T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

KLİNİK UYGULAMAYA YÖNELİK ÜRETİM SERİSİNİN FARKLI BASAMAKLARINDAN ELDE EDİLEN KLİNİK KALİTEDEKİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE SON ÜRÜNLERİNİN KARAKTERİZASYON ANALİZİ

İREM YILMAZ BAŞARAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. AYLA EKER SARIBOYACI

Eskişehir

2024

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

KLİNİK UYGULAMAYA YÖNELİK ÜRETİM SERİSİNİN FARKLI BASAMAKLARINDAN ELDE EDİLEN KLİNİK KALİTEDEKİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE SON ÜRÜNLERİNİN KARAKTERİZASYON ANALİZİ

İREM YILMAZ BAŞARAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. AYLA EKER SARIBOYACI

Eskişehir

2024

Proje No: TÜSEB 2022-ACİL-01/A–11904

BAP TDK-2022-2385

TÜBİTAK 1004 20AG031

ÖZET

Başlık: Klinik uygulamaya yönelik üretim serisinin farklı basamaklarından elde edilen klinik kalitedeki mezenkimal kök hücre son ürünlerinin karakterizasyon analizi

Amaç: Bu tez çalışmasında; çeşitli hastalıkların tedavisinde insan üzerinde kullanılmak üzere İyi İmalat Uygulamaları koşullarında üretilen umblikal kordun Wharton Jeli dokusundan izole edilmiş "Mezenkimal Kök Hücre (WJ-MKH) serilerinin farklı basamaklarından elde edilen kök hücre son ürünlerinin (deney ve kontrol grupları)" kök hücrelere özgü karakteristik özellikleri açısından immunofenotipik, genotipik, fonksiyonel, moleküler yöntemler ile analiz edilmesi ve sonuçların birbiri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: WJ-MKH'ler izole edilerek pasaj 3'e getirilmiş, dondurularak saklanmıştır. Dondurularak saklanan hücreler çözülerek 4 gruba ayrılmıştır. Son ürünlerde morfolojik analizler, hücre sayısı ve canlılık, immunfenotipleme, tümörojenite, gen ekspresyonu analizi, potensi analizi, apoptoz ölçümü, hücre döngüsü analizi, CFSE ile canlılık ve proliferasyon analizi, büyüme faktörü analizi ve *in vitro* yara iyileşmesi deneyleri yapılmıştır.

Bulgular: Hücreler başarıyla son ürün haline getirilmiştir. Genotipik, fonksiyonel ve moleküler açıdan farklılıklar görülürken, morfolojik, immunfenotipik, immunosupresif açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Sonuç: Klinik uygulamalarda WJ-MKH'lerin dondurulup çözülmesinin etkileri olabileceği, son ürün haline getirilmeden bir süre önce kültüre edilerek kendine gelme süresinin tanınmasının daha verimli sonuçlar verebileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, iyi imalat uygulamaları, GMP, ileri tıbbi tedavi ürünü, hücresel tedavi, klinik kullanım, son ürün

ABSTRACT

Title: Detailed analysis of mesenchymal stem cell final product profiles ready to use for clinical application

Objective: In this thesis study, it was aimed to analyze in detail the phenotypic, genotypic, functional, molecular, and immunosuppressive characteristics of the final products obtained from different stages of the umbilical cord Wharton's Jelly-derived Mesenchymal Stem Cell (WJ-MSC) series produced under Good Manufacturing Practice (GMP) conditions, and to compare the results with each other.

Methods: WJ-MSCs were isolated and expanded to passage 3, then cryopreserved. The cryopreserved cells were thawed and divided into 4 groups. On the final products, morphological analyses, cell count and viability, immunophenotyping, tumorigenicity, gene expression analysis, potency analysis, apoptosis assay, cell cycle analysis, CFSE viability and proliferation analysis, growth factor analysis, and *in vitro* wound healing assays were performed.

Findings: The cells were successfully brought to the final product stage. While differences were observed in terms of genotypic, functional, and molecular aspects, no significant difference was found in terms of morphological, immunophenotypic, and immunosuppressive aspects.

Conclusion: It was determined that the cryopreservation and thawing of WJ-MSCs may have effects in clinical applications, and allowing a recovery period by culturing the cells before reaching the final product stage may yield more efficient results.

Keywords: Mesenchymal stem cell, good manufacturing practices, GMP, advanced therapy medicinal product, ATMP, cellular therapy, clinical use, final product

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL ONAYI .....
ETİK BEYAN .....
TEŞEKKÜR .....
ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
SİMGE VE KISALTMALAR ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **x**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **xiv**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **8**
2.1. Kök Hücreler ve Özellikleri 8
2.2. Mezenkimal Kök Hücreler ve Özellikleri 10
2.3. Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücreleri 14
2.3.1. WJ-MKH'lerin izolasyonu 16
2.3.2. WJ-MKH'lerin immunfenotipik ve genomik özellikleri 16
2.3.3. WJ-MKH'lerin immunomodülatör özellikleri 17
2.4. Apoptoz 19
2.4.1. Apoptozda görev alan moleküller ve moleküler düzenleyiciler 20
2.4.1.1. Kaspazlar 20
2.4.1.2. p53 20
2.4.1.3. Bcl-2 Ailesi 21
2.4.2. Apoptoz mekanizmaları 21
2.4.2.1. İntirinsik (Mitokondriyal aracılı/iç) yolak 21
2.4.2.2. Ekstrinsik (Reseptör aracılı/Dış) yolak 22
2.4.2.3. Perforin/Granzim yolağı 24
2.4.3. Apoptoz tayin yöntemleri 24
2.5. Hücre Döngüsü 28
2.5.1. G1/S 29
2.5.2. G2/M 29
2.5.3. Hücre döngüsü analiz yöntemleri 30
2.6. MKH'lerin Klinik Kullanımları 30
2.6.1. İİU koşullarında steril üretim genel gereklilikleri 31

2.6.2. MKH'lerin İİU şartlarında üretilmesi ve işlenmesi 33
2.6.3. Kalite kontrol testleri 35
2.6.4. Klinik araştırma ve klinik deneme uygulamalarında MKH'ler 38
3. GEREÇ ve YÖNTEM 40
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması 41
3.1.1. İİU koşulları altında insan Wharton jeli kökenli mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve kültürü 41
3.1.2. Hücrelerin dondurularak saklanması ve çözdürülmesi 43
3.2. Hücreler Üzerinde Yapılan Analizler 44
3.2.1. Morfolojik analizler 44
3.2.2. Akım sitometri ile immunfenotipleme 44
3.2.3. Gen ekspresyon analizi 46
3.2.4. Tümörojenite analizi (Telomeraz enzim aktivitesi) 47
3.2.4.1. Çalışma solüsyonlarının hazırlanması 48
3.2.4.2. Hücrelerden protein ekstraktının hazırlanması 48
3.2.4.3. TRAP (PCR) 49
3.2.4.4. Elisa aşaması 50
3.2.4.5. Hesaplama ve değerlendirme 51
3.2.5. Potansi analizi (Parakrin sekresyonu) 52
3.2.6. Apoptoz analizi 53
3.2.7. Hücre döngüsü analizi 54
3.2.8. CFSE ile canlılık ve proliferasyon analizi 55
3.2.9. Popülasyon ikiye katlama analizi 55
3.2.10. Büyüme faktörü analizi 56
3.2.11. *In vitro* yara iyileşmesi deneyi 56
3.2.12. Mikoplazma analizi 57
3.2.13. Mikrobiyolojik kontrol 58
3.2.14. Endotoksin analizi 58
3.3. İstatistiksel Analizler 59
4. BULGULAR 60
4.1. İTTÜ Olarak MKH Ürünlerinin İzolasyonu ve Kültürü 60
4.1.1. Üretim ortamında partikül kontrolleri 64
4.2. Hücreler Üzerindeki Analizler 64

4.2.1. WJ-MKH'lerin akım sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu 64
4.2.2. Tümörojenite analizi (Telomeraz enzim aktivitesi) 69
4.2.3. Gen ekspresyon analizi 70
4.2.4. Potansi analizi (Parakrin sekresyonu) 72
4.2.5. Apoptoz analizi 73
4.2.6. Hücre döngüsü analizi 74
4.2.7. CFSE ile canlılık ve proliferasyon analizi 76
4.2.8. Büyüme faktörü analizi 77
4.2.9. *İn vitro* yara iyileşmesi analizi 78
4.2.10. Mikoplazma, sterilite ve endotoksin analizleri 84
5. TARTIŞMA 86
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 102
7. KAYNAKLAR DİZİNİ 104
8. EKLER DİZİNİ 130
EK-1. Etik Kurul Kararı
EK-2. İntihal Raporu
9. ÖZGEÇMİŞ 140
10. YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI 149

SİMGE VE KISALTMALAR

ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
Angpt-1	:	Angiopoietin-1
ARDS	:	Akut solunum sıkıntısı sendromu (Acute respiratory distress syndrome)
BSA	:	Sığır serum albümini (Bovine serum albumin)
CFSE	:	5-(ve -6)-karboksifluorescein diasetat süksinimidil ester (Carboxyfluorescein succinimidyl ester)
cm^3	:	Santimetre küp
dk	:	Dakika
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DNA	:	Deoksiriboz Nükleik Asit
EDTA	:	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGF	:	Epidermal büyüme faktörü
EMA	:	Avrupa İlaç Ajansı
FDA	:	Gıda ve İlaç İdaresi
FGF	:	Fibroblast büyüme faktörü
FN	:	Fibronektin
GVHD	:	Greft Versus Host Hastalığı
HGF	:	Hepatosit büyüme faktörü (hepatocyte growth factor)
HLA-I	:	İnsan lökosit antijeni sınıf 1

HLA-II	:	İnsan lökosit antijeni sınıf 2
IDO	:	indoleamin 2,3-dioksijenaz
IGF	:	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL	:	İnterlökin
IM	:	İntramuskuler
INF ɣ	:	İnterferon-gama
ISCT	:	Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society of Cellular Therapy)
IT	:	İntratekal
IV	:	İntravenöz
İİU	:	İyi İmalat Uygulamaları (Current Good Manufacturing Practices; GMP)
İTTÜ	:	İleri Tedavi Tıbbi Ürünü (Advanced Therapy Medicinal Products: ATMP)
Kİ-MKH	:	Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre
LAF	:	Laminar Hava Akımı (Laminar Air Flow)
MHC	:	Majör histo-uyumluluk kompleksi
MKH	:	Mezenkimal Kök Hücre
ml veya mL	:	Mililitre
mm	:	milimetre
ng	:	Nanogram

NK	:	Doğal öldürücü hücre (Natural killer cell)
nm	:	Nanometre
P	:	Pasaj
PBS	:	Fosfat Tamponu
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	:	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (Platelet-derived growth factor)
PDT	:	Populasyon İki Katına Çıkma Süresi (Population Doubling Time)
PEDF	:	Pigment epitelinden türetilen faktör (Pigment epithelium-derived factor)
PGE2	:	Prostaglandin E2
PI	:	Propidyum İyodür
RNA	:	Ribonükleik asit
RTA	:	Rölatif telomeraz aktivitesi
RT-PCR	:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real-time Polymerase Chain Reaction)
SF	:	Serum fizyolojik
sn	:	Saniye
TGF- β	:	Dönüştürücü büyüme faktörü-beta
TİTCK	:	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
TNF-α	:	Tümör nekroz faktörü-alfa

U	:	Ünite
VEGF	:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WJ	:	Wharton Jeli
WJ-MKH	:	Wharton Jeli Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
µg	:	Mikrogram
µL	:	Mikrolitre
µm	:	Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Kök hücrelerde simetrik ve asimetrik bölünme (Chen vd., 2015)..... 8

Şekil 2. 2. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerine göre sınıflandırılması 10

Şekil 2. 3. İnsan göbek kordonunun kesit diyagramı (Kim vd., 2013)..... 15

Şekil 2. 4. MKH aracılı immünomodülasyonun bağışıklık hücreleri üzerindeki etkisi (Huang vd., 2022). 18

Şekil 2. 5. Apoptozda intirinsik ve ekstirinsik yolaklarının moleküler aktivasyon mekanizmasının temsili çizimi (Wani vd., 2023). 23

Şekil 2. 6. Hücre döngüsü ve siklin ekspresyonlarının şematik gösterimi 28

Şekil 2. 7. Üretim döngüsü boyunca yapılan kalite kontrol testleri..... 36

Şekil 3. 1. Deney gruplarının şematik gösterimi 41

Şekil 3. 2. Elisa aşaması için örnek tüplerinin hazırlanması 50

Şekil 3. 3. Standart çalışma çözeltisinin hazırlanmasına ilişkin şematik gösterim (Elabscience Kullanım Kılavuzundan alınmıştır) 53

Şekil 4. 1. WJ-MKH'lerin morfolojik görüntüsü **A:** Eksplant izolasyonun yapıldığı gün (0. Gün), **B:** İzolasyondan sonra 72. saatte hücrelerin dokulardan çıkışı, **C:** İzolasyondan sonraki 11. günde hücrelerin %80 konfluensiye ulaşması ve dokuların ortamdan uzaklaştırılması, **D:** 11. günde hücrelerin morfolojik görüntüsü (ölçü çubuğu = 100 µm). 60

Şekil 4. 2. P1, P2 ve P3'te WJ-MKH'lerin morfolojik görüntüsü **A:** P1 2. günde hücrelerin morfolojik görüntüsü, **B:** P2 2. günde hücrelerin morfolojik görüntüsü, **C:** P3 3. günde hücrelerin morfolojik görüntüsü, **D:** P3 4. günde hücrelerin morfolojik görüntüsü, (ölçü çubuğu = 100 µm). 61

Şekil 4. 3. P3'te dondurularak saklandıktan 1 ay sonra çözdürülerek kültüre edilerek P4'e getirilen WJ-MKH'lerin morfolojik görüntüsü **A:** P4 3. günde hücrelerin morfolojik görüntüsü, **B:** P4 4. günde hücrelerin morfolojik görüntüsü, (ölçü çubuğu = 100 µm). 62

Şekil 4. 4. Grup 1 ve Grup 2 hücrelerine ait popülasyon iki katına çıkma sürelerine ilişkin grafik (p> 0,05). 63

Şekil 4. 5. P3'e getirilen hücrelerin akım sitometri ile immunfenotipik karakterizasyonuna ilişkin analiz sonuçları 65

Şekil 4. 6. Grup 2 son ürünlerinin akım sitometri ile immunfenotipik karakterizasyonuna ilişkin analiz sonuçları 66

Şekil 4. 7. Grup 3 son ürünlerinin akım sitometri ile immunfenotipik karakterizasyonuna ilişkin analiz sonuçları 67

Şekil 4. 8. Grup 4 son ürünlerinin akım sitometri ile immunfenotipik karakterizasyonuna ilişkin analiz sonuçları 68

Şekil 4. 9. Son ürünlerde gözlenen RTA değerlerine ilişkin grafik. Grup 1'in RTA değeri %100 olarak kabul edildiğinde; Grup 2'nin 85,43; Grup 3'ün 39,89; Grup 4'ün ise 11,13 olarak hesaplanmıştır (*p<0,05)..... 70

Şekil 4. 10. Son ürünlere ait rölatif gen ifadelerinin karşılaştırmalı grafiği (*p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001; ****p <0,0001). 72

Şekil 4. 11. Son ürün haline getirilen hücrelerin IFN-ɣ varlığı ve yokluğunda kültüre edildikten sonra besiyerine salgıladıkları parakrin faktörlerin salgılarına ait grafik. **A:** IDO salınımı en yüksek Grup 2 ve Grup 3'te en düşük ise Grup 4'te görüldü. **B:** PGE2 salınımı tüm gruplarda aynı tespit edildi. **C:** TGF-β salınımı Grup 4'te diğer gruplara göre nispeten daha az olarak tespit edildi. **D:** HGF salınımı Grup 4'te en az olup en yüksek sekresyon kontrol grubunda saptanmıştır. (*p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001)..... 73

Şekil 4. 12. Son ürün haline getirildikten 48 saat sonra gerçekleşen apoptoz analizi sonuçlarına göre grupların karşılaştırılması grafiği.. 74

Şekil 4. 13. Son ürünlerin akım sitometride hücre döngüsüne ait DNA histogramları. 75

Şekil 4. 14. Hücre döngüsünün G1, S ve G2/M aşamalarındaki hücrelerin yüzdelerini karşılaştırmalı olarak gösteren grafik..... 76

Şekil 4. 15. Son ürün haline getirmek için hazırlanan hücrelerin 4 gün boyunca CFSE ışımalarının ölçümüne ait grafik 77

Şekil 4. 16. Son ürün haline getirilen hücrelerin 4 gün boyunca kültüre edildikten sonra besiyerine salgıladıkları büyüme faktörlerin salgılarına ait grafik. **A:** VEGF salınımı en yüksek Grup 4'te saptanırken, diğer gruplarda benzer düzeyde sekresyon tespit edildi. **B:** FGF2 salınımı Grup 4'te diğer gruplara göre daha az olarak saptandı. **C:** TGF-β salınımı Grup 4'te diğer gruplara göre daha az olarak saptandı. **D:** Angpt-1 salınımı tüm gruplarda benzer şekilde saptandı. **E:** PEDF salınımı Grup 2 ve Grup 3'te en yüksek iken, Grup 4'te en düşük olacak şekilde ölçüldü (*p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001; ****p <0,0001)..... 78

Şekil 4. 17. *İn vitro* yara oluşturulması sonrası Grup 1 hücrelerinin yara alanını kapatmasına ait mikroskop altındaki morfolojik görünümleri. (Orijinal Büyütme: 4X). Hücreler 20. saatte yara alanını tamamen kapamıştır. 79

Şekil 4. 18. *İn vitro* yara oluşturulması sonrası Grup 2 hücrelerinin yara alanını kapatmasına ait mikroskop altındaki morfolojik görünümleri. (Orijinal Büyütme: 4X). Hücreler 38. saatte yara alanını tamamen kapamıştır. 80

Şekil 4. 19. *İn vitro* yara oluşturulması sonrası Grup 3 hücrelerinin yara alanını kapatmasına ait mikroskop altındaki morfolojik görünümleri. (Orijinal Büyütme: 4X). Hücreler 20. saatte yara alanını tamamen kapamıştır. 81

Şekil 4. 20. *İn vitro* yara oluşturulması sonrası Grup 4 hücrelerinin yara alanını kapatmasına ait mikroskop altındaki morfolojik görünümleri. (Orijinal Büyütme: 4X). Hücrelerin 48. saatin sonunda bile yara alanını kapatamadığı görülmüştür..... 82

Şekil 4. 21. *İn vitro* yara iyileşmesi analizi sonucuna göre son ürün haline getirilen hücrelerin saatler içerisinde yara alanını kapatmalarına ilişkin grafik..... 83

Şekil 4. 22. Hücrelerde gerçekleştirilen mikoplazma tayini, sterilite testi ve endotoksin testi sonuçları. Hücreler mikrobiyolojik açıdan serbest bırakma kriterlerini karşılamıştır. Sterilite sonuçları negatif çıkmış, mikoplazma kontaminasyonuna rastlanmamış ve son ürünlerde endotoksin tespit edilmemiştir. 85

