoemer, A. Kern, S. Kluter, H. ve Bieback, K., (2007). "Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue", *Stem Cells*, 25: 1270-1278.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Necati FINDIKLI
Doğum Tarihi ve Yeri : 15.08.1973 , Silivri, İstanbul
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : necatif@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Mol.Biyo & Genetik	Bilkent Üniversitesi	1998
Lisans	Mol.Biyo & Genetik	Boğaziçi Üniversitesi	1996
Lise		Silivri Lisesi	1990

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2012-Halen	Bahçeci Sağlık Grubu	IVF Laboratuvarları Direktörü
2008-2012	Medicana Bahçelievler Hastanesi IVF Merkezi	IVF Laboratuvarı Direktörü
2006-2008	International Hospital IVF Merkezi	IVF Laboratuvarı Direktörü

2003-2006	Memorial Hastanesi IVF & Genetik Merkezi	ArGe Laboratuvarı Direktörü
2000-2003	Memorial Hastanesi IVF & Genetik Merkezi	Moleküler Biyolog Embriyolog
1998-1999	Institute of Cancer Research	Araştırm Görevlisi

YAYINLARI

1. Serdarogullari, M. Findikli, N. Goktas, C. Sahin, O. Ulug, U. Yagmur, E. ve Bahceci, M., (2014). "Comparison of gender-specific human embryo development characteristics by time-lapse technology", Reprod Biomed Online, 29: 193-199.
2. Bakircioglu, M.E. Tulay, P. Findikli, N. Erzik, B. Gultomruk, M. ve Bahceci, M., (2014). "Successful testicular sperm recovery and IVF treatment in a man with Leydig cell hypoplasia", J Assist Reprod Genet, 31: 817-821.
3. Findikli, N. ve Oral, E., (2014). "Time-lapse embryo imaging technology: does it improve the clinical results?", Curr Opin Obstet Gynecol, 26: 138-144.
4. Allahverdiyev, A.M. Baydar, S.Y. Bagirova, M. ve Findikli, N., (2012). "Microcapillary culture method: a novel tool for in vitro expansion of stem cells from scarce sources", Arch Med Res, 43: 423-430.
5. Allahverdiyev, A.M. Bagirova, M. Elcicek, S. Koc, R.C. Baydar, S.Y. Findikli, N. ve Oztel, O.N., (2011). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a new host cell in latent leishmaniasis", Am J Trop Med Hyg, 85: 535-539.
6. Tiryaki, T. Findikli, N. ve Tiryaki, D., (2011). "Staged stem cell-enriched tissue (SET) injections for soft tissue augmentation in hostile recipient areas: a preliminary report", Aesthetic Plast Surg, 35: 965-971.
7. Findikli, N. Candan, N.Z. ve Kahraman, S., (2006). "Human embryonic stem cell culture: current limitations and novel strategies", Reprod Biomed Online, 13: 581-590.
8. Findikli, N. Kahraman, S. Saglam, Y. Beyazyurek, C. Sertyel, S. Karlikaya, G. Karagozoglu, H. ve Aygun, B., (2006). "Embryo aneuploidy screening for repeated implantation failure and unexplained recurrent miscarriage", Reprod Biomed Online, 13: 38-46.
9. Kahraman, S. Findikli, N. Biricik, A. Oncu, N. Ogur, C. Sertyel, S. Karlikaya, G. Karagozoglu, H. ve Saglam, Y., (2006). "Preliminary FISH studies on spermatozoa and embryos in patients with variable degrees of teratozoospermia and a history of poor prognosis", Reprod Biomed Online, 12: 752-761.
10. Kahraman, S. ve Findikli, N., (2005). "Effect of Italian referendum on global IVF: a comment from Turkey", Reprod Biomed Online, 11: 662-663.

11. Findikli, N. Kahraman, S. Akcin, O. Sertyel, S. ve Candan, Z., (2005). "Establishment and characterization of new human embryonic stem cell lines", *Reprod Biomed Online*, 10: 617-627.
12. Kahraman, S. Karlikaya, G. Sertyel, S. Karadayi, H. ve Findikli, N., (2004). "Clinical aspects of preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders combined with HLA typing", *Reprod Biomed Online*, 9: 529-532.
13. Kahraman, S. Sertyel, S. Findikli, N. Kumtepe, Y. Oncu, N. Melil, S. Unal, S. Yelke, H. ve Vanderzwalmen, P., (2004). "Effect of PGD on implantation and ongoing pregnancy rates in cases with predominantly macrocephalic spermatozoa", *Reprod Biomed Online*, 9: 79-85.
14. Kahraman, S. Benkhalifa, M. Donmez, E. Biricik, A. Sertyel, S. Findikli, N. ve Berkil, H., (2004). "The results of aneuploidy screening in 276 couples undergoing assisted reproductive techniques", *Prenat Diagn*, 24: 307-311.
15. Findikli, N. Kahraman, S. Kumtepe, Y. Donmez, E. Benkhalifa, M. Biricik, A. Sertyel, S. Berkil, H. ve Oncu, N., (2004). "Assessment of DNA fragmentation and aneuploidy on poor quality human embryos", *Reprod Biomed Online*, 8: 196-206.
16. Findikli, N. Kahraman, S. Kumtepe, Y. Donmez, E. Biricik, A. Sertyel, S. Berkil, H. ve Melil, S., (2003). "Embryo development characteristics in Robertsonian and reciprocal translocations: a comparison of results with non-translocation cases", *Reprod Biomed Online*, 7: 563-571.
17. Kahraman, S. Findikli, N. Berkil, H. Bakircioglu, E. Donmez, E. Sertyel, S. ve Biricik, A., (2003). "Results of preimplantation genetic diagnosis in patients with Klinefelter's syndrome", *Reprod Biomed Online*, 7: 346-352.
18. Kahraman, S. Kumtepe, Y. Sertyel, S. Donmez, E. Benkhalifa, M. Findikli, N. ve Vanderzwalmen, P., (2002). "Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility", *Hum Reprod*, 17: 3193-3200.
19. Sayan, A.E. Sayan, B.S. Findikli, N. ve Ozturk, M., (2001). "Acquired expression of transcriptionally active p73 in hepatocellular carcinoma cells", *Oncogene*, 20: 5111-5117.