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2. 1. Apoptoz tayin yöntemleri (Güleş & Eren, 2008) 24

Tablo 2. 2. Temiz oda sınıflarında kabul edilen maksimum hava kaynaklı partikül konsantrasyonları (Sağlık Bakanlığı TİTCK Beşeri Tıbbi Ürünler İİU Kılavuzu'ndan alınmıştır). 32

Tablo 2. 3. Temiz odaların işlem sırasında mikrobiyolojik kontaminasyon için önerilen sınırları (Sağlık Bakanlığı TİTCK Beşeri Tıbbi Ürünler İİU Kılavuzu'ndan alınmıştır). 33

Tablo 2. 4. Bu çalışmada temel alınan son ürünler için serbest bırakma spesifikasyonları 37

Tablo 3. 1. Elde edilen hücrelerde akım sitometri yöntemi ile bakılan yüzey belirteçleri ve spesifikasyon limitleri (Dominici vd., 2006). 45

Tablo 3. 2. RT- PCR analizinde kullanılan genler 47

Tablo 3. 3. Çalışma solüsyonlarının hazırlanması 48

Tablo 3. 4. TRAP analizi için örnek ve kontrollerin hazırlanışı 49

Tablo 3. 5. Telomeraz enzim aktivitesi için PCR amplifikasyon programı 50

Tablo 3. 6. Telomeraz enzim aktivitesi sonuçlarının değerlendirilmesi 51

Tablo 3. 7. Annexin V-PI boyama sonuçlarının yorumlanması 54

Tablo 3. 8. PCR karışımlarının hazırlanması 57

Tablo 3. 9. Mikoplazma analizi için PCR amplifikasyon programı 58

Tablo 3. 10. Endotoksin analizi için çözeltilerinin hazırlanması 59

Tablo 4. 1. Akım sitometri ile immunfenotipik karakterizasyonuna ilişkin her bir grubun ortalama sonuçları. 69

Tablo 4. 2. Apoptoz analizi sonuçlarına ilişkin her bir grubun ortalama sonuçları. 74

Tablo 4. 3. Son ürünlerdeki G1, S ve G2/M fazlarındaki değişimlerin gösterimi. 76

Tablo 4. 4. Son ürün haline getirilen hücrelerin göç ve çoğalmasını analiz edebilmek amacıyla 6., 12. ve 24. saatlerdeki yara alanı kapanma oranları. 84

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hastalıklar, travmalar veya yaşa bağlı olarak meydana gelen doku, organ ve hücre hasarlarını iyileştirme veya yenileme potansiyeline sahip rejeneratif tıp uygulamaları son yıllarda modern tıbbın göze çarpan konu başlıklarından biri haline gelmiştir (Jacques & Suuronen, 2020). Rejeneratif tıbbın olası potansiyeli, mevcut tedavi yöntemlerinin yetersiz olduğu durumlarda yeni bir umut kaynağı olarak görüldüğünden, bu alan birçok araştırmacı için heyecan vericidir. Rejeneratif tıp denildiğinde ilk akla gelen hücresel tedaviler ve doku mühendisliği çalışmalarının temel amacı güvenli, etkili ve tutarlı tedavi yöntemleri sunmaktır. İnsan vücudunda oluşan hasarlar, hemen hemen her dokuda bulunan kök hücreler tarafından onarıldığından; translasyonel tıbbın geleceği olarak da günümüzde kök hücreler büyük umut vaat etmektedir (Mason & Dunnill, 2008).

Doku ve organ nakilleri birçok hastalığın tedavisinde ilk akla gelen iyi bir çözüm yolu gibi görünse de donör bulma zorluğu, nakil sonrası immun komplikasyonların oluşması ve nakledilen dokunun reddi gibi sorunlar, süreci ve tedavinin başarısını olumsuz yönde etkilemektedir. Doku nakli sonrası immun komplikasyonlara karşı bağışıklık sistemini baskılamada kullanılan ilaçlar ömür boyu kullanılmakta ve bunlar hastada sistemik hasar yaratmaktadır. Bu nedenle kök hücreler hem immun sistemi düzenleme hem de kaybedilen hücre/dokuyu yerine getirebilme kapasiteleri nedeniyle son dönemlerde oldukça yaygın araştırma ve uygulama alanına sahiptir (Aurora & Olson, 2014). Bilindiği üzere laboratuvar ortamında farklı tipte kök hücreler çok çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedir. İnsanlara uygulanacak hücresel tedavi ürünleri, İyi İmalat Uygulamaları (İİU- GMP: Good Manufacturing Practice) koşullarında üretilerek, ülkelerin Sağlık Bakanlıklarının kontrolünde etik düzenlemeler ve yönetmeliklere uygun şekilde ilgili otoritelerce izin verildiği takdirde klinik deneme ve klinik araştırma kapsamında kullanılmaktadır (National Academy of Sciences 2014; Zakrzewski vd., 2019). Özellikle doğal bağışıklık düzenleme (immunomodulasyon) özelliklerine sahip mezenkimal kök hücrelerin (MKH) klinik kullanımı son zamanlarda oldukça artmıştır (Wang vd., 2018.; Kalaszczynska & Ferdyn, 2015; Contreras, vd., 2016). Doku nakli sonrası gelişen Greft Versus Host Hastalığı (GVHD), MKH'lerin ilk klinik uygulaması olup günümüzde halen bir deneme tedavisi olarak kabul görmektedir (Le Blanc vd., 2004; Ringdén vd., 2006; Zhao vd. 2015). Bunun yanı sıra, son yıllarda tüm Dünya'da etkili olan COVID-19

pandemisinde akut solunum sıkıntısı sendromu (Acute respiratory distress syndrome: ARDS) ve pnömoni gelişen ağır hastalarda ve çoklu organ yetmezliği riski bulunan hastalarda meydana gelen sitokin fırtınasını dindirmeye ve hasarlı dokuları yenilemeye yönelik Türkiye dahil olmak üzere tüm dünyada kullanımları söz konusu olup, klinik araştırmalar devam etmektedir (https://clinicaltrials.gov/) ve etkili sonuçların alındığı raporlar, etki faktörü yüksek dergilerde yayınlanmıştır (Leng vd., 2020; Zhang vd., 2020; Hashermian vd., 2021; Atluri vd., 2020; Rogers vd., 2020; Zayed & Iohara, 2020; Lanzoni vd., 2020; Yilmaz vd., 2020; Gentile & Sterodimas, 2020; Croci vd., 2021; Efimenko vd., 2021; Kaffash vd., 2021; Pawitan, 2022; Fang vd., 2023; Xu vd., 2022; Abu-El-Rub vd., 2021; Li vd., 2023). Bu tedavide amaç;

1) Yoğun bakıma alınan ve tedaviye direnç gösteren hastalara MKH nakli yaparak immun modülasyon sağlamak ve sitokin fırtınasının doku ve organlara verdiği zararı azaltmak,

2) Hastalarda görülen immunsupresyonu düzeltmek ve $CD4^+$ T, $CD8^+$ T hücre düzenlemesi yaparak COVID-19 virüsü ile mücadeleyi arttırmak,

3) MKH'ler aracılığıyla büyüme faktörlerini arttırarak oluşan organ hasarında iyileşmeyi hızlandırmaktır.

MKH'lerin diğer uygulama alanları ise,

-Diyabet gibi otoimmun hastalıklar (Huang vd., 2021; Gomes vd. 2021),

-Spinal kord hasarı, travmatik beyin hasarı, hipoksik ensefalopati, serebral palsi gibi travma ile ilişkili hastalıklar (Kabataş vd., 2020; Kabataş vd., 2021; Kabataş vd., 2021),

-Freidreich ataksisi, Duchenne Musküler Distrofi (DMD), kistik fibrozis, gibi genetik tabanlı hastalıklar (Sun & Karaöz 2020; Dai vd., 2018; Jones vd.2015),

-Pulmoner Fibrozis gibi idiyopatik (nedeni bilinmeyen) hastalıklar (Chuang vd. 2018; van Geffen vd. 2021; Feng vd. 2021; Schiess vd. 2021) veya

-Yaşam tarzı ve çevresel koşullara bağlı gelişen Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) (Hoang vd. 2021; Glassberg vd. 2021) gibi hastalıklar sıralanabilir.

Ülkemizde hücresel tedaviler, Sağlık Bakanlığı tarafından hem Amerika Birleşik Devletleri (ABD) hem Avrupa Birliği otoriteleri tarafında oluşturulmuş etik düzenlemeler ve yönetmeliklerin iyi bir sentezi ile Sağlık Hizmetleri Genel

Müdürlüğü, Organ, Doku, Hücre ve Diyaliz Hizmetleri Daire Başkanlığı'nca "Doku ve hücreler ile ileri tıbbi tedavi ürünleri klinik araştırmaları"na yönelik yayımlanan "2006/51 ve 2018/10 Sayılı Kök Hücre Çalışmaları Hakkında Genelge"ye göre yürütülmekte ve denetlenmektedir. Klinik uygulamaya yönelik üretilen hücresel ürünler, mutlaka Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) tarafından yetkilendirilmiş ve düzenli olarak denetlenen İİU laboratuvarlarında yetkili personellerce üretilmekte, kalite kontrolleri sağlanmakta ve kalite güvence süreçlerine tabi tutulmaktadır. İİU koşullarında üretilen tüm hücresel ürünler, Sağlık Bakanlığı TİTCK tarafından yayımlanmış olan "Beşeri Tıbbi Ürünler İmalathaneleri Yönetmeliği", "İnsan Doku Ve Hücreleri İle Bunlarla İlgili Merkezlerin Kalite Ve Güvenliği Hakkında Yönetmelik" ve "İnsan Doku Ve Hücre Ürünlerinin Ruhsatlandırılması Ve Bu Ürünlerin Üretim, İthalat, İhracat, Depolama ve Dağıtım Faaliyetlerini Yürüten Merkezler Hakkında Tebliğ"e uygun olarak üretilmekte, depolanmakta ve dağıtılmaktadır.

Çeşitli hastalıklar ya da travma kaynaklı hücre, doku ve organ kayıplarının hücre tabanlı rejeneratif tedavisinde kullanılan kök hücre kaynakları arasında erişkin dokulardan izole edilen MKH'ler; teratojenik ve immunojenik olmamaları nedeniyle ön plana çıkmaktadır. MKH kaynağı olarak kemik iliği ve yağ dokusu gibi erişkin doku ya da organlara göre postnatal fetal organlar arasında yer alan umblikal korddan embriyonik döneme daha yakın potensi gösteren MKH'ler izole edilebilmektedir. Umblikal kordun damar yapılarının dışında kalan bağ dokusu, embriyoner bağ dokusu olarak sınıflandırılan ve zengin ekstrasellüler matriksi nedeniyle Wharton Jeli (WJ) olarak adlandırılır (Kalaszczynska & Ferdyn, 2015, Marino vd. 2019). Tam olarak Wharton Jelinden izole edilen bu kök hücrelerin MKH karakterinde olduğu, pluripotent belirteçleri eksprese ettiği ve allojenik kullanıma uygun oldukları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Karaöz vd. 2017; Musial-Wysocka vd. 2019). Özetle hücresel tedaviler kapsamında en çok tercih edilen MKH'ler, göbek kordonu Wharton Jeli kaynaklı MKH (WJ-MKH)'lerdir. Doğum sonrasında tıbbi atık olarak imha edilen göbek kordonu, invaziv bir işlem içermeyen bir kaynak oluşu nedeniyle tercih edilmektedir (Mebarki vd., 2021). MKH'lerin allojenik olarak kullanılabilmesi, tek bir donörden elde edilebilen çok sayıda hücrenin birçok alıcı (hasta) için kullanılabilmesine olanak tanımaktadır.

Klinik protokollerin çoğu, intravenöz (IV) enjeksiyonlar için hastanın kilogramı başına 1-2x10^6 hücrenin uygulanmasını veya subkutan ve endomiyokardiyal enjeksiyonlar için 100-600x10^6 kadar hücrenin uygulanmasını önermektedir. Bu hesaplamalar intramuskuler (IM) ve intratekal (IT) enjeksiyonlar için de geçerlidir (Guadix vd. 2019). Buradan yola çıkarak, tek bir hasta için gerekli tedavi planlaması yapıldığında, tek doz için, yüksek miktarda MKH üretilmesi gerçeği ortaya çıkmaktadır. Günümüzde kullanılan teknikler, MKH'lerin tek seferde üretimini her zaman mümkün kılmamaktadır. Ayrıca üretilen hücreler ancak gerekli kalite kontrol süreçlerinden geçtikten ve iyice karakterize edildikten sonra tedavi amaçlı son ürün haline getirilerek kullanılabilmektedir. Hücrelerin ham dokudan izolasyonundan son ürün haline getirilene kadarki süreçlerinde çoğaltılarak stoklanması ve planlanan tedavi gününe kadar saklanması gerekmektedir. Dondurularak saklanmış hücreler stok haline getirilebilir ve bu şekilde çoklu doz gerektiren hücresel tedaviler için daha uygun koşullar oluşturulur (Jere vd. 2021). Dondurularak saklanan hücresel ürünlerin depolanması, esas olarak hücrelerin donma ve çözülme işlemlerine karşı hassas olması nedeniyle çok kolay değildir. Özellikle çözme işlemlerinin kritik olduğu ve standartlaştırılması zor olduğu görülmüştür (Jere vd. 2021). Kriyoprezervasyon ve çözme yöntemlerinin üretim sürecinde doğrulanması ve tanımlanması gerekmektedir. Aynı şekilde farklı süreçlere maruz kalan hücrelerin son ürün haline getirilmesi süreçlerinin de detaylı analizlerinin yapılması gerekmektedir.

Her MKH tabanlı üründe bulunan hücresel bileşen, son ürünün kalitesini, güvenliğini ve etkinliğini garanti altına almak için veri toplamaya dayalı standart ve tutarlı yöntemlerle tanımlanmalı, izlenmeli ve kontrol edilmelidir. MKH'lerin karakterizasyonu, sağlık otoriteleri tarafından önceden belirlenmiş yasal gerekliliklere bağlı olarak, en kritik özelliklerine göre yapılmalıdır. İdentifikasyon, canlılık, saflık, potensi, proliferatif kapasite, genomik stabilite, tümörijenite ve etkinlik değerlendirmesi, MKH'lerin karakterizasyonu için minimum kriterler olarak kabul edilir (Guadix vd. 2019). Ayrıca, özel İİU yönergeleri, ürünün herhangi bir kontaminasyonunu analiz etmek için *in vitro* çoğaltma işlemleri sırasında hücrelerin bu amaca yönelik izlenmesi gerektiğini belirtir. Bu nedenle, MKH bazlı ürünlerin kültüre edilerek üretimden sonra kontamine olmadığından emin olmak için sterilite ve mikoplazma açısından mikrobiyolojik kalite kontrol testleri yapılmalıdır. *In vitro* hücre kültürü süresince MKH'lerin, izolasyon aşaması, referans numune, ara ürün, son

ürün, saklama örneği, ana hücre bankası (master cell bank) ve prosese göre gerektiğinde çalışma hücre bankası (working cell bank) gibi farklı noktalarda karakterize edilebileceği önerilmektedir (Guadix vd. 2019; Cooper & Viswanathan 2011; Oliver-Vila vd. 2016).

WJ-MKH'lerde kemik iliği kaynaklı MKH (Kİ-MKH)'lere göre fark, özellikle tüm karakterizasyon çalışmalarının pasaj 3 (P3)'te gerçekleştirilebilmesidir (Laroye vd. 2019). Saf bir MKH kültürünün anca P3'te elde edilmesi nedeniyle çeşitli kaynaklarca önerilen ana hücre bankası bu hücreler için ancak P3'te elde edilmiş olur. P3'e kadar kültüre edilerek; gerektiğinde önceki pasajlarında dondurulup saklanarak, getirilen hücrelerden verilen örnekler kalite kontrol birimlerince tüm karakterizasyon çalışmalarına tabii tutulurlar. Tüm test sonuçları çıkana kadar tekrar dondurularak saklanan hücreler, test sonuçları uygun çıktığında çözülerek kültüre edilirler (böylece bir pasaj daha atlayarak P4 olurlar) ve stok amacıyla tekrar dondurularak saklanırlar. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından insan klinik deneyleri için "minimal düzeyde manipüle edilmiş" hücrelerin kullanılması tavsiye edilmiştir (Jung vd., 2012). Daha önceki çalışmalarda gösterdiği gibi erken pasajlar klinik uygulamalar için daha çok tercih edilmektedir (Guadix vd. 2019; Vieira Paladino vd., 2019; Heldring vd. 2015; Moll vd. 2016). Bunun nedeni uzun süreler boyunca kültüre edilen MKH'ler (örneğin P20) kısa süreli kültüre edilen muadillerine kıyasla senesens genlerinin ifadesinin artışı (Wagner vd., 2010), morfolojik değişiklikler, azalmış farklılaşma potansiyeli, kemokin reseptör gen ifadesi azalması, telomer uzunluğunda kısalma ve azalmış immünosupresif özellikler göstermeleridir (García-Bernal vd., 2021). Mevcut durumda P4 hücreler son ürün olarak tercih edildiğinden, P3'te tüm testleri çalışılan ve ardından dondurularak saklanan hücreler son ürün olarak hazırlanır. Son ürünlerin hazırlanması öncesi, özel İİU yönergelerinin de önerdiği şekilde, ürünlerin kültüre edilme süreçlerinde herhangi bir mikrobiyolojik kontaminasyona maruz kalmadığından emin olmak için sterilite testleri gerçekleştirilir. Bu testler Avrupa Farmakopesi'nde de tanımlandığı üzere hızlı mikrobiyolojik testler olarak adlandırılan BACTEC sistemleri ile yapılır (European Pharmacopoeia Chapter 2.6.1.). Bu testin sonuçlanması 5 gün sürerken, herhangi bir kontaminasyon varlığında yaklaşık 24-48 saat içinde pozitif olarak sonuçlanmaktadır. Bu nedenle son ürün haline getirilmesi planlanan hücreler yaklaşık 4 gün önceden çözülerek kültüre alınır ve bir gün sonra BACTEC için örnek verilir. Olası bir kontaminasyonda son ürün hazırlanacağı güne

kadar pozitif bir pikin görüleceği öngörülür. Herhangi bir pozitiflik görülmeyen hücreler, planlanan günde son ürün haline getirilir ve uygulayıcı hekime transferleri yapılır. Bu tarz hazırlanan ürünlere "taze (fresh) ürün" tanımlaması yapılır. Taze (fresh) son ürünler, genellikle planlı olan ürün çıkışlarında kolaylıkla organize edilebilirken (örneğin; Bakanlık onayı ile yürütülen klinik deneme/araştırmalar: diyabet, serebral palsi, spinal kord hasarı vb.); acil olarak ürün çıkışı talebi olan hastalık gruplarında (örneğin; GVHD, COVID-19 vakaları) bahsedilen şekilde bir planlama yaparak ürünleri daha önceden kültüre etmek ve ardından son ürün haline getirmek mümkün olmamaktadır. Acil olarak hücresel ürün ihtiyacı bulunan hastalarda en kısa sürede ürünün teslim edilmesi gerekmektedir. Eğer stok olarak saklanmak üzere hazırlanacak olan hücreler o sırada kültür koşullarında bulunmuyorsa, bu hastalara "taze (fresh) ürün" vermek imkansızdır. Genellikle acil çıkışlarda dondurularak saklanmakta olan hücreler hemen çözdürülerek son ürün haline getirilirler. Bu hücrelerde minimum gereklilikler olan hücre sayısı & canlılık, flow sitometri ile saflık, mikrobiyolojik kontrol için endotoksin testi yapılır, BACTEC için örnek verilir. Bu sonuçlar uygun çıkarsa (son ürün BACTEC hariç), ürün serbest bırakılır, uygun koşullarda sorumlu hekime ürün teslimatı yapılır.

Acil kullanım gereksinimi bulunan hastalar genellikle immun atakları nedeniyle MKH ürünlerine ihtiyaç duyarlar. Burada da son ürün haline getirilen hücrelerin özellikle bağışıklık baskılama özellikleri öne çıkar. Hücreler son ürün haline getirilmeden birkaç gün önce kültüre edilemediğinden, bu hücrelerin *in vitro* koşullarda kendi özelliklerini tekrar kazanmasına fırsat tanınamamaktadır. Canlılığına ve saflığına bakılsa bile, dondurulup çözülme ve hemen son ürün haline getirilme süreçlerinin bu hücrelerin bağışıklık baskılama özelliklerini değiştirip değiştirmediği, gen ekspresyon profilleri üzerinde etkileri olup olmadığı, telomeraz gen aktivitelerinde fark olup olmadığı detaylı bir şekilde araştırılmamıştır.

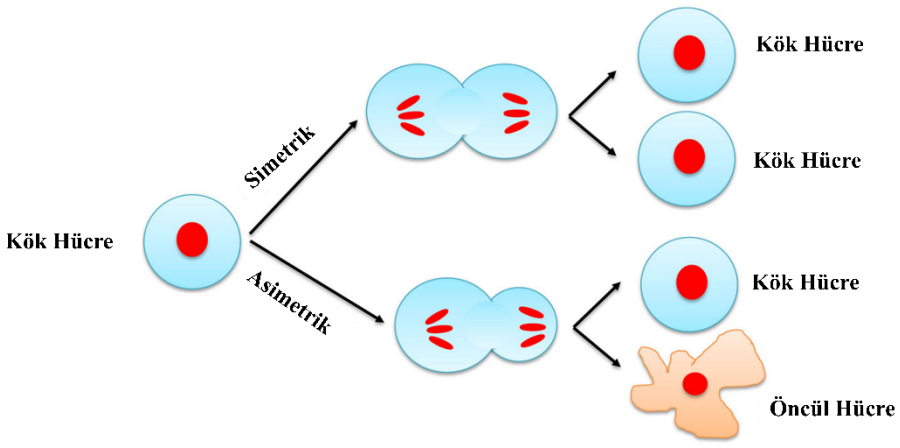
Bu doktora tez çalışmasında; insanda tedavide kullanım amaçlı üretilen mezenkimal kök hücrelere serilerinin farklı basamaklarından elde edilen son ürünlerinin ayrıntılı karakterizasyon analizlerinin karşılaştırılmalı olarak yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçla son ürün serbest bırakma süreçleri için gerekli olan minimal gerekliliklerin yanı sıra, potensi, apoptoz, hücre döngüsü, canlılık & proliferasyon, büyüme faktörü analizi ve *in vitro* yara iyileşmesi gibi kapsamlı karakterizasyon analizleri de gerçekleştirilmiştir. P3'e getirilen hücrelerin karakterizasyon çalışmaları

yapılmış ve dondurularak saklanmıştır. 1 ay süre ile dondurularak saklanan hücreler ardından çözdürülerek farklı süreçlere maruz bırakılarak son ürün haline getirilmiştir. Her bir hazırlanan son ürün için tüm testler gerçekleştirilmiş ve karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler ve Özellikleri

Kök hücreler, kendilerini yenileyebilme ve farklılaşarak çeşitli hücre tiplerine dönüşebilme özelliğine sahip hücrelerdir (Potten & Loeffler, 1990). Kök hücreler simetrik ve asimetrik bölünme yeteneğine sahiptirler (Shahriyari & Komarova, 2013; Chen vd., 2015) (Şekil 2.1.). Böylece doku ve organların ihtiyacına göre yanıt verirler. Asimetrik bölünebilme yetenekleri sayesinde dokudaki kök hücre havuzu korunmuş olur (Gómez-López vd., 2014); Kök hücrelerde, her bölünme sonucunda kısalan telomer adı verilen Deoksiriboz nükleik asit (DNA) bölgelerini (insanda TTAGGG) kendi Ribonükleik asit (RNA) kalıbını kullanarak ifade eden telomeraz enzim aktivitesi yüksektir. Bu durum onlara bölünmelerinin teorik olarak sınırsız olması özelliği kazandırır. Bunun aksine söz konusu enzim, somatik hücrelerde aktif olmadığı için, belli bir bölünmeden sonra bu hücreler canlılığını yitirecektir (Yui vd., 1998, Karaöz & Ovalı, 2004). Kök hücreler doku onarımında çok önemli bir rol oynar ve doku hasarı sırasında sayıları hızla artar (Pretheeban vd. 2012; Watson vd., 2015; Caplan, 2015; Liau vd., 2020; Marescal & Cheeseman, 2020). Bu süreç yetişkin kök hücrelerinin, özellikle de doku onarımı ve rejenerasyonu için gerekli olan mezenkimal stromal hücrelerin aktivasyonunu içerir (Rennert vd. 2012).



Şekil 2. 1. Kök hücrelerde simetrik ve asimetrik bölünme (Chen vd., 2015)

Kök hücreler esas itibariyle iki farklı kaynaktan elde edilirler. Bu kaynaklar embriyonik gelişim sürecinin erken dönemlerinde blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler olarak belirtilebilir (Karaöz & Ovalı, 2004).

Erişkin kök hücreler; hematopoietik kök hücreleri, stromal kök hücreler (mezenkimal kök hücreler) ve organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreleri şeklinde sınıflandırabilmektedir (Karaöz & Ovalı, 2004).

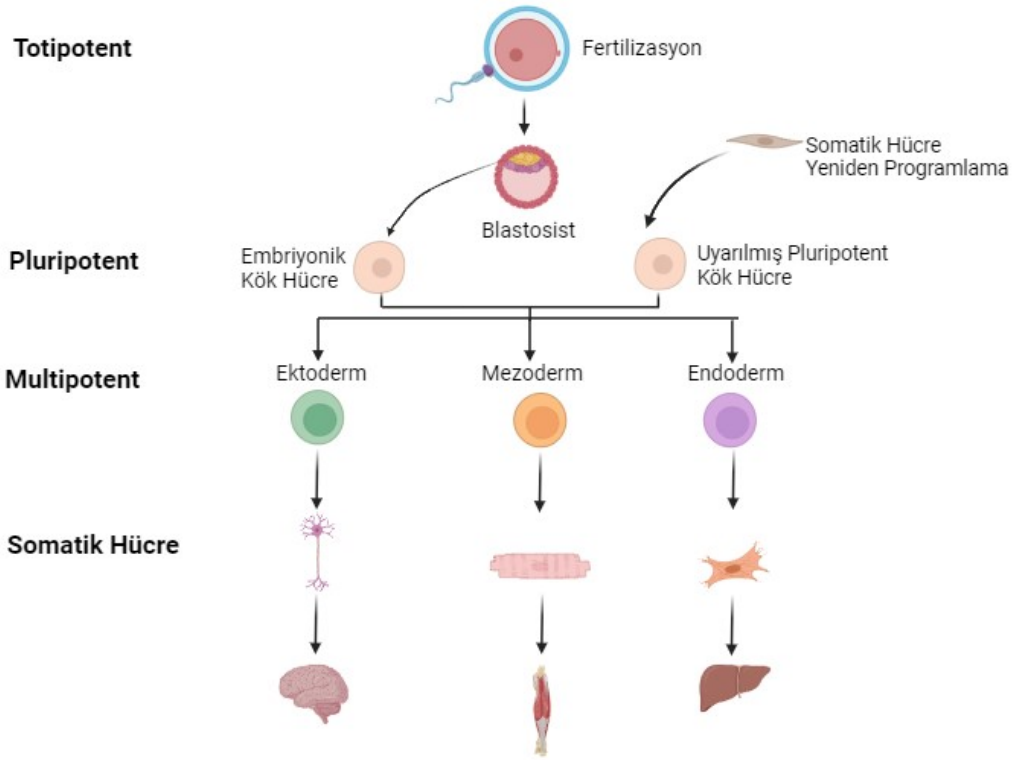
Diğer vücut hücrelerinden uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendini yenileyebilme, özelleşmemiş farklı hücre tiplerine farklılaşabilme ve hasarlı dokularda dokunun işlevinin tekrardan yerme getirilmesini sağlama yetenekleri ile diğer vücut hücrelerinden ayrılan kök hücreler, temel olarak iki ana grupta (embriyonik kök hücreler ve erişkin kök hücreler) toplansalar da bu hücreler çeşitli farklılaşma potansiyellerine göre de sınıflandırılabilirler (Şekil 2.2.).

Totipotent hücreler embriyoyu ve ekstra-embriyonik dokular olarak adlandırılan embriyoya ait embriyonik membran ve dokuları oluşturma yeteneğindedirler. Yani totipotent kök hücreler vücuttaki tüm hücre tiplerine dönüşebilen ve bir organizmayı meydana getirebilen hücrelerdir.

Pluripotent kök hücreler de vücuttaki tüm hücre tiplerine dönüşebilen ancak bir organizmayı meydana getirebilecek yeteneğe sahip olmayan hücrelerdir. Çünkü bu kök hücreler ekstra-embriyonik yapıları oluşturamazlar. Pluripotent kök hücrelere verilebilecek örnekler embriyonik kök hücreler ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerdir.

Diğer bir grup ise multipotent kök hücrelerdir ki bu hücreler sınırlı hücre tipine dönüşebilen hücrelerdir. Bu hücreler bulundukları dokuya özgü hücrelere ve sınırlı farklı doku hücrelerine dönüşebilme yeteneğine sahiptirler. Multipotent kök hücreler; hematopoietik, mezenkimal ve nöral kök hücreler dahil olmak üzere yetişkin kök hücreleri olarak sınıflandırılan birçok hücre tipini içerir. MKH'ler; kemik, kıkırdak, kas, yağ, sinir, epitel ve benzeri hücrelere farklılaşma kapasitelerinin yanında kendini yenileme özelliğine de sahiptir (Kolf vd., 2007; Uccelli vd., 2008; He vd., 2009; Sarugaser vd., 2009; Marquez-Curtis vd., 2015; Han vd., 2022). *İn vitro* ortamda sınırlı bir çoğalma kapasitesine sahiptirler.

Son olarak unipotent yani progenitör hücreler sayılmaktadır ki bu hücreler de sadece çok özel hatlara farklılaşma eğilimde olan hücrelerdir (Gardner, 2002).



Şekil 2. 2. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerine göre sınıflandırılması

2.2. Mezenkimal Kök Hücreler ve Özellikleri

Yetişkin vücudunda farklılaşmış dokulardaki farklılaşmamış hücrelere erişkin veya MKH'ler denir. Bu hücreler ayrıca multipotent mezenkimal stromal hücreler olarak da tanımlanabilir. 'Mezenkim' terimi epiblastın farklılaşmasından başlayarak embriyonun gelişmesinde ve daha sonra fetüsün yaşamında önemli yer tutan, gevşek bağ dokusu yapısındaki dokulara verilen isimdir.

MKH'ler, farklı dokulardan izole edilebilen, *in vitro* ortamda kültür kabı yüzeyine yapışan, koloni oluşturan ve multipotent farklılaşma kapasitesine sahip olan hücrelerdir. MKH'ler, ilk kez fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin ortama yayılması sonrasında kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaşan ve fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerinin geliştiğini gösteren Friedenstein tarafından tanımlanmıştır (Bianco vd., 2008). MKH'ler birçok dokudan elde edilebilir. Erişkin kök hücre kaynağı olarak kemik iliği, adipoz doku, amniyotik sıvı, kan, iskelet kası, diş pulpası, merkezi sinir sistemi ve göbek kordonu örnek olarak verilebilir (Bajada vd., 2008; Bacakova vd., 2018). Bu hücreler birçok dokuda olabilmektedir ve köken aldığı dokuların hücrelerine farklılaşabilirken, plastisite özellikleri sayesinde diğer dokuların karakteristik hücrelerine de farklılaşabilmektedirler. Bu hücreler

bulundukları dokularda, “Mezengenezis hipotezi”ne göre çoğalma yönelim, seviye ilerleme, farklılaşma aşamalarından geçerek ilgili hücre tipine farklılaşırlar. Böylece vücutta doku onarımının başrol oyuncuları olarak görev alırlar (Karaöz & Ovalı, 2004).

MKH’ler doku içinde uykuda olabilirler ancak yaralanma ve onarım durumlarında çoğalırlar (Falanga, 2012). Doku kök hücrelerinin veya progenitör hücrelerin dinamikleri dokudan dokuya değişir; örneğin kemik iliği, karaciğer, akciğer ve bağırsakta kök hücreler normal süreçlerinde veya yaralanma sırasında onarım için düzenli olarak çoğalırken (Lane vd., 2007; Fausto, 2004; Shaker & Rubin 2012; Han vd., 2006), pankreas, kalp veya sinir sisteminde yaralanma sonrası hasarlı hücrelerin yerini almak için çoğalırlar (Angelini vd., 2004; Mirotsou vd., 2011; Mansergh vd., 2000; Bouwens , 1998; Lodi vd., 2011).

Kök hücre mikroçevresinde bulunan fiziksel, kimyasal ve biyolojik sinyallerin kombinasyonu, *in vivo* kök hücre kaderinin yönlendiricileri olarak gösterilmiştir. (Ohlstein vd., 2004). MKH’lerin farklı hücre tiplerine farklılaşmasını sağlayan bazı biyolojik ve kimyasal sinyaller belirlenmiştir ve bu sinyal molekülleri *in vitro*’da hücre farklılaştırma çalışmalarında kullanılmaktadırlar. MKH'ler üzerinde düzenleyici etkileri olan büyüme faktörleri arasında; insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF-β) süper familyasının üyeleri, fibroblast büyüme faktörleri (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve Wnt olarak bilinen büyüme faktörleri ailesi bulunmaktadır (Liu ve ark., 2009).

MKH'ler, proliferasyon ve farklılaşmadaki önemli potansiyelleri nedeniyle rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanlarındaki uygulamalar için mükemmel adaylar olarak kabul edilmektedir (Mohammadian vd., 2015). Ayrıca MKH'ler hematopoezi destekleyen stromal hücreler olarak da işlev görebilirler (Prockop, 1997; Pittenger vd., 1999).

MKH’ler başka hücrelere farklılaşma kapasitelerinin yanı sıra; hasarlı hücre ile füzyon yeteneğine sahip olup (Dörnen & Dittmar, 2021), büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler salgılayarak hasarlı hücre/doku onarımına katkı sağlar (Kalinina vd., 2011). Migrasyon özellikleri sayesinde hasarlı dokuya ulaşabilirler (Fu vd., 2019). Bu özellikleri sayesinde rejeneratif tıbbın gözde aktörleri arasında yer almaktadırlar.

MKH’ler hem immun sistemi düzenleme hem de doku tamiri yapabilme özellikleri nedeniyle son dönemlerde oldukça yaygın araştırma ve uygulama alanına sahiptir (Song vd., 2020). Bunun dışında araştırmacılar son zamanlarda MKH'leri, *in vitro* genetik modifikasyon için erişilebilirlikleri ve çoğunlukla *in vitro* kültürlerinin verimliliği nedeniyle gen terapisi çalışmalarında sıklıkla kullanmaktadır. Bu hücreler gen aktarımı için uygundur ve bu nedenle çoğalmayı teşvik etmek, belirli hücre soyuna farklılaşmayı artırmak ve yaşlanmayı önlemek için genetik manipülasyon için mükemmel adaylardır (Mohammadian vd., 2015).

Klinik kullanımda MKH uygulamaları ile;

1) Direkt parakrin etkilerle doku yenilenmesi/onarımı,
2) İmmun düzenleme,
3) Hücre engrafmanında destek sağlanması hedeflenmektedir.

MKH’lerin özellikleri, elde edildikleri kaynaklara, izolasyon yöntemlerine, kültür ortamlarına ve koşullarına göre bazı değişiklikler gösterebilir. Ancak Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society of Cellular Therapy, ISCT) tarafından 2006 yılında MKH’ler için bazı belirleyici kriterler getirilmiştir:

• MKH’lerin, *in vitro* ortamda plastik kültür kabına yapışan kültür oluşturmaları gerekmektedir ve morfolojik olarak fibroblast benzeri, uzun, ince ve yassı hücrelerdir.

• MKH’ler CD90, CD105, CD73 yüzey belirteçlerini pozitif ifade ederken; CD34, CD45, CD14, CD79α, CD11b, CD19 ve HLA-DR gibi hematopoietik yüzey antijenlerini negatif olarak ifade etmelidir.

• MKH’ler *in vitro* ortamda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma kapasitesine sahip olmalıdır.

Bunların dışında MKH’lerin ortak özellikleri:

• MKH’ler, kendilerini yenileyebilme ve farklılaşarak çeşitli hücre tiplerine dönüşebilme özelliğine sahiptirler. MKH’ler, osteosit, kondrosit, adiposit, miyosit, kardiyomiyosit, hepatosit, pankreatik beta hücre, nöron, astrosit, oligodendrosit, endotelial hücre, epitelial hücre, melanosit, makrofaj, dendritik hücre, mast hücre, lenfosit gibi farklı hücre tiplerine dönüşebilirler (da Silva Meirelles vd., 2006; Lakshmipathy & Verfaillie, 2005).

• MKH’ler, immünomodülatör ve immünsupresif özelliklere sahiptirler. Bağışıklık sistemi hücreleri ile etkileşerek bağışıklık yanıtlarını düzenleyebilir, immün baskılanma ve toleransı teşvik edebilirler (Paladino vd., 2017). MKH’ler, T hücreleri, B hücreleri, doğal öldürücü hücreler, dendritik hücreler, makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller, mast hücreleri, trombositler gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin aktivasyonunu, proliferasyonunu, farklılaşmasını, migrasyonunu ve sitokin salınımını etkileyebilirler (Müller vd., 2021; Murphy vd., 2013; Uccelli vd., 2008). İnterlökin (IL)-1, IL-2, IL-12, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α) ve interferon-gama (INF ɣ) gibi enflamatuar moleküllere yanıt olarak, MKH'ler, birçok bağışıklık hücresi türü arasında karmaşık geri besleme mekanizmaları ile bir dizi büyüme faktörü ve anti-enflamatuar protein salgılar (Demircan vd., 2011). Anahtar immünmodülasyon sitokinleri arasında IL-10, IL-6, transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-β1), kemokinler (CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL20 (MIP-3α), CCL26 (eotaxin-3), CXCL1 (GROα), CXCL2 (GROβ), CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (i-TAC), CXCL12 (SDF-1), CX3CL1 (fractalkine), IL-8, GROα, MCP-1, RANTES, SDF-1 gibi), indoleamin 2,3-dioksijenaz (IDO), VEGF, İntersellüler adezyon molekülü (ICAM), prostaglandin E2 (PGE2), IL-4, hepatosit büyüme faktörü (HGF) bulunmaktadır (Uccelli ve ark., 2008; Kyurkchiev vd., 2014; Song vd., 2020). MKH'ler, T hücreleri, doğal öldürücü hücreler (NK), B hücreleri, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler dahil olmak üzere birçok enflamatuar bağışıklık hücresinin çoğalmasını ve işlevini önlerler (Kyurkchiev vd., 2014).

• MKH’ler, homing ve migrasyon özelliklerine sahiptirler (Ding vd., 2011; De Becker & Riet, 2016; Fu vd., 2019). Hasarlı veya inflamatuvar dokulara yönelerek, doku onarımına ve rejenerasyonuna katkı sağlayabilirler. Bu dokulardan salınan kimyasal sinyallere cevap vererek, hücre yüzeylerindeki reseptörler aracılığıyla bu dokulara tutunabilir ve göç edebilirler (Ullah vd., 2019).

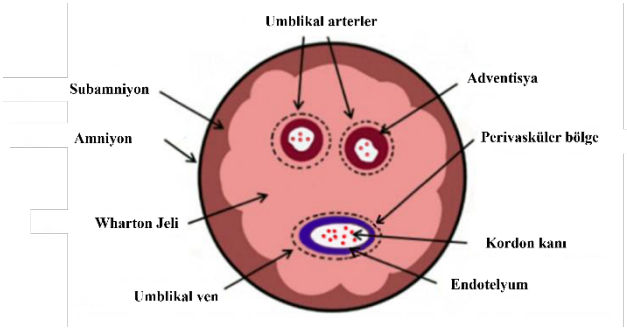
Çeşitli hastalıklar ya da travma kaynaklı hücre, doku ve organ kayıplarının hücre tabanlı rejeneratif tedavisinde kullanılan kök hücre kaynakları arasında erişkin dokulardan izole edilen mezenkimal kök hücreler; teratojenik ve immunojenik olmamaları nedeniyle ön plana çıkmaktadır. Majör histo-uyumluluk kompleksi (MHC) sınıf I’in (insan lökosit antijeni sınıf I'in (HLA-I)) düşük yüzey ekspresyon seviyesi ve MHC sınıf II (HLA-II) ekspresyonunun olmaması MKH’lerin allojenik

alıcıların immünolojik gözetiminden kaçmasını sağlar (Le Blanc vd., 2003; Wang vd., 2019). MKH'lerin biyolojisi hakkında artan bilgiler, bu hücrelerin olası klinik kullanımları hakkında yeni bilgiler sağlamıştır ve bu hücrelerin klinik kullanımları son zamanlarda oldukça artmıştır (Wang vd., 2018.; Kalaszczynska & Ferdyn, 2015; Contreras, vd., 2016).

Laboratuvar ortamında farklı tipte kök hücreler çok çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedir. Hücresel tedavilerde, kök hücrelerin insanlara uygulanabilmesi için en önemli adım, uluslararası kabul edilmiş standartlarda İİU ortamında üretilmesi, çoğaltılması, klinik kullanım kalitesine sahip olması ve ileride kullanılabilmesi amacıyla bankalanabilmesidir. İnsanlara uygulanacak hücresel tedavi ürünleri, İİU koşullarında üretildikten ve gerekli kalite kontrol testlerinden geçtikten sonra, ülkelerin Sağlık Bakanlıklarının kontrolünde etik düzenlemeler ve yönetmeliklere uygun şekilde, ilgili otoritelerce izin verildiği takdirde klinik deneme ve klinik araştırma kapsamında kullanılmaktadır (National Academy of Sciences 2014; Zakrzewski vd., 2019). Klinik kullanıma uygun MKH'lerin İİU ortamında üretilerek kullanılabilir hale getirilmesi ciddi bir teknoloji, alt yapı ve deneyim gerektirmektedir.

2.3. Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücreleri

Anatomik olarak göbek kordonu, iki umbikal arter ve bir umbilikal venden oluşur. Her ikisi de Wharton Jeli (WJ) olarak bilinen ve daha sonra amniyotik epitel ile kaplanan, özel bir mukoza proteoglikan bakımından zengin matris içine gömülüdür (Kim vd., 2013; Spurway vd., 2012) (Şekil 2.3.). Bu yapı damarların sıkışmasını ve burulmasını önlediği için, işlevi özellikle önemlidir; böylece anne ile fetüs arasında çift yönlü kan transferinin sürdürülmesinde hayati bir rol oynar ve bu da fetüsün düzgün gelişimi için kritik öneme sahiptir. Damarların çevresini saran WJ, glikozaminoglikanlar (çoğunlukla hiyalüronik asit), kolajen lifler, miyofibroblastlar ve ara sıra mast hücreleri içeren ekstraselüler matriksten oluşan jelatinimsi bir bağ dokusudur (Stefańska vd., 2020).



Şekil 2. 3. İnsan göbek kordonunun kesit diyagramı (Kim vd., 2013)

MKH'ler, göbek kordunun çeşitli bölmelerinden izole edilmiştir. Bunlar; umbilikal venin subendotelyal tabakası, umbilikal kord astarı ve perivasküler bölgesiyle birlikte Wharton Jeli'dir. (Stefańska vd., 2020). WJ, bahsedilen bu göbek kordonu parçaları arasında en popüler MKH kaynağıdır.

İlk olarak 1656 yılında Thomas Wharton tarafından tanımlanan insan göbek kordonunun ilkel bağ dokusu olan WJ'den hücreler ilk kez McElreavey ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir (McElreavey vd., 1991). Eksplant kültür yöntemi ile ilk kez izole edilen bu hücreler morfolojileri ve hücresel proteinlerin ekspresyonu bakımından fibroblast olarak karakterize edilmiş olup daha sonraları yapılan çalışmalar ile bu hücrelerin kas hücrelerinin özelliklerine de sahip olduğu ve bu nedenle tipik fibroblastlar olmadıkları ortaya konmuştur (Takechi vd., 1993; Kobayashi vd., 1998). WJ'den elde edilen benzersiz hücre popülasyonunun, MKH'ler için karakteristik özellikler sergiledikleri ISCT tarafından bildirilmiştir (Dominici vd., 2006)

WJ, özellikle MKH'ler açısından zengindir. Subramanian ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma, göbek kordonunun bu bölgesinde bulunan hücrelerin kök hücre özellikleri bakımından en zengin hücreler olduğunu ortaya koymuştur (Subramanian vd., 2015). WJ'den elde edilen MKH'ler, etik kaygılar olmadan, doğumdan sonra tıbbi atık olarak değerlendirilen bir dokudan kolayca izole edilebildiği için son yıllarda çok dikkat çekmiştir.

MKH'lerin köklülük (stemness) ve bağışıklık özellikleri, yetişkin kaynaklı MKH'lere kıyasla fetüs kaynaklı MKH'lerde daha güçlü bir şekilde ifade edilmiştir. Bu amaçla, WJ'nin genç yaşı, bu fetal kökenden elde edilen MKH'lerin, kemik iliği veya yağ gibi daha yaşlı, yetişkin doku kaynaklarından izole edilenlere göre çok daha proliferatif, immünosupresif ve hatta terapötik olarak aktif kök hücreleri sergileyeceğini düşündürmektedir (Kim vd., 2013). Bu hücreler ayrıca, hastalık

geçmişi ve dokular üzerinde yaşam tarzından kaynaklanan etkiler gibi daha az çevresel müdahaleye maruz kalan korunmuş bir yenidoğan dokusundan türetilen çok genç hücreler olduğundan; terapötik uygulamalarını destekleyebilecek daha homojen bir hücre popülasyonu elde edilmesi söz konusudur (Fazzina vd., 2015; Paladino vd., 2017).

2.3.1. WJ-MKH'lerin izolasyonu

WJ-MKH'leri hem enzimatik hem de eksplant olarak iki farklı şekilde izole edilebilir (Stefańska vd., 2020; Mebarki vd., 2021). Enzimatik izolasyon, kordon dokusunun sindirimi için kollajenaz gibi proteazların kullanımına dayanırken; eksplant izolasyon, MKH'lerin kordon matrisinden doku kültürü kabının plastik yüzeyine göç etme kabiliyetine dayanmaktadır. Eksplant izolasyon yöntemi, mekanik doku parçalanmasını ve ardından hücre kültürü kaplarına yerleştirilmesini içerir. Kültür kabına uygun şekilde yerleştirilen dokulardan çıkan hücreler plastik yüzeyde çoğalarak genişlerler. Enzimatik izolasyon yöntemi ise, kültür kaplarına aktarılmadan önce parçalanmış dokunun kollajenaz gibi proteazlar ile (enzimatik solüsyonlar) inkübasyonu için ek bir adım gerektirmektedir (Mushahary vd., 2018).

2.3.2. WJ-MKH'lerin immunfenotipik ve genomik özellikleri

Bu hücreler, MKH'ler için asgari kriterlere uymasının yanı sıra, pluripotent embriyonik kök hücre belirteçlerinden POU5F1 (Oct-4), SOX-2, NANOG, REX-1 (Zinc finger protein 42), LIN28, SSEA-4'ü de ifade ederler (Fong vd., 2011; Gao vd., 2013; Musial-Wysocka vd., 2019). Ayrıca integrin belirteçlerinden CD29 ve CD51'i (Wang vd., 2004); adezyon moleküllerinden CD44, CD146 (Amable vd., 2014) ve CD 105'i (Wang vd., 2004) de ifade etmektedir. MKH'lerin varlığını doğruladığı varsayılan CD24 ve CD108'in ekspresyonu da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Wetzig vd., 2013; Subramanian vd., 2015).

WJ, rejeneratif ve rekonstrüktif tıp için özellikle cazip bir mezenkimal kök hücre kaynağı gibi görünmektedir. Bununla birlikte, HLA-ABC (majör histo-uyumluluk kompleksi I-MHC sınıf I olarak da adlandırılır) ifadesine ilişkin raporlar araştırmacılar arasında tutarsız olsa da (Stefańska vd., 2020; Vieira Paladino vd., 2019), HLA-DR (MHC sınıf II) ifade etmemeleri, bu hücreleri allojenik nakiller için umut verici adaylar haline getirmektedir (Xu vd., 2014; Wang vd., 2019).

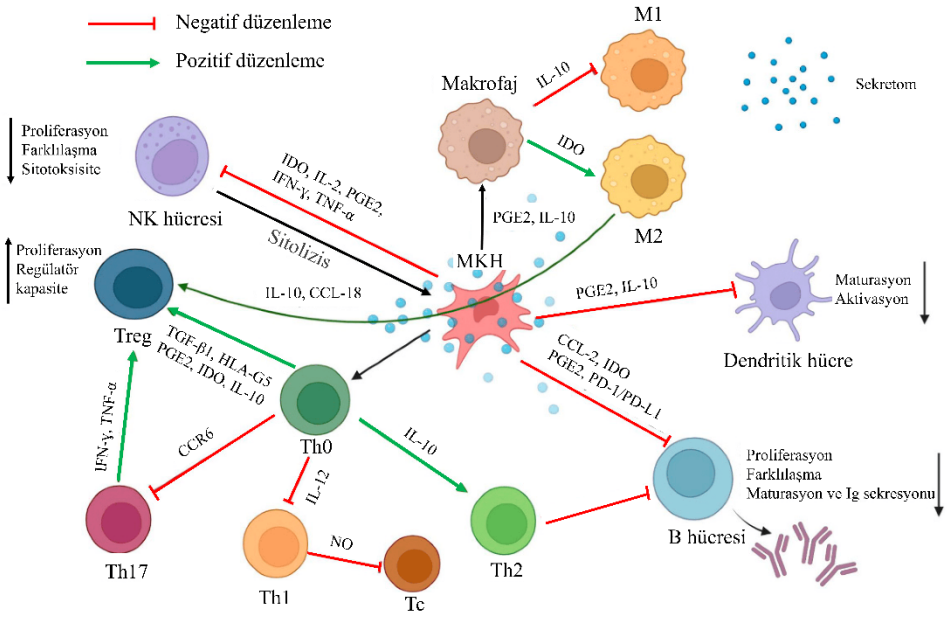
2.3.3. WJ-MKH'lerin immunomodülatör özellikleri

WJ-MKH'lerin en ilginç biyolojik özellikleri bağışıklık tepkilerini modüle etme yetenekleridir (Şekil 2.4.). Etki mekanizmaları net olarak tanımlanmamış olsa da hem hücre-hücre teması hem de çözünür faktörler WJ-MKH aracılı bağışıklık tepkilerinin kilit yönleridir (Mebarki vd., 2021). WJ-MKH'lerin immünomodülatör özellikleri ilk olarak, periferik kan mononükleer hücre proliferasyonunu baskılamaları ve allojenik veya ksenojenik immün hücrelerin proliferasyonunu uyarmamaları ile *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (Weiss vd., 2008; Zhou vd., 2011).

Çeşitli raporlar MKH'leri immün ayrıcalıklı veya hipoimmünojenik hücreler olarak tanımlamaktadır; düşük seviyelerde MHC sınıf I ve kostimülatör CD40, CD80 ve CD86 eksprese ederler. Ayrıca, IFN-γ ile muamele sonrasında Kİ-MKH'lerde HLA-DR ekspresyonunun arttığının gözlemlenmesine rağmen, WJ-MKH'lerde bu etkiyi tespit edilmemektedir (Vieira Paladino vd., 2019). WJ-MKH'ler, özellikle embriyoya karşı bağışıklık temelli tepkilerden kaçınmada önemli bir rolü olduğu bilinen lökosit antijeni G6 (HLA-G6), IDO ve prostaglandin E2 (PGE2) gibi bağışıklık baskılama proteinlerinin ekspresyonunu da yüksek seviyede sergilemektedirler (Weiss vd., 2008).

MKH'ler, T hücreleri, NK, B hücreleri, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreleri de içinde bulunduran birçok enflamatuar bağışıklık hücresinin çoğalmasını engeller ve işlevlerini önler (Corcione vd., 2006; Burr vd., 2013; Huang vd., 2022) (Şekil 2.4.).

WJ-MKH'lerin NK'lerin sitolitik aktivitesini inhibe ettiği ve T lenfosit aktivasyonunda yer alan immün yanıtla ilişkili antijenleri ifade etmediği (Weiss vd., 2008), lenfositlerle ortak kültüre (ko-kültür) edildiğinde TGF-β1 ve IFN-γ salgılanması azalttığı gösterilmiştir (Zhou vd., 2011). WJ-MKH'ler tarafından salgılanan sitokinlerin ve otokrin olarak salgılanan IL-10 etkisi altında dendritik hücreler, MHC sınıf II ve B7 moleküllerinin düşük ekspresyonunun yanı sıra daha yüksek IL-10 salgılanmasıyla karakterize edilen olgunlaşmamış tolerojenik bir fenotip kazanırlar (Kyurkchiev vd., 2014; Deng vd., 2014).



Şekil 2. 4. MKH aracılı immünomodülasyonun bağışıklık hücreleri üzerindeki etkisi (Huang vd., 2022).

MKH'ler esas olarak doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık hücreleriyle doğrudan hücre teması ve MKH'lerin parakrin mekanizması tarafından üretilen çok işlevli salgı yoluyla immünomodülatör etkiler sergiler. Şekil 2.4.'te gösterildiği gibi; MKH'ler çoğunlukla immünosupresif etki gösterirken (kırmızı inhibitör), Treg hücrelerinin oluşumu, Th2 farklılaşması ve M2 makrofaj polarizasyonu (yeşil oklar) üzerinde pozitif düzenleme gerçekleştirir. Çeşitli sitokinler, kemokinler, sinyal molekülleri ve büyüme faktörleri bu mekanizmada yer alır ve bağışıklık yanıtı aşırı aktive olduğunda veya az aktive olduğunda bağışıklık homeostazını korur (Huang vd., 2022).

Donders ve arkadaşları anti-enflamatuar moleküllerden CD200 veya PDL1 (Programlanmış ölüm ligandı 1)'in WJ-MKH'lerde artan bir ifade sergilediklerini bildirmiştir (Donders vd., 2018).

WJ-MKH'ler T hücreleri ile ko-kültüre edildiğinde BCL2L10 (Bcl-2 benzeri protein 10), BAK1 (Bcl-2 benzeri protein 7) ve BIK (Bcl-2-interacting killer) gibi pro-apoptotik gen ekspresyonlarının artışını sağlamakta ve BCL-2 ve BIRC3 gibi anti-apoptotik genlerin ise ekspresyonunda düşüşe neden olmaktadır (Karaöz vd., 2017; Deng vd., 2014). Bu veriler, WJ-MKH'lerinin aktif T hücrelere karşı apoptotik özelliklerinin olduğunu düşündürmektedir (Stefańska vd., 2020).

WJ-MKH'ler hem doğrudan hücreden hücreye temas hem de salgılanan çözünür faktörler yoluyla T hücrelerinin aktivitesini etkileyen geniş immünomodülatör özellikler sergilemektedir. WJ-MKH'ler tarafından uygulanan immünomodülatör etkilerin, hücre yaşlanmasına, hücreden hücreye bağlı olarak örnekler arasında farklılık gösterebileceğini ve ayrıca alıcılarda (monositler ve lenfositler) mevcut olan içsel değişkenliklerden etkilenebileceğini dikkate almak önemlidir (Paladino vd., 2017).

2.4. Apoptoz

Hücrelerde patolojik ve fizyolojik olarak iki farklı şekilde ölüm gerçekleşir. Apoptoz bunlardan fizyolojik olanıdır, patolojik olanına ise nekroz adı verilir.

Atoptoz, inflamasyonun ortaya çıkmasını önleyen aktif, programlanmış otonom hücresel parçalanma süreci olarak tanımlanır. Nekroz ise, inflamatuar hücresel içeriklerin kontrolsüz salınımı ile çevresel bozulmalardan kaynaklanan pasif, kazara hücre ölümü olarak karakterize edilmektedir (Fink & Cookson, 2005). 1972 yılında ilk kez Kerr, Wyllie ve Currie tarafından kullanılan ve kelime anlamı olarak "ayrı düşmek" (apo: ayrı, ptosis: düşmek) anlamına gelen 'apoptoz' terimi; programlı hücre ölümünü ifade etmektedir (Kerr vd., 1972). Apoptoz, embriyonik dönemden başlayarak birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol alır. Bir dizi gen tarafından kontrol edilir (Jan & Chaudhry, 2019) ve DNA hasarı, sitotoksik moleküller, çeşitli iç ve dış sinyaller aracılığıyla apoptoz mekanizmaları aktive olabilir.

Apoptoz süresince proteinler programlı olarak proteolitik aktiviteye maruz bırakılırlar ve parçalanan bu proteinler tüm hücre boyunca yayılarak apoptotik sinyal oluşturup hücresel yıkıma sebep olur. Apoptoz uyarısı alan hücre, kontakt inhibisyon ile bağlantısını keser. Apoptoz, nekrozun aksine tek bir hücrede meydana gelir. Na^+, K^+, Cl^- iyon kanalları kapanarak hücre içi ve dışı arasındaki molekül geçişleri durdurulur, aktin ve lamininlerin ayrılmasıyla hücrenin iskelet yapısı bozulur ve hücre büzüşür (Fink & Cookson, 2005; Kunzelmann, 2016). Apoptoz sonucu büzüşen hücrelerde kromatin yoğunlaşması meydana gelerek piknotik bir görünüm oluşur. Hücre membran bütünlüğü genel olarak korunurken, hücre membranında yer alan fosfotidil serinler hücre zarı iç kısmından dış kısma doğru taşınır ve membranda porlar oluşur. Tüm hücre organelleri küçülür ve parçalanarak hücre membranıyla birleşirler. Tomurcuklanarak kopup apoptotik vezikül meydana getirirler. Makrofajlar tarafından

tanınan apoptotik veziküller enflamasyon oluşmadan makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılırlar (Nakano vd., 1997). Apoptotik hücreleri fagosite eden hücreler ortama antienflamatuvar sitokinleri salgılamadığından, apoptoz sürecinde enflamatuvar cevap oluşmaz (Nakano vd., 1997).

Apoptozun düzenlenmesinde bir dizi protein (kaspaz ailesi, p53, sitokrom C), moleküller (Bcl-2 kalsiyum, seramid) ve mitokondriler görev alır. Bu moleküller anti-apoptotik olabildiği gibi pro-apoptotik özellikler de sergileyebilir.

2.4.1. Apoptozda görev alan moleküller ve moleküler düzenleyiciler

2.4.1.1. Kaspazlar

Apoptoz mekanizmasının kilit enzimleri olan kaspazlar aspartik asit-sistein kompleksi içeren proteazlardır. Apartik asitten sonraki peptit bağını kırarak etkinlik gösterirler. Şu ana kadar 14 farklı kaspaz izoformu tanımlanmıştır ve hücre içinde inaktif (pro-kaspaz) halde bulunurlar. 100 farklı proteini keserek apoptozda etkin rol alırlar. Kaspaz ailesi apoptotik sinyal ile kaspaz kaskatı oluşturur ve birbirlerini proteolitik yıkım ile aktif forma dönüştürürler. Kaspazlar yapısal özelliklerine ve fonksiyonlarına göre üç gruba ayrılırlar.

Başlatıcı kaspazlar: Kaspaz 2, 8, 9, 10

Efektör kaspazlar: Kaspaz 3, 6, 7

İnflamatuar kaspazlar: Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14.

Apoptotik sinyallere yanıt veren başlatıcı kaspaz ailesi adaptör proteinle kompleks oluşturarak efektör kaspazları aktifleştirirler. Efektör kaspazlar aktifleştikten sonra hücre iskeleti proteinlerini parçalayarak hücre morfolojisini değiştirir. İnflamatuar kaspazlar ise uzun prodomain içerir ve inflamatuar süreçlerde görev alır (Fink & Cookson, 2005).

2.4.1.2. p53

p53 proteinleri, DNA'da bir hasar meydana geldiğinde aktifleşerek hücre döngüsü regülasyonu, apoptoz, DNA tamiri ve hücre yaşlanmasını kapsayan antiproliferatif etki gösterir. DNA'daki hasar eğer tamir edilemeyecek düzeydeyse, p53 tarafından Bax, Apaf-1 ve Fas yapımı artırılarak apoptoz indüklenir. p53'ün Bcl-2 süper protein ailesinde pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein dengesinin düzenlenmesi üzerinde de rolü olduğu bilinmektedir. Genotoksik bir olay sonucu DNA

hasarı meydana geldiğinde p53'ler doğduran DNA'ya bağlanarak hücre döngüsünün G1'de durmasını sağlayarak tamir mekanizmalarının devreye girmesi için zemin hazırlar ya da tamir edilemeyecek bir durumdaysa hücreyi apoptoza gönderir (Pucci vd., 2000).

p53 aynı zamanda bir transkripsiyon faktörü olarak da görev yapar. DNA hasarı, hipoksi, viral transformasyon, onkogen aktivasyonları, nükleotid düzensizliği gibi etmenlerle ortaya çıkan hasarlı hücrenin proliferasyonunu engellemek üzere bir dizi gen ekspresyonunu aktifleştirir. Böylece tümörgenez sürecinin başlamasını engelleyebilir (Pucci vd., 2000).

2.4.1.3. Bcl-2 Ailesi

Apoptozda temel görev alan moleküllerden biri B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) süper protein ailesidir. Bu aile birçok üye içermekte olup, üyeler iki gruba ayrılır: Anti-apoptotik (apoptozu inhibe eden) üyeler yapısal ve fonksiyonel olarak Bcl-2 ile yüksek homoloji gösterirken, pro-apoptotik (başlatan ve devam etmesini sağlayan) üyeler Bcl-2'ye daha düşük homoloji gösterir. Pro-apoptotikler; Bax, Bad, Bid, Bak, Bim, Bcl-xs Puma ve Noxa iken; anti-apoptotikler ise, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-w, BHRL–1 ve Brag-1'dir (Pucci vd., 2000).

Hücre, ölüm sinyali aldığında, farklı bölgelerde yer alan Bcl-2 ailesi üyeleri bir araya gelir ve değişime uğrayan Bcl-2 protein ailesi kompleksi, mitokondrinin dış membranına entegre olarak membran potansiyelini bozar, apoptoz medyatörlerin salınımını arttırarak apoptozu başlatır. Anti-apoptotik proteinler Ca^{+2} iyonların transportunu düzenleyerek apoptoz regülasyonunu sağlar (Qian vd., 2022).

2.4.2. Apoptoz mekanizmaları

2.4.2.1. İntirinsik (Mitokondriyal aracılı/iç) yolak

İntirinsik apoptoz yolağını aktifleştiren etmenler arasında hücre içi sinyaller, serbest radikaller, DNA hasarı, hipoksi, endoplazmik retikulum (ER) stresi, sitozoldeki Ca^{+2} konsantrasyonundaki artış, toksinler, büyüme faktörlerinin ve hormonların yokluğu, viral enfeksiyonlar ve mitokondriyal hasarlar bulunmaktadır. İç ve dış yolaklar birbirlerini tetikleyebilir.

Mitokondriyal aracılı olan bu yolağın ana düzenleyicileri Bcl-2 protein ailesidir. Bu pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin arasındaki denge, hücrenin apoptoz

kararında etkilidir. Bcl-2 proteinleri Sitokrom C salınımı üzerinden apoptotik düzenlemede görev alırlar (Qian vd., 2022). Bax ve Bad, mitokondri membranında bulunan pro-apoptotik proteinlerdir. Sağlıklı hücrelerde monomer haliyle serbest halde bulunurlar ancak ölüm sinyali durumunda pro-apoptotik etki göstermek üzere mitokondri dış membranına yerleşirler. Mitokondri dış membrandaki Bak'lar oligomerize olarak mitokondri membranının iyon geçirgenliği bozar ve birçok apoptotik molekülün dışarı salınmasını sağlar (Cory & Adams, 2002). Mitokondriden salınan proteinler başlıca; sitokrom C, ikincil mitokondri kökenli kaspaz aktivatörü (Smac) bağlanma proteini (DIABLO), apoptoz indükleyici protein (IAP), doğrudan apoptoz inhibitör faktör (AIF), OMI/yüksek sıcaklık proteini A (HtrA2)'dır (Hussar, 2022).

Mitokondriyal membranından sitozole salınan sitokrom C sitozolik bir protein olan APAF-1 (apoptoz proteaz-aktivatör faktör 1) ve kaspaz 9 ile birleşerek "apoptozom" kompleksini meydana getirir. Apoptozom kompleksi, efektör (sonlandırıcı) kaspazdardan prokaspaz 3'ü aktif kaspaz 3'e dönüştürür (Dağdeviren, 2021).

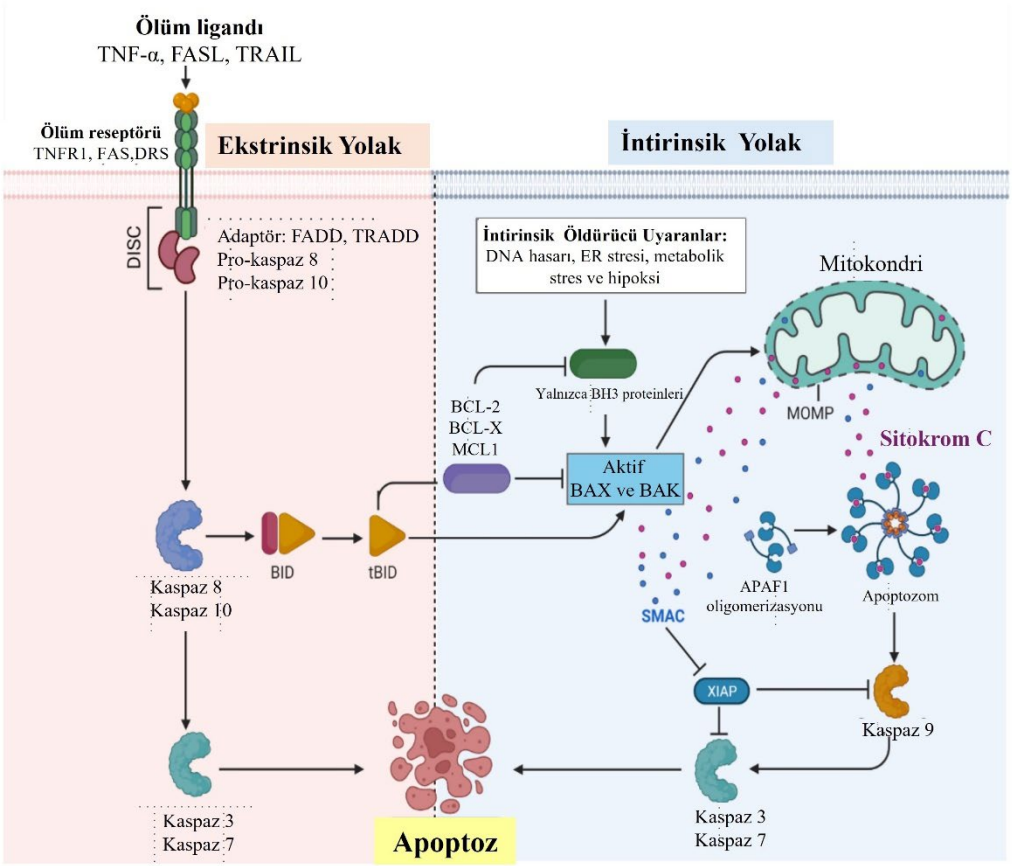
Mitokondriden dışarıya salınan Smac/DIABLO veya Omi/HtrA2 protein kompleksleri, apoptoz protein inhibitörlerine (IAP) bağlanarak kaspaz 3/9 kaskatını aktifleştirir (Yang vd., 2003). Mitokondriden salgılanan apoptoz indükleyici faktör (AIF) ise direkt olarak çekirdeğe transloke olur ve Endonükleaz-G aracılığıyla DNA'yı parçalayarak apoptozu aktifleştirir (Dağdeviren vd., 2021).

2.4.2.2. Ekstrinsik (Reseptör aracılı/Dış) yolak

Ekstirinsik yolak, hücre membranında bulunan ölüm reseptörleri aracılığıyla oluşmasından dolayı "ölüm reseptörü yolu" olarak da bilinir. Hücre zarı integral proteini olan ölüm reseptörleri, spesifik ölüm ligandlarının bağlanmasıyla aktive olur. Ölüm reseptör ailesi, Tümör nekrozis faktör reseptörü (TNFR) süper ailesinden oluşur. FAS (Apo1 veya CD95) ve TNFR1 (p55 veya CD120a) en iyi bilinen üyelerdir. FAS ligandı (FasL) Fas reseptörlerine; TNF ve lenfotoksin α TNFR-1lere; Apo3 ligandı DR3'e; TRAIL'ler DR4 ve DR5 reseptörlerine bağlanır (Adams & Cory, 2001; Spierings vd., 2004).

Dış yolakta etkili tüm transmembran reseptörler spesifik ölüm bölgesine (Death Domain: DD) sahiptir ve ligand ile bağlandığında bu domainler aktifleşir (Elmore vd.,

2007). Ölüm domainine sahip olan FasL (FADD: FAS Adaptör Protein with Death Domain) ve TNF (TRADD: TNFR Adaptör Protein with Death Domain) olarak adlandırılmaktadır. Gelen ölüm sinyalleri ile trimerik bir yapı kazanarak aktive olan FADD'lar, ölüm domainlerinin etkileşimi ile prokaspaz 8'lere bağlanırlar. Bu bağlanma ölüm tetikleyici sinyal kompleksini (DISC: Death Inducing Complex) meydana getirir. DISC, kaspaz 8/10 ve kaspaz 3/7 kompleksini aktifleştirerek hücre ölümüne neden olur (Elmore vd., 2007). Bu durum sonucunda apoptoz direkt (tip 1) veya dolaylı (tip 2) olarak gerçekleşebilmektedir. Dış ölüm sinyalleri aracılığı ile başlayan bu apoptotik mekanizma, intirinsik yolak proteini olan BİD proteininin tBİD'e dönüştürülmesiyle devam edebilir (Şekil 2.5.) (Elmore vd., 2007; Dağdeviren, 2021; Wani vd., 2023).



Şekil 2. 5. Apoptozda intirinsik ve ekstirinsik yolaklarının moleküler aktivasyon mekanizmasının temsili çizimi (Wani vd., 2023).

2.4.2.3. Perforin/Granzim yolağı

Bu yolakta sitotoksik T hücreleri ve doğal katil hücreleri apoptoza yol açar. Perforin, PRF-1 geni tarafından kodlanıp hedef hücrenin membranın por oluşumundan sorumlu bir glikoproteindir. Hücre membranına fosfolipidler aracılığıyla tutunarak membranda Ca^{+2} iyonları aracılı olarak polimerize olur ve por oluşumunu sağlar. Granzim B ise, bir serin proteaz olup kaspazlar gibi aspartat rezidülerindeki peptid bağlarını hidrolize eder. Lenfositlerden salınan Granzim B, perforin aracılığıyla hücre içine girer, prokaspaz 3 ve 10'u aktive ederek mitokondri aracılı apoptoz ile hücre ölümüne neden olur (Metkar vd., 2003).

2.4.3. Apoptoz tayin yöntemleri

Apoptoz tayin yöntemleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 2. 1. Apoptoz tayin yöntemleri (Güleş & Eren, 2008)

Morfolojik görüntüleme	Işık mikroskobu	Hematoksilen eozin boyaması: HE boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyar, böylece apoptotik hücreler nukleus morfolojisine göre değerlendirilir.
		Giemsa boyaması: nukleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmektedir.

Tablo 2. 1. (Devam) Apoptoz tayin yöntemleri (Güleş & Eren, 2008)

	Floresan Mikroskobu	Propidium Iodide (PI) /Hoechst Dye Floresan boyaların kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildikleri için hücrenin kromatini (dolayısıyla nükleusu) görünür hale gelebilir. Canlı ve ölü hücre ayrımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn. Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn. PI) beraber kullanılır. Membranı sağlam olan (canlı) hücreler, PI ile boyanmazken, ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen Hoechst boyası ile boyanırlar.
	Elektron Mikroskobu	Morfolojik değişikliklerin en doğru gözlendiği yöntemdir. Sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilir. Mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nukleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi subsellüler detaylar da incelenebilir. Gold standart olarak kabul edilen yöntemdir.

Tablo 2. 1. (Devam) Apoptoz tayin yöntemleri (Güleş & Eren, 2008)

	Faz-kontrast Mikroskobu	Hücre kültürü ortamında ölü hücreler yapıştıkları alt tabakadan ayrılarak besiyeri içinde yüzerler. Bu hücreler faz kontrast mikroskobu ile gözlenebilir. Bunun yanı sıra mitoza giden hücreler de faz kontrast mikroskobuyla gözlenebilir ancak bu hücreler aynı zamanda apoptotik hücrelerin erken evredeki görüntüleri ile karıştırılabilir. O nedenle de ayrımları hemen hemen imkansızdır. Faz kontrast mikroskobu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepcikler (blebs) izlenebilir.
Histokimyasal Yöntemler	Annexin V Yöntemi	"Annexin V"in apoptotik hücrelerde hücre zarının dışına transloke olan fosfatidilserine olan afinitesinden yararlanılarak tayin edilir.
	TUNEL Yöntemi	DNA kırıklarının *in situ* tanınmasına olanak sağlar. Böylece, dokudaki –parafin veya donmuş kesitlerde-veya hücre kültüründeki her bir apoptotik hücre saptanabilir.
	M30 Yöntemi	Apoptotik hücreler, sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu açığa çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenirler. Sadece sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür.
	Kaspaz 3 Yöntemi	Sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama metoduyla belirlenebilir.

Tablo 2. 1. (Devam) Apoptoz tayin yöntemleri (Güleş & Eren, 2008)

Biyokimyasal Yöntemler	Agaroz Jel Elektroforezi	Apoptotik hücrelerdeki endonükleaz aktivasyonu kromatinin oligonükleozomal parçacıklara ayrılmasına neden olur. Bu enzim kalsiyum ve magnezyum bağımlı olup, DNA'da tipik olarak 180-200 baz çifti ve katları biçiminde bir parçalanmaya yol açar. Bu parçalanma paterni, agoroz jel elektroforezinde merdiven biçiminde "ladder pattern" izlenir ve apopotoz için tipiktir. Agaroz jel elektroforez güvenilir sonuçlar veren kalitatif bir analiz yöntemidir.
	Western Blot	Apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması sağlanabilir. Sitokrom c'nin mitokondriye salınması da belirlenebilir.
	Flow Sitometri	Floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen bir hücre yüzey proteini saptanabilir. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir, kısa sürede ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozun belirlenmesi açısından kullanılmaktadır.
İmmunolojik Yöntemler	ELISA	Apoptozda görülen ilk olay olan sitoplazma içine nükleozomların salınmasını takip eden DNA fragmentasyonu tespit edilebilir. M30 düzeylerinin ölçümü yapılabilir.

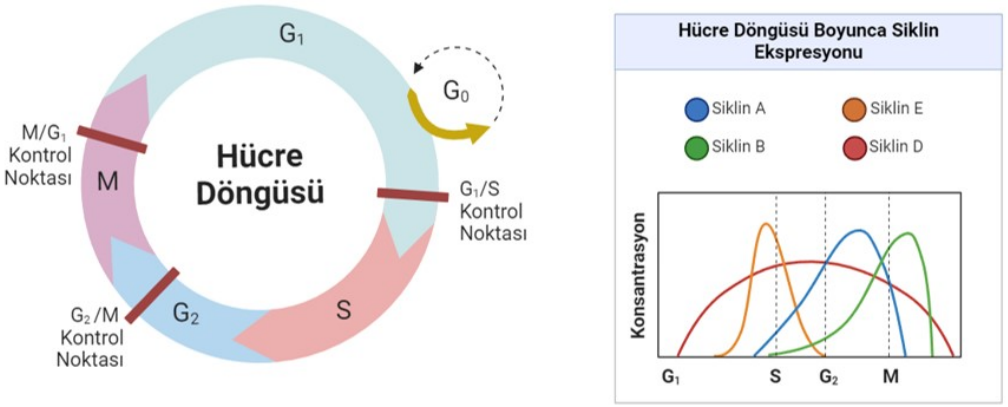
Tablo 2. 1. (Devam) Apoptoz tayin yöntemleri (Güleş & Eren, 2008)

	Fluorimetrik Yöntem	- Kaspaz Aktivasyonu (Hücre kültürü)
Moleküler Biyoloji Yöntemleri	DNA mikroarray	mRNA düzeyinde gen ekspresyon seviyeleri ölçümü yapılabilir.

2.5. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü en basit anlamıyla hücrelerin iki mitozu arasındaki aralık olarak adlandırılmaktadır.

Hücre döngüsü, bir hücrenin çoğalmasını ve bölünmesini içeren, ilerlemesini kontrol eden çoklu hücre dışı sinyallerle oldukça düzenli bir süreçtir (Nguyen vd., 1998; Israels & Israels, 2001). Bu süreç normal hücre büyümesi ve kontrolsüz çoğalmanın önlenmesi için çok önemlidir (Nguyen vd., 1998). Hücre döngüsü, her biri DNA'nın bütünlüğünü sağlamak için titizlikle düzenlenen G1, S, G2 ve M dahil olmak üzere farklı aşamalara ayrılmıştır (Israels & Israels, 2001). G1, S ve G2'yi içine alan interfaz safhası, DNA'nın kendisini replike ettiği mitoz safhası (M) ile devam etmektedir. İnterfaz safhası döngünün %90'ınını kapsamakta ve 16-24 saat sürmekteyken mitoz safhası 1-2 saat sürmektedir. Hücre döngüsü ve döngü boyunca eksprese edilen siklinlerin şematik gösterimi Şekil 2.6.'da sunulmuştur.



Şekil 2. 6. Hücre döngüsü ve siklin ekspresyonlarının şematik gösterimi

2.5.1. G1/S

Kök hücreler genelde G0 fazındadırlar. Bu evrede ekstraselüler alandan çoğalma uyarısı gelmediği için bu evreye dinlenme fazı adı da verilir. Hücreler metabolik olarak aktiftir ancak çoğalmamaktadır (Marescal & Cheeseman, 2020).

G1 evresinde çevreden gelen sinyallerin uygunluğuna göre büyüme indüklenir. Bu evrede DNA replikasyonu için hazırlık yapılır, hücre metabolik olarak aktiftir ve hücre boyutunda artış görülür. RNA ve protein sentezi çok hızlı bir şekilde gerçekleşir.

G1 fazının kontrolünden, Siklin D sorumludur. G1 fazında sentezlenmeye başlayıp S fazında inhibe olur. G1 fazının başında CDK4 ve CDK6 ile etkileşime geçen siklin D'ler aktif forma dönüşüp p107 ve p130 proteinlerini (pRB) fosforlayarak hücre döngüsünün devamını sağlarlar. G1 fazının sonunda meydana gelen siklin E/Cdk2 kompleksleri hücrenin mitojenik uyarının etkilemediği G1/S kontrol noktasına ilerlemesini sağlar. Siklinlerin fosforilizasyon etkileri siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (Cyclin-dependent kinase inhibitors: CKI) tarafından inhibe edilmektedir. CKI'lar baskılandığında hücre G1/S fazına doğru ilerler. G1 fazının devam etmesinde birçok onkogen gen ve sinyal yolağı görev alır. Bunlardan biri, CDK'ların aktivitesini artırmada önemli rol oynayan ERK (ekstrasellüler sinyalleri regüle eden kinazlar)'dir. ERK'ler birçok geni baskılayarak G1 fazının ilerlemesini sağlarlar (Vermeulen vd., 2003).

2.5.2. G2/M

DNA sentezinden sonra ikinci geçiş fazı olan G2 evresi başlar. Bu evrede hücre hacimce biraz daha büyür ve mitoz için protein sentezi ve organel düzenlenmesi gerçekleşir. Bu üç evreye birden 'interfaz' evresi denir.

Mitoz evresi profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere beş aşamadan oluşur. Mitozda, kromozomlarda yoğunlaşma, hücre zarında parçalanma, sentrozomlarda zıt kutuplara çekilme, mitotik iğ oluşumu, kromozomların zıt kutuplara çekilmesi ve sitokinez meydana gelir. Böylece birbirinin aynısı iki hücre meydana gelir.

Bu aşamada Siklin B ve CDK kompleks oluşturur ve hızla artar. Oluşan Siklin B-CDK komplesiyle (diğer adıyla MPF'dir (mitoz ilerleten faktör) mitoza geçiş uyarılır. Geç S fazında sentezlenen bu kompleks mitoz tamamlanana kadar yüksek seviyelerde kalır. Siklin B seviyesinde hızla bir düşüş gerçekleşir ve MPF inhibe olur.

İnaktive olan MPF'ler hücre döngüsünün ilerlemesini engeller ve böylece mitoz durdurulmuş olur (Kishimoto, 2018).

2.5.3. Hücre döngüsü analiz yöntemleri

Farklı evrelerdeki hücrelerin belirlenmesi için mitotik hücreler mikroskobik olarak ayırt edilebilseler de döngünün diğer evrelerindeki (G1, S ve G2) hücreler ancak biyokimyasal kriterlerle saptanabilmektedir. DNA'ya bağlanan floresans boyalar veya antikorlar ile mikrotübüller gibi spesifik hücre bileşenleri ayırt edilebilir. Sentez fazını görüntüleyebilmek için timin analoğu olan bromodeoksiüridin (BrDU) kullanılır. Çoğalma gerçekleştiğinde BrDU ile muamele edilen hücreler anti-BrDU antikoru ile boyandığında mikroskop altında renkli görülür (Ligasová vd., 2023).

Genellikle, hücre döngüsünün farklı evrelerindeki hücreler DNA içeriklerine göre ayırt edilebilir. Örneğin; G1 'deki hayvan hücreleri diploiddir ve DNA içerikleri 2n'dir. S evresinde ise replikasyon sonucu DNA 2n'den 4n'ye çıkar. S evresindeki hücreler 2n ile 4n arasında DNA içeriğine sahiptir. G2 ve M evresindeki hücrelerde DNA içeriği 4n olarak kalır, sitokinezden sonra ise 2n'ye iner. Hücrenin DNA içeriği, hücrelerin DNA'ya bağlanan floresan boya ile inkübasyonu sonrası akım sitometresi veya floresans ile aktive olan hücre ayırıcı kullanılarak, floresans yoğunluğunun ölçülmesi ile belirlenir. Bu analizler sonucunda, hücrelerin G1, S ve G2/M evrelerinden hangisinde olduğu tespit edilir (Ligasová vd., 2023).

2.6. MKH'lerin Klinik Kullanımları

WJ'den türetilen MKH'ler, kaynak kolaylığı, *in vitro* kültüre edilebilme, farklılaşma yetenekleri, immün sistemden kaçma ve immün-düzenleme kapasiteleri dahil olmak üzere umut verici nakledilebilir özellikler sergilemektedir. Yapılan birçok çalışma, WJ kaynaklı kök hücrelerin çeşitli hastalıkların tedavisi için nakledilebilir hücreler olarak birçok potansiyel avantaja sahip olduğunu göstermektedir (Liau vd., 2020; Yilmaz vd, 2020; Kabatas vd., 2020; Kabatas vd., 2021; Boyalı vd., 2024; Karaoz vd., 2020; Kabataş vd., 2021; Okur vd., 2018).

FDA ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi düzenleyici kurumlar, MKH bazlı ileri tedavi tıbbi ürünlerinin (İTTÜ; Advanced Therapy Medicinal Products: ATMP) üretiminde uygulanması gereken hücre bazlı ürün kriterlerini tanımlamak için özel kılavuzlar yayınlamıştır. Bu durum, mevcut yasal gerekliliklere uygun bir üretim

süreci tasarlamak için spesifik teknik kriterlerin tanımlanması ve sürekli olarak güncellenmesi ihtiyacını açığa çıkarmaktadır (Guadix vd., 2019).

Ülkemizde hücresel tedaviler, Sağlık Bakanlığı tarafından hem Amerika Birleşik Devletleri hem Avrupa Birliği otoriteleri tarafından oluşturulmuş etik düzenlemeler ve yönetmeliklerin iyi bir sentezi ile Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Organ, Doku, Hücre ve Diyaliz Hizmetleri Daire Başkanlığı'nca "Doku ve hücreler ile ileri tıbbi tedavi ürünleri klinik araştırmaları"na yönelik yayımlanan "2006/51 ve 2018/10 Sayılı Kök Hücre Çalışmaları Hakkında Genelge"ye göre yürütülmekte ve denetlenmektedir. Klinik uygulamaya yönelik üretilen hücresel ürünler, mutlaka Sağlık Bakanlığı, TİTCK tarafından yetkilendirilmiş ve düzenli olarak denetlenen İİU laboratuvarlarında yetkili personellerce üretilmekte, kalite kontrolleri sağlanmakta ve kalite güvence süreçlerine tabi tutulmaktadır. İİU'da üretilen tüm hücresel ürünler, Sağlık Bakanlığı TİTCK tarafından yayımlanmış olan "Beşeri Tıbbi Ürünler İmalathaneleri Yönetmeliği", "İnsan Doku Ve Hücreleri İle Bunlarla İlgili Merkezlerin Kalite Ve Güvenliği Hakkında Yönetmelik" ve "İnsan Doku Ve Hücre Ürünlerinin Ruhsatlandırılması Ve Bu Ürünlerin Üretim, İthalat, İhracat, Depolama ve Dağıtım Faaliyetlerini Yürüten Merkezler Hakkında Tebliğ"e uygun olarak üretilmekte, depolanmakta ve dağıtılmaktadır.

2.6.1. İİU koşullarında steril üretim genel gereklilikleri

MKH'lerin klinik uygulamaları öncesinde, mikrobiyolojik kontaminasyon, partikül ve pirojen kontaminasyonu risklerini en aza indirebilmek amacıyla özel donanımlı merkezler ve bu merkezlerde çalışan nitelikli personeller büyük önem taşımaktadır. Tüm süreçler (üretim, kalite kontrol, depolama, serbest bırakma ve dağıtım) dikkatle oluşturulmuş ve valide edilmiş yöntemlere ve yazılı prosedürlere göre yürütülmek zorundadır (Thirumala vd., 2013). İİU, güvenli ve iyi karakterize edilmiş hücre tedavisi ürünlerini elde etme sürecinde zorunlu bir kalite güvencenin sağlanmasında en kritik noktadır (Thirumala vd., 2013).

Steril ürünlerin üretimi, personel ve/veya ekipman ve materyallerin hava kilitleri içinden geçerek, alana özel kıyafet giyerek girebildiği temiz alanlarda yürütülmektedir. Temiz alanlar, uygun temizlik standardında korunur ve uygun etkinlikle filtrelerden geçirilmiş temiz hava ile beslenmektedir (Sekiya vd., 2012; Whyte 2010). Bu alanlar sürekli olarak izlenir, alarm durumunda yapılacaklar daha

önceden belirlenerek olası alarm durumlarında gerekli aksiyonlar alınır. Üretilecek ürün hacmine uygun olarak birbirinden ayrılmış alanlarda üretim, kalite kontrol, depolama ve dağıtım süreçleri gerçekleştirilir.

Temiz alanlar, gerekli çevre özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır:

Sınıf A (Grade A): MKH'lerin üretiminin yapıldığı alanlardır. Laminar hava akımı kabinleri (LAF) içerisinde, homojen bir hava hızı sağlanarak steril alan oluşturulur.

Sınıf B (Grade B): LAF kabinlerin bulunduğu odalardır.

Sınıf C ve D (Grade C ve D): Steril ürünlerin üretiminde daha az kritik aşamaları gerçekleştirmeye yönelik temiz alanlardır. Bunlar genellikle kalite kontrol laboratuvarları, depo, sterilizasyon gibi ünitelerin bulunduğu alanlardır.

Temiz odalar ve temiz hava cihazları EN ISO 14644-1 uyarınca sınıflandırılmaktadır. Her bir sınıf için kabul edilen maksimum hava kaynaklı partikül konsantrasyonu Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Tablo 2. 2. Temiz oda sınıflarında kabul edilen maksimum hava kaynaklı partikül konsantrasyonları (Sağlık Bakanlığı TİTCK Beşeri Tıbbi Ürünler İİU Kılavuzu'ndan alınmıştır).

	Gösterilen boyutlara eş veya daha fazla izin verilen maksimum partikül/m^3 sayıları			
	Dinlenme fazı		**Çalışır durum**	
Sınıf	**0,5 µm**	**5,0 µm**	**0,5 µm**	**5,0 µm**
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	-	-

Temiz odaların işlem sırasında mikrobiyolojik olarak izlenmesi gerekmektedir. Bunun için önerilen ortalama sınırlar Tablo 2.3.'teki gibidir:

Tablo 2. 3. Temiz odaların işlem sırasında mikrobiyolojik kontaminasyon için önerilen sınırları (Sağlık Bakanlığı TİTCK Beşeri Tıbbi Ürünler İİU Kılavuzu'ndan alınmıştır).

	Mikrobiyal kontaminasyon için önerilen sınırlar (ortalama değerler)			
Sınıf	Hava numunesi (cfu/m^3)	90 mm çaplı petri açma (cfu/4 saat)	55 mm çaplı kontakt petri (cfu/plaka)	5 parmak eldiven baskısı (cfu/eldiven)
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Kullanılan tüm ekipmanlar İİU uyumluluğu için kalifiye olmalı ve İİU'ların gerektirdiği şekilde bakımları rutin olarak yapılmalıdır.

Üretim işlemlerinde kseno içermeyen reaktifler tercih edilmelidir. Mümkün olmayan reaktifler için, İİU sınıfı, klinik sınıf veya ilaç sınıfı reaktifler kullanılmalıdır (Mebarki vd., 2021).

Personeller İİU uyumluluğu ile çalışmak üzere eğitilmiş ve kalifiye olmalıdır. Güçlü bir izlenebilirlik sistemine sahip sağlam bir kalite yönetim sistemi, tüm sürecin kilit unsurudur (Mebarki vd., 2021).

2.6.2. MKH'lerin İİU şartlarında üretilmesi ve işlenmesi

MKH'ler İTTÜ olarak son yıllarda oldukça fazla sayıda klinik deneme çalışmasına öncülük etmiştir. Bu ürünlerin klinik uygulaması, uygulanacak doza bağlı olarak çok sayıda hücrenin üretilmesini gerektirir. Klinik protokollerin çoğu, hastanın kilogramı başına bir ila iki milyon hücrenin IV, IT, IM olarak uygulanmasını (Galipeau, 2013; Mizukami vd., 2018; Galipeau & Sensébé, 2018; Galderisi vd., 2022) veya 120-600 milyona kadar hücrenin subkutan veya endomiyokardiyal olarak enjekte edilmesini önermektedir (Squillaro vd., 2016; Galipeau & Sensébé, 2018; Olsen & Ng, 2018).

İİU şartlarında WJ-MKH'ler enzimatik veya eksplant olarak izole edilebilir ve ardından elde edilen hücrelerin *in vitro* uzun süreli kültürleri sonrasında büyük ölçekli bir üretim sağlanır. *İn vitro* kültür süreci, MKH'lerin önemli ölçüde manipülasyonunu içerir (Thirumala vd., 2013) ve bu da hücrelerin biyolojik özelliklerinde, fizyolojik işlevlerinde ve yapısal özelliklerinde önemli bir değişikliği beraberinde getirir (Bunpetch vd., 2017). Herhangi bir minimum değişiklik hücrelerin içsel özelliklerini etkileyebildiğinden, bu aşama kritik olarak sınıflandırılır (Papadaki, 2017). Bu nedenle, tüm süreci kontrol etmek çok önemlidir. İnsanlarda terapötik uygulamalar için, kseno içermeyen, MKH'lerin optimum büyümesi ve genişlemesi için tasarlanmış, geçerli İİU yönergelerine uygun olarak üretilmiş besiyerleri kullanılmalıdır.

MKH'ler taze olarak uygulanabildiği gibi daha sonra kullanılmak üzere dondurulabilir. MKH tabanlı klinik çalışmaların üçte birinden fazlasında dondurularak saklanmış hücreler kullanılmaktadır (Guadix vd., 2019). Bu nedenle, kriyoprezervasyon ve çözdürme yöntemleri, maksimum kriyoprezervasyon süresi ve hücreleri aktive etme süreçlerinin üretim sürecinde doğrulanması ve tanımlanması çok önemlidir. Kriyoprezervasyon, herhangi bir kullanıma hazır, hücre bazlı İTTÜ'nün başarısı için kritik bir üretim adımıdır. Kök hücrelerin güvenlik ve etkinliklerini sağlamak için kaliteli koşullar altında bankalanması büyük önem taşımaktadır (Thirumala vd., 2013; Bárcia vd., 2017). Kriyoprezervasyon ve/veya daha sonra çözdürme, İTTÜ'nün özelliklerini ve gücünü değiştirirse, ürünün yaşayabilirliği ve terapötik faydaları tehlikeye girebilir (Bárcia vd., 2017).

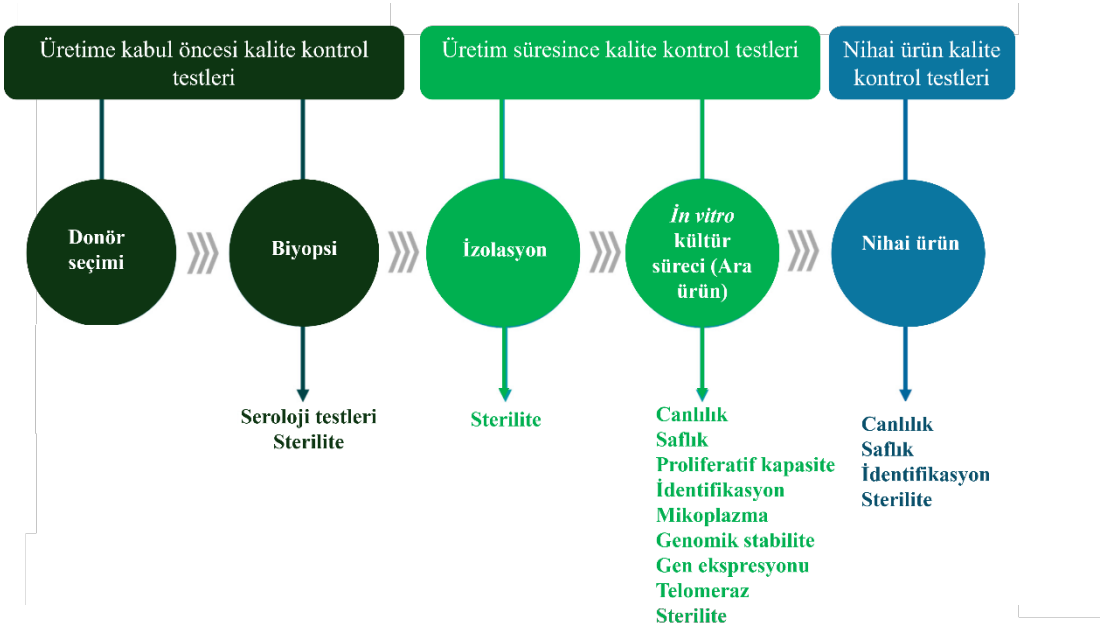
Kriyoprezervasyon teknikleri, genel olarak kriyoprotektif ajanlar kullanarak hücre içerisine girme ve hücre içi buz kristalleri ve ozmotik etkiler üzerinde oluşumu önleyerek hücreleri gelecekte kullanılmak üzere koruma yeteneğine sahip küçük moleküllerdir. En yaygın olarak kullanılan ajan dimetil sülfoksit (DMSO) olup, yavaş dondurma işlemi ile (1-2,5°C/dk) MKH'lerin işlevselliğini ve canlılığını korumak amaçlanmaktadır. Büyük miktarda kriyoprezerve edilmiş hücre, klinik kullanım için kullanıma hazır yeterli hücre sağlamak üzere bir havuz olarak toplanabilir ve allojenik olarak kullanım için stok oluşturulabilir. Düzgün bir dondurma hızı pasif veya aktif bir şekilde oluşturulabilir. Pasif dondurma yaklaşımında alkolle doldurulmuş ticari olarak satılan bir dondurma kabı, örneğin "Mr. Frosty" (izopropanolün yavaş donma özelliği nedeniyle sıcaklık 1°C/dakika dondurma hızında düşürülür) kullanılırken,

aktif dondurma yaklaşımında programlanabilir kontrollü hızlı bir dondurucu, örneğin "Planner" kullanılır (Yong vd., 2016).

2.6.3. Kalite kontrol testleri

Ülkeler arasında kalite kontrol standartları konusunda bir fikir birliği bulunmamaktadır ve her araştırma merkezi uygulamaları kendi yerel düzenleyici kurum yetkilileriyle vaka bazında değerlendirmektedir (Mizukami vd., 2018; Mebarki vd., 2021). Ancak kalite kontrol testleri ile ilgili konular EMA özel kılavuzlarında iyi bir şekilde tanımlanmıştır (Viganò vd., 2018). Genellikle, MKH'lerin kalite güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmek için yapılan testler, son ürünlerin klinik kullanım için üretimleri sırasında gerçekleştirilir. Hücre morfolojisi, identifikasyonu, büyüme özellikleri, sterilite, karyotip ve etkinlik testlerini içermektedir (Mizukami vd., 2018; Mebarki vd., 2021).

Donör seçim kriterlerine (yaş, doğum şekli, serolojik test uygunluğu vb.) göre uygun bulunan vericilerden alınan ham dokular (göbek kordonu) İİU merkezine uygun koşullarda transferi sağlandıktan sonra üretim laboratuvarlarına alınmadan önce sterilite testine tabii tutulurlar. İzolasyon işlemi sonrasında tekrar sterilite testi için örnek alınan ham dokularda herhangi bir mikrobiyal üreme tespit edilmezse *in vitro* kültürlerine davam edilir. Üretim süreci boyunca (ara ürün) ve son ürünlerde identifikasyon, canlılık, saflık, potansi, proliferatif kapasite, genomik stabilite ve mikrobiyolojik testler zorunlu kalite kontrol testleridir (Şekil 2.7.). MKH ürünlerinde son kullanma tarihi 48 saat olarak belirlendiğinden, sterilite testi için uygulamadan önce uygulama sonuçların elde edilmesi mümkün olmamaktadır (Panés vd., 2016).



Şekil 2. 7. Üretim döngüsü boyunca yapılan kalite kontrol testleri

Tüm kalite kontrol testlerinin önceden tanımlanmış ve valide edilmiş yöntemlerle yapılması bir İİU gerekliliği olup, bu testler FDA, EMA ve Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı kılavuzlarına açıklanan standartlara göre yapılmalıdır. Tüm sonuçların spesifikasyonlara uygun bulunmasının ardından serbest bırakılan son ürünler, iyi dağıtım uygulamaları sağlanarak son kullanıcıya ulaştırılır (EMA, Brüksel, Belçika, 2013).

Bu çalışmada temel alınan son ürün serbest bırakma spesifikasyonları Tablo 2.4.'te özetlenmiştir.

Tablo 2. 4. Bu çalışmada temel alınan son ürünler için serbest bırakma spesifikasyonları

Analiz		**Referans değeri**
Canlılık Oranı (%)		>%85
İmmünfenotipik Analiz	CD73, CD105, CD90, CD44	>%95
	HLA-DR, CD14, CD11b, CD34, CD19, CD45, CD79a	<%2
Endotoksin Analizi		Uygun (<0,2 EU/ml)
Görünüm		Beyaz/gri bulutsu yapıda hücre süspansiyonu
Aerobik ve Anaerobik Sterilite Analizi		5 gün içinde negatif
Gen Ekspresyonu		Pozitif genlerde Ct <30 Negatif genlerde Ct >30
Telomeraz Enzim Aktivitesi		RTA değeri <LC (low control) LC=0,3-0,8
Mikoplazma		Negatif
Verici Serolojik Test Sonuçları		Anti-HIV (Negatif) Anti-HCV (Negatif) Anti-HBc Total (Anti-HBs ilişkisine bağlıdır) HBs Ag (Negatif) Anti-HBs (Anti HBc Total ile ilişkisine bağlıdır) VDRL (Negatif) NAT (HIV, HCV, HBV) (Negatif)

2.6.4. Klinik araştırma ve klinik deneme uygulamalarında MKH'ler

İnsanlara uygulanacak hücresel tedavi ürünleri, İİU koşullarında üretilerek, ülkelerin Sağlık Bakanlıklarının kontrolünde etik düzenlemeler ve yönetmeliklere uygun şekilde, ilgili otoritelerce izin verildiği takdirde klinik deneme ve klinik araştırma kapsamında kullanılmaktadır (National Academy of Sciences 2014; Zakrzewski vd., 2019). Özellikle doğal bağışıklık düzenleme (immunomodulasyon) özelliklerine sahip MKH'lerin klinik kullanımı son zamanlarda oldukça artmıştır (Wang vd., 2018.; Kalaszczynska & Ferdyn, 2015; Contreras, vd., 2016). Doku nakli sonrası gelişen GVHD, MKH'lerin ilk klinik uygulaması olup günümüzde halen bir deneme tedavisi olarak kabul görmektedir (Le Blanc vd., 2004; Ringdén vd., 2006; Zhao vd. 2015). Bunun yanı sıra, son birkaç yıldır tüm Dünya'da etkili olan COVID-19 pandemisinde ARDS ve pnömoni gelişen ağır hastalarda ve çoklu organ yetmezliği riski bulunan hastalarda meydana gelen sitokin fırtınasını dindirmeye ve hasarlı dokuları yenilemeye yönelik Türkiye dahil olmak üzere tüm dünyada kullanımları söz konusu olup, klinik araştırmalar devam etmekte (U.S. National Library of Medicine; 2024) ve etkili sonuçların alındığı raporlar, etki faktörü yüksek dergilerde yayınlanmaktadır (Leng vd., 2020; Zhang vd., 2020; Hashermian vd., 2021; Atluri vd., 2020; Rogers vd., 2020; Zayed & Iohara, 2020; Lanzoni vd., 2020; Gentile & Sterodimas, 2020; Croci vd., 2021; Efimenko vd., 2021; Kaffash vd., 2021). Bu tedavide amaç;

1) Yoğun bakıma alınan ve tedaviye direnç gösteren hastalara MKH nakli yaparak immun modülasyon sağlamak ve sitokin fırtınasının doku ve organlara verdiği zararı azaltmak,

2) Hastalarda görülen immunsupresyonu düzeltmek ve $CD4^+$ T, $CD8^+$ T hücre düzenlemesi yaparak COVID-19 virüsü ile mücadeleyi arttırmak,

3) MKH'ler aracılığıyla büyüme faktörlerini arttırarak oluşan organ hasarında iyileşmeyi hızlandırmaktır.

MKH'lerin diğer uygulama alanları ise,

• Diyabet gibi otoimmun hastalıklar (Huang vd., 2021; Gomes vd. 2021),

• Spinal kord hasarı, travmatik beyin hasarı, hipoksik ensefalopati, serebral palsi gibi travma ile ilişkili hastalıklar (Kabataş vd., 2020; Kabatas vd., 2021; Kabatas vd., 2021),

• Freidreich ataksisi, Duchenne Musküler Distrofi (DMD), kistik fibrozis, gibi genetik tabanlı hastalıklar (Sun & Karaöz 2020; Dai vd., 2018; Jones vd., 2015),

Pulmoner Fibrozis gibi idiyopatik (nedeni bilinmeyen) hastalıklar (Chuang vd., 2018; van Geffen vd., 2021; Feng vd., 2021; Schiess vd., 2021) veya

• Yaşam tarzı ve çevresel koşullara bağlı gelişen Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) (Hoang vd., 2021; Glassberg vd., 2021) gibi hastalıklar sıralanabilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deney Grupları

Bu tez çalışmasında günümüzde klinik uygulamalar için son ürün haline getirilen WJ- MKH'lerdeki farklı son ürün profillerinin (farklı serilerden elde edilen son ürünlerin) ayrıntılı analizlerine odaklanılmıştır. Bu amaçla;

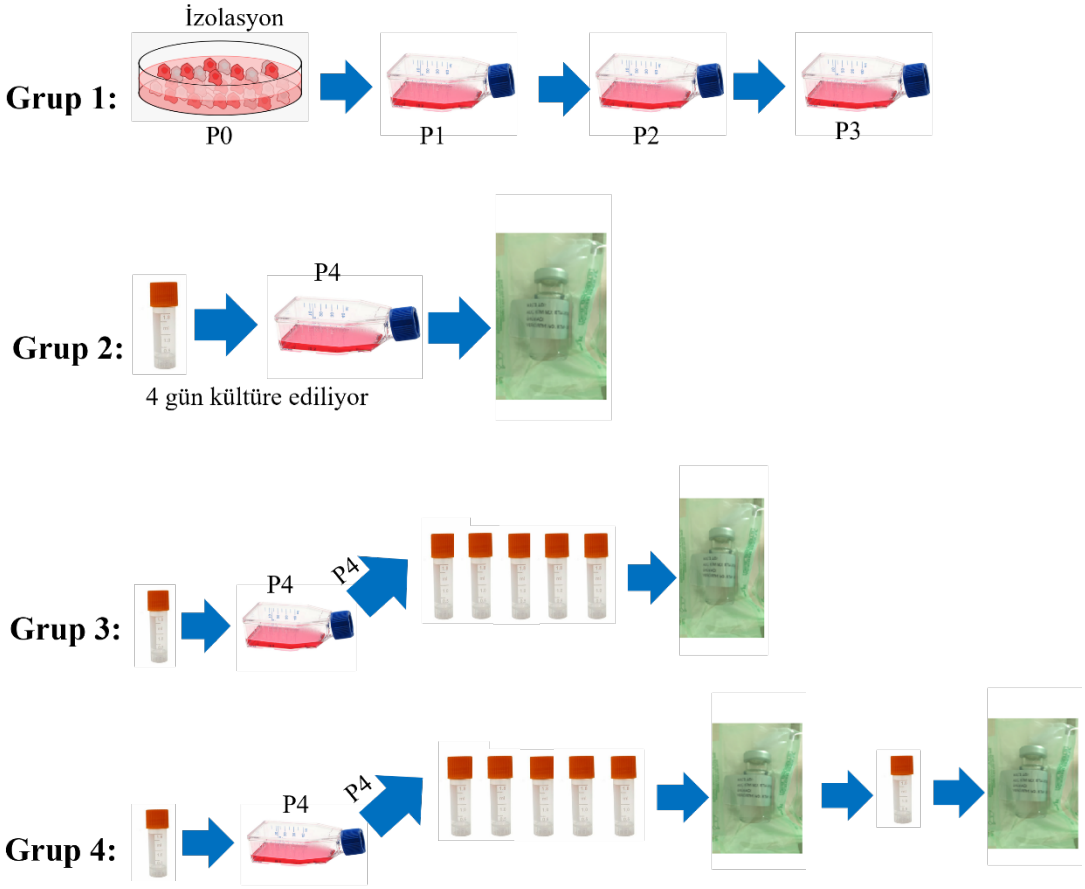
4 farklı son ürün deney grubu (Şekil 3.1.) olarak kullanılmıştır. Bu gruplar:

Grup 1: İzole edilen hücreler P3'e kadar kültüre edilmiş ve P3'te son ürün olarak planlanan tüm analizler (kalite kontrol ve karakterizasyon) gerçekleştirilmiştir (pozitif kontrol).

Grup 2 (Taze/fresh) son ürün) (Çözme sonrası kültür): P3'te dondurulan (1 ay) hücreler, analizlerin planlandığı günden 4 gün öncesinde çözdürülerek 4 gün kültüre edilmiş ve P4'te son ürün olarak hazırlanmış ve planlanan tüm analizler gerçekleştirilmiştir.

Grup 3 (Çözme sonrası direkt son ürün): P4'te dondurulan hücreler, analizlerin planlandığı günde çözdürülerek son ürün olarak hazırlanmış ve planlanan tüm analizler gerçekleştirilmiştir.

Grup 4 (Dondurulup çözdürülerek son ürün haline getirilmiş ancak çeşitli nedenlerle kullanılamadığından tekrar dondurularak saklanan ve ilerleyen süreçte tekrar çözdürülerek hazırlanan son ürün): P4'te dondurulan hücreler, analizlerin planlandığı günde çözdürülerek son ürün haline getirilmiş (Grup 3) ve hemen ardından tekrar dondurulmuştur. Bu hücreler tekrar 1 ay sonra çözdürülerek son ürün haline getirilmiş ve planlanan tüm analizler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 1. Deney gruplarının şematik gösterimi

3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

3.1.1. İİU koşulları altında insan Wharton jeli kökenli mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve kültürü

Bu tez çalışmasında kullanılan insan WJ-MKH'ler, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 14 Aralık 2021 tarih ve 33 Karar numaralı etik onayı kapsamında sağlıklı gönüllü onam formu alınarak insan hücre hattı olarak izole edilmiş ve *in vitro* kültüre edilmiştir. Bu tez çalışması Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Kök Hücre AD ve Hücresel Tedavi, Kök Hücre Üretim, Uygulama ve Araştırma Merkezi, ESTEM ve STEMBIO Kordon Kanı, Hücre ve Doku Bankası alt yapısında ortaklaşa gerçekleştirilmiştir.

Donör kabul kriterlerine uygun bulunan (35 yaş altı, sağlıklı, seroloji test sonuçları uygun bulunan) vericilerden sezeryan doğum sonrası alınan, steril koşullarda ve uygun sıcaklıkta laboratuvara transferi sağlanan göbek kordonu ham dokusu aynı gün izolasyon işlemine alındı. Dokudan hücre izolasyonu işlemi için steril

biyogüvenlik kabini (Laminar air flow-class II: LAF) (Telstar, Barselona, İspanya) içerisinde eksplant kültür yapıldı. Bu amaçla doku, transfer solüsyonundan pens yardımı ile alınarak petri kaplarına aktarıldı ve Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen Fosfat Tamponlu Salin (dPBS) 1x (Biological Industries, İsrail) ile yıkandı. Kan damarları ayrıldı ve doku yaklaşık 1 cm^3 boyutlarında küçük parçalara ayrıldı. Bu parçalardan boyuna kesi açılarak Wharton Jeli olarak bilinen bağ doku kısmı kültür kabına bakacak şekilde 60 mm'lik petri kapları içerisine yerleştirildi, yaklaşık 5 dakika (dk) kurumaları beklendikten sonra doku parçaları üzerine yavaşça dokuları kaldırmadan besi yeri eklendi. Bu çalışmada, %2 insan serumu (human AB serum, SeraCare, ABD), %0,5 100 U/mL Penisilin, 100 µg/mL Streptomisin (Biological Industries, İsrail) içeren MSC NutriStem XF bazal besi yeri (Biological Industries, İsrail) ve %0,6 MSC NutriStem XF Supplement Mix (Biological Industries, İsrail) ile taze olarak hazırlanan besiyeri tüm üretim basamaklarında kullanıldı.

Hücreler %5 $C0_2$ içeren 37°C sıcaklıktaki inkübatöre (Panasonic, MCO-19M-PE, Osaka, Japonya) kaldırılarak kültüre edildi. 72 saat sonunda dokulardan çıkan hücrelerin kontrolü mikroskop (Carl Zeiss, Axio Lab.A1, Almanya) altında yapılarak besiyeri değişimi yapıldı. Her 4-5 günde bir besiyeri değişimi (idame) yapıldı. İzolasyon sonrası çıkan hücrelerin morfolojisi günlük olarak mikroskop altında gözlemlendi.

Hücrelerin petri kabını yaklaşık %70-80 oranında kaplaması (%70-80 konfluent olması) gözlendikten sonra göbek kordonu eksplantları atılarak hücreler pasajlandı. Pasajlama işlemi için ilk olarak besi yeri petriden tamamen uzaklaştırıldı ve petri yüzeyini kaplayacak kadar Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen dPBS 1x (Biological Industries, İsrail) ile yıkandı. Ardından PBS çekilerek uzaklaştırıldı. Önceden ısıtılmış olan tripsin/EDTA (Biological Industries, İsrail) yüzeyi kaplayacak kadar eklendi ve 3 dk boyunca 37°C'lik inkübatör içerisinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında flasklar inkübatörden alınarak tüm hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı mikroskop altında gözlemlendi. Süspanse hale gelmiş olan tüm hücreler insan serumu (human AB serum) ile çekilerek 50 mL konik dipli santifüj tüpü içine toplandı. 400xg'de 5 dk santrifüj (Hettich, Rotofix 32A, Almanya) yapıldı ve santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet besiyeri ile sulandırılarak hücre sayımı yapıldı. Hücreler aynı şekilde pasajlanarak pasaj 3 (P3)'e kadar uygun kültür kaplarına ekilerek çoğaltıldı.

İzole edilmiş ve kültüre edilerek çoğaltılmış hücrelerin morfolojisi günlük olarak mikroskop altında gözlemlenerek fotoğraflandı (Aydoğdu vd., 2020).

Hücreler rutin olarak her pasaj sırasında otomatik hücre sayım cihazı ADAM-CellT (NanoEnTek, Seul, Güney Kore) ile sayıldı. Sayım sonuçlarına göre hücreler uygun sayıda petri kabına ekilerek kültüre edildi ve/veya dondurularak saklandı. Her pasaj sonrasında hücreleri yedeklemek ve stok oluşturmak amacıyla, hücreler dondurularak saklandı.

3.1.2. Hücrelerin dondurularak saklanması ve çözdürülmesi

Her pasaj sonrasında hücreleri yedeklemek ve stok oluşturmak amacıyla, hücre dondurma işlemi gerçekleştirildi. P3'e kadar getirilen hücreler yapılacak olan analizler için verilen örneklerden sonra -196°C sıvı azot tankında kademeli olarak donduruldu. Bu amaçla pasajlama işlemi sonrası yapılan santrifüj aşamasından elde edilen pellet üzerine yavaş bir şekilde damlalar halinde dimetilsülfoksit (DMSO) içeren dondurma solüsyonu konularak hücreler 2mL ya da 5mL kriyotüplerde (Corning, ABD) en fazla $3x10^6$/mL olacak şekilde donduruldu (Aydoğdu vd., 2020).

1 ay sonra kriyotüpler sıvı azot tankından çıkarılarak 37°C su banyosu (Nüve, NB20, Türkiye) içinde hafifçe çalkalanarak çözdürüldü. Ardından, içinde PBS ve %10 insan serumu (human AB serum) bulunan konik dipli santifüj tüpüne alınıp 400xg'de 5 dk süresince santrifüj sonrası pellet elde edildi. Pellet PBS ile resüspanse edilerek işlem tekrarlandı.

- Bu aşamada hücreler üzerinde planlanan deneyler gerçekleştirilecekse; (hücreler son ürün olarak hazırlanacak ise) son yıkama işlemini takiben 2 kez daha PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Son santrifüjden elde edilen pellet, serum fizyolojik (SF) ile uygun hacme getirilerek flakona aktarıldı.

- Eğer çözülen hücreler taze (fresh) son ürün hazırlama amacıyla kullanılacaksa hücre kaplarına ekim için uygun sayıda hücre seyreltilip *in vitro* kültür işlemine alındı. Dört gün kadar kültüre edilen hücreler deneylerin planlandığı gün, tripsinizasyon işlemi ile kültür kaplarından kaldırıldı ve PBS ile yıkandı. Son ürün haline getirilmeden önce iki kez daha SF ile yıkandı. Son santrifüjden elde edilen pellet, SF ile uygun hacme getirilerek flakona aktarıldı.

3.2. Hücreler Üzerinde Yapılan Analizler

3.2.1. Morfolojik analizler

İzolasyondan 72 saat sonra dokulardan genişleyen hücreler mikroskop altında incelendi ve fotoğrafları çekildi. Mikroskobik incelemeler günlük olarak yapıldı ve gözlenen hücreler her pasajda mikroskop altında fotoğraflandı.

3.2.2. Akım sitometri ile immunfenotipleme

Pasaj 3'e başarıyla getirilen hücrelerde, ilk olarak hücrelerin immunfenotipik özelliklerinin karakterize edilmesi amacıyla akım sitometri cihazı kullanılarak hücreler analiz edildi.

En az $3x10^6$ hücre akım sitometri analizleri için ayrıldı. Pozitif, negatif ve kontrol olmak üzere üç sitometri tüpü hazırlandı ve her tüpe 100 µL olacak şekilde hücreler paylaştırıldı. Bu amaçla kontrol (İzotip Kontrol, Pozitif & Negatif), pozitif kokteyl (CD90, CD44, CD73, CD105) ve negatif kokteyl (CD14, CD79a, CD34, CD45, CD11b, CD19, HLA-DR) antikorlarını içeren antikorlar (CD73: BD, ABD; diğer antikorlar: Beckman Coulter, ABD) kullanıldı (Okur vd., 2018).

Hücrelerde analiz edilen pozitif ve negatif belirteçler ile belirlenen spesifikasyon limitleri Tablo 3.1.'de sunulduğu gibidir:

Tablo 3. 1. Elde edilen hücrelerde akım sitometri yöntemi ile bakılan yüzey belirteçleri ve spesifikasyon limitleri (Dominici vd., 2006).

	Yüzey Belirteci	Spesifikasyon Limitleri
Pozitif Belirteçler	CD90 FITC	≥ %95
	CD105 PC7	≥ %95
	CD44 PE	≥ %95
	CD73 APC	≥ %95
Negatif Belirteçler	HLA-DR	≤2
	CD14	≤2
	CD11b	≤2
	CD34	≤2
	CD19	≤2
	CD45	≤2
	CD79a	≤2

Her bir tüpe 100µL örnek eklendi, ilgili antikorlardan 2 µL her bir örneğin üzerinde eklendi ve karanlıkta 15 dk inkübe edilerek antikorların hücre yüzey antijenleri ile bağlanmasını sağlandı. Antikor ile bağlanma aşamasından sonra örnek üzerine 1mL PBS eklendi ve 400xg'de 5dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve işlem tekrar edildi. Pellet 1mL PBS içerisinde çözüldü. Antikorlarla inkübasyonun ardından hücreler Beckman Coulter Navios (Beckman Coulter, ABD) üzerinde Navios Kaluza Yazılım programı kullanılarak analiz edildi.

Akım sitometri analiz sonuçlarına göre uygun bulunan hücreler, deney gruplarını oluşturmak üzere çoğaltılmaya devam edildi. P3'te dondurularak saklanan hücrelerden çözülerek kültüre alındı ve dört gün boyunca kültüre edildi (Grup 2). P4'e getirilen bu hücrelerden aynı şekilde immunfenotipik analiz gerçekleştirildi.

P4'teki hücreler diğer bir deney grubu olan "dondurulup çözdürülerek hazırlanan son ürün"lerin (Grup 3) hazırlanması amacıyla uygun koşullarda dondurularak saklandı. 1 ay sonra kriyotüpler sıvı azot tankından çıkarılarak 37°C su banyosu içinde hafifçe çalkalanarak çözüldü. Çözülen hücreler hiç kültüre alınmadan direkt son ürün haline getirilerek immunfenotipik analiz gerçekleştirildi.

P4'teki hücreler diğer bir deney grubu olan "dondurulup çözdürülüp ardından tekrar dondurulan ve daha sonrasında çözdürülüp hazırlanan son ürünlerin (Grup 4) immunfenotipik analizini gerçekleştirmek için 1 ay sonra kriyotüpler sıvı azot tankından çıkarılarak 37°C su banyosu içinde hafifçe çalkalanarak çözüldü. Çözülen hücreler hiç kültüre alınmadan direkt son ürün haline getirilerek immunfenotipik analiz gerçekleştirildi.

3.2.3. Gen ekspresyon analizi

Son ürünlerdeki pluripotensi, farklılaşma ve kök hücre özellikleri ile ilgili genlerin ekspresyon profillerinin analizi amacıyla gen ekspresyonu analizi gerçekleştirildi. Bu amaçla öncelikle deney gruplarını oluşturan son ürünlerden RNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. Hücreler 1:1 oranında PBS ile sulandırılarak 400xg'de 5 dk santrifüj edildi. Elde edilen pelletlere 350 mL Buffer RLT lizis solüsyonu eklenerek iyice pipetaj yapıldı ve 30 saniye (sn) vortekslendi (IKA, 4 Basic, Almanya). Ardından 2 mL'lik iç içe geçirilen filtreli toplama tüplerine geçirilip, 800xg'de 30 sn santrifüj edildikten sonra filtre atıldı ve tüpteki örneklere eşit miktarda (350 mL) %70'lik etanol eklendi. 700 mL'lik solüsyon spin kolona eklendi. 15 sn boyunca 800xg'de santrifüj edildi.700 mL yıkama solüsyonu eklendi, tekrar santrifüj edildi. Alttaki kısım atılmış ve filtre yeni 2 mL'lik tüpe alındıktan sonra 500 µL RPE yıkama solüsyonu eklenerek 2 dk boyunca 800xg'de santrifüj edildi. Alt kolon tamamen atılarak yeni kolon üstüne yerleştirildi. 1 dk 800xg'de santrifüj edilmiş ve ardından 50 µL RNAse-free water su eklendi, 3 dk kadar beklendi. Ardından tekrar 800xg'de 1 dk santrifüj edildi. Filtre atılarak altta kalan kısım cDNA sentezi için buz kutusuna alındı.

İzole edilen RNA miktarı spektrofotometrede (Biotek, Epoch 2, ABD) ölçüldü ve elde edilen RNA örneklerinden RT2 First Strand Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Her bir RNA örneği için; 4 µg RNA ve 2 µL Buffer GE kullanılarak DNA eliminasyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan DNA eliminasyon

karışımı 5 dk boyunca 42ºC'de, sonrasında ise 1 dk buz üzerinde inkübe edildi. Eş zamanlı olarak ters- transkriptaz (revers-transkriptaz: RT) solüsyonu (her bir örnek için: 4 µL 5x Buffer BC3, 1 µL Control P2, 2 µL RE3 Reverse Transkriptaz Mix, 3 µl RNase free water hazırlandı. 10 µl DNA eliminasyon karışımı içeren tüplere 10 µL RT solüsyonu eklenerek pipetaj yapıldı. 42ºC'de 15 dk ve ardından 95ºC'de 5 dk boyunca örnekler inkübe edildikten sonra reaksiyon durduruldu. cDNA ölçümü yapıldı.

Elde edilen cDNA örnekleri Tablo 3.2.'de listelenen genlere ait primerler kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) protokolüne göre Roche Light Cycler 480 (Roche, İsviçre) cihazında amplifiye edildi. Ct değeri 30'dan düşük olan genlerde güçlü pozitiflik, 30-35 arası olan genlerde pozitif ve 36-40 arası olan genlerde ise zayıf ekspresyon olduğu kabul edildi. Gen ekspresyonları arasındaki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-}\Delta\Delta CT$ metodu kullanıldı (Antebi vd., 2019).

Tablo 3. 2. RT- PCR analizinde kullanılan genler

Stemness İlişkili Genler	**MKH Spesifik Genler**	**MKH ile İlişkili Genler**	**Farklılaşma ile İlişkili Genler**	
POU5F1	HLA-G	NES	BMP 2 (Osteogenez, Kondrogenez, Tenogenez ve MKH Spesifik)	BMP4 (Kondrogenez)
NANOG	CD44	ICAM1	SMURF1 (Osteogenez)	JAG1 (Miyogenez)
ZFP42	ENG	VIM	BMP6 (Osteogenez)	RUNX2 (Osteogenez, Adipogenez)
SOX2	VCAM1	TNF	SMURF2 (Osteogenez)	COL1A1
TERT	THY1	VEGFA	**Housekeeping ve Negatif Kontrol**	
-	-	-	LDHA (Housekeeping)	Actin (Housekeeping)
-	-	-	HLA-DR (-Kontrol)	

3.2.4. Tümörojenite analizi (Telomeraz enzim aktivitesi)

Son ürünlerin tümörojenitesinin kontrolü için yapılması gereken telomeraz enzim aktivitesi tayini analizi için RT-PCR ve ELISA olmak üzere iki aşamadan

oluşan ‘Telo TAGGG PCR ELISA Plus’ (Roche, ABD) kiti kullanıldı (Jiang vd., 2017). Her reaksiyon için $3x10^6$ hücre kullanıldı.

3.2.4.1. Çalışma solüsyonlarının hazırlanması

Öncelikle kit içerisinden çıkan çalışma solüsyonları hazırlandı.

Çalışma solüsyonları kullanılmadan önce Anti-DIG-POD ve Pozitif Kontrol Hücre Ekstraktı hızlıca santrifüj edilerek karıştırıldı. Solüsyonlar Tablo 3.3.’te anlatıldığı şekilde hazırlandı.

Tablo 3. 3. Çalışma solüsyonlarının hazırlanması

İçerik	Hazırlama
Yıkama Solüsyonu 1 x	250µL 10x buffer + 2,25mL dH_2O
Anti DIG-POD Stok Solüsyonu	Liyofizat + 240µL dH_2O
Anti DIG-POD Çalışma Solüsyonu	Anti DIG-POD Stok Solüsyonu + 11,76mL Konjugat Dilüsyon Solüsyonu
Pozitif Kontrol Hücre Ekstraktı	Ekstrakt + 20µL dH_2O

3.2.4.2. Hücrelerden protein ekstraktının hazırlanması

Bunun için daha önceden -80°C derin dondurucuda saklanmakta olan örnekler çözüldü. 20 mL Ca^{+2} Mg^{+2} içeren PBS eklendi ve 3000xg’de +4ºC’de 5 dk santrifüj edildi. Pelet yoğunluğuna göre 200-400 µL önceden buzda soğutulmuş Lysis Reagent eklendi ve eppendorf tüpler içerisinde buz üzerinde yerleştirilerek 30 dk bekletildi. Bu sürenin sonunda örnekler 16000xg’de 20 dk soğutmalı santrifüjde (+1ºC) (Beckman Coulter, Microfuge 20R, ABD) santrifüj edildi. Supernatant yeni bir eppendorf tüpe alındı ve 280 nm’de protein ölçümü yapıldı.

3.2.4.3. TRAP (PCR)

Öncelikle negatif kontroller hazırlandı. Her bir örnek için 25µL reaksiyon karışımı ve 5µL Internal Standart (IS) ayrıldı. Analizi yapılacak örneklerden tüplere 3'er µL ilave edildi (0,5-10µg total protein).

• Kontrol template: 1µL control template

• Blank: 1µL lysis buffer

• Nükleaz içermeyen H2O ile 50µL ye tamamlanır.

Örnek, negatif kontrol ve pozitif kontrolün hazırlanışı Tablo 3.4.'te özetlendiği şekilde yapıldı.

Tablo 3. 4. TRAP analizi için örnek ve kontrollerin hazırlanışı

Solüsyon	Örnek	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol
Hazırlanmış hücre ekstraktı	1-3µL	-	-
Isıyla muamele edilmiş hücre ekstraktı	--	1-3µL	-
Pozitif kontrol hücre ekstraktı		-	1-3µL
Reaksiyon karışımı	25µL	25µL	25µL
PCR Water	22-24µL	22-24µL	22-24µL

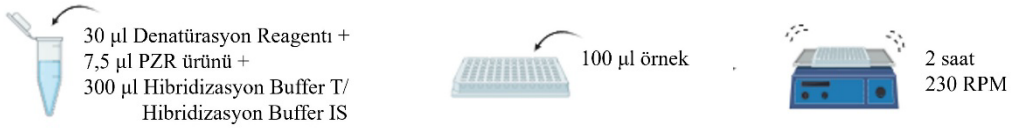
Termal döngü cihazında (Biorad, T100, ABD) 185°C'de 10 dk denatüre edildi. Ardından tüm tüpler bir tur spin cihazında (Ohaus, Frontier 5306, ABD) çevrildi ve termal döngü cihazına yerleştirilerek Tablo 3.5.'te belirtildiği şekilde inkübe edildi.

Tablo 3. 5. Telomeraz enzim aktivitesi için PCR amplifikasyon programı

İşlem	Zaman	Sıcaklık	Döngü
Primerleri Uzatma	20 dk	25°C	1
Telomeraz İnaktivasyonu	5 dk	94°C	1
Amplifikasyon:			30
Denatürasyon	30 sn	94°C	
Annealing	30 sn	50°C	
Polimerizasyon	90 sn	72°C	
Son uzatma	10 dk	72°C	1
Bekleme	-	4°C	-

3.2.4.4. Elisa aşaması

4 deney grubu için ayrı ayrı pozitif ve negatif tüpler ve ayrıca blank ve LC için tüpler hazırlandı. Konulacak solüsyonların miktarı 3 tekrarlı olacak şekilde belirlendi. 1 tane blank, 1 tane LC ve her bir deney grubu için bir pozitif bir de negatif tüp hazırlandı. Blank için Hibridizasyon Buffer T kullanılırken diğer tüpler için Hibridizasyon Buffer T ve Hibridizasyon Buffer IS konulacak şekilde ikişer tüp hazırlandı. Hazırlanan her bir örnekten 100 µL mikro plakanın kuyucuklarına dağıtıldı ve buharlaşmayı önlemek için kendi yapışkanlı bandı ile gözler dikkatlice kapatıldı. 2 saat 320 RPM çalkalayıcı plaka üzerinde 37ºC inkübatör içerisinde inkübe edildi (Şekil 3.2.).



Şekil 3. 2. Elisa aşaması için örnek tüplerinin hazırlanması

Bu sürenin sonunda süpernatant atılarak üzerlerine 250 µL 1X yıkama solüsyonu eklendi ve 3 kez bu işlem tekrarlanarak yıkama işlemi yapıldı. HRP çalışma solüsyonu hazırlandı ve her bir kuyucuğa 100 µL eklendi. Kuyucuklar kendi yapışkanlı bandı ile

kapatıldı ve oda sıcaklığında 320 RPM çalkalayıcı plaka üzerinde 30 dk inkübe edildi. Bu sürenin sonunda kuyucuklardaki solüsyon dikkatlice uzaklaştırıldı. 250 µL yıkama solüsyonu eklenerek 5 kez yıkama işlemi yapıldı. Her bir kuyucuğa 100 µL TMB substrat solüsyonu eklendi ve 10 dk oda sıcaklığında 320 RPM çalkalayıcı plaka üzerinde inkübe edildi. İşlemi durdurmak için her bir kuyucuğa 100 µL stop solüsyonu eklendi. Plaka okuyucuda 450 nm ve 690 nm'de her bir kuyucuğun absorbans değerleri ölçüldü.

3.2.4.5. Hesaplama ve değerlendirme

Hesaplama işlemi için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$RTA = \frac{(A_s - A_{s,0})/A_{s,IS}}{(A_{TS8} - A_{TS8,0})/A_{TS8,IS}} \times 100$$

As: Örneğin Absorbansı

$A_{s,o}$: Negatif Kontrolün Absorbansı

$A_{s,IS}$: İnternal Standartlı Örneğin Absorbansı

A_{TS8}: Kontrol Kalıbın Absorbansı

$A_{TS8,0}$: Lizis Solüsyonunun Absorbansı

$A_{TS8,IS}$: İnternal Standartlı Kontrol Kalıbın Absorbansı

Sonuçlar Tablo 3.6.'ya göre değerlendirildi.

Tablo 3. 6. Telomeraz enzim aktivitesi sonuçlarının değerlendirilmesi

	Absorbans Sonucu	**Değerlendirme**
Negatif Kontrol	$\leq 0{,}1$ ($A_{450nm} - A_{690nm}$)	0,1'den yüksekse deney tekrarlanır.

Tablo 3. 6. (Devam) Telomeraz enzim aktivitesi sonuçlarının değerlendirilmesi

	Absorbans Sonucu	Değerlendirme
Pozitif Kontrol	Low Control (LC