Bildiri

1. Findikli, N., (2014). The era of personalized IVF treatment: From embryology and genetics perspective. 15th National Congress of BASRH, March 6-9 2014, Borovetz, Bulgaria.
2. Findikli, N., (2013). PGS Technology in ART from Laboratory and Clinical Perspective: Past and Present. Istanbul Symposium Genomics in Reproductive Medicine. November 16, 2013, Istanbul.
3. Findikli, N., (2011). Biotechnology in Assisted Human Reproduction: Current Status and Future prospects. European Biotechnology Congress, September 28-October 1, 2011, Istanbul.

4. Findikli, N., (2011). Derivation of Gamete Cells from Stem Cells. 87th National SIGO Conference, September 25-28, 2011, Palermo.
5. Findikli, N., (2011). Cryopreservation: Fundamental Principles. TARTEN Conference, April 14-17, 2011, Istanbul.
6. Findikli, N., (2010). Developments in Embryo Micromanipulation. ACE Annual Conference January 4-5, 2010, Bristol
7. Findikli, N., (2009). The role of PGD in recurrent abortus. 2nd Congress of Turkish Reproductive Medicine Society, October 1-4, 2009, Antalya.
8. Findikli, N., (2009). The therapeutic use of stem cells and hopes for the future. 2nd Congress of Turkish Reproductive Medicine Society, October 1-4, 2009, Antalya.
9. Findikli, N., (2009). Novel Technologies in ART Laboratories: Facts or Artifacts? 15th World congress on IVF, April 22-25, 2009, Geneva.
10. Findikli, N., (2008). Is PGD an appropriate embryo selection tool for Aneuploidy Screening? 1st Congress of Turkish Reproductive Medicine Society, April 17-20, 2008, Antalya.
11. Findikli, N., (2007). The promises of stem cells in reproductive medicine. 2nd Yazd International Student Award in Reproductive Medicine, May 11-13, 2007, Yazd.
12. Findikli, N., (2007). Stem cells in Reproductive medicine. Jordanian Society of Fertility and Genetics, April 4-6, 2007, Amman.
13. Findikli, N., (2006). Stem Cells: From Bench to Bedside. 1st International Workshop on Current Approaches and Future Trends on Gamete and Embryo Manipulation, March 4-5, 2006, Istanbul.

Kitap

1. Findikli N., Sönmez, A.S. ve Allahverdiyev, A., (2013) In Vitro Fertilizasyon. "Kök Hücre Biyolojisi" Çeviri Editörü: Prof.Dr. Tülay İrez. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
2. Findikli, N., (2012) Adult and Embryonic Stem Cells. "Human Embryonic Stem Cells from Laboratory and Clinical Perspectives" Editor: Dr. Kursad Turksen,. Humana Press Inc., New York.
3. Findikli, N. ve Sönmez, A.S., (2011) Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. "Embryo Kokültürü" Editör: Prof. Dr. Önder Çelik, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
4. N Findikli ve Mohan Vemuri., (2010) Emerging Technology Platforms for Stem Cells. "Derivation methods for human embryonic stem cells: Past, present & future" Editors: Uma Lakshmipathy, Jonathan D. Chesnut, Bhaskar Thyagarajan. Wiley Publications Ltd., Hoboken.

5. S Kahraman ve N Findikli., (2005) Birth Defects: New Research. "Preimplantation Genetic Diagnosis: Current Challenges and Future Prospects" Editor: Janet V. Engels. Nova Science Publishers, Inc., New York.
6. S Kahraman, N Findikli ve E Enginsu., (2005) Infertility, ART&Endoscopy – Lessons Learnt & Future Challenges. "Current approaches on the diagnosis and treatment of male infertility". Gautam Allahbadia, Hugo Verhoeven, Rudi De Wilde. Jaypee Medical Publishers (Pvt) Ltd, New Delhi.
7. S Kahraman, Y Sağlam, N Findikli., (Reprodüktif Endokrinoloji ve İnertilite. "Preimplantasyon Genetik Tanı". Editör: Umur Çolgar. İstanbul Medikal Yayıncılık. İstanbul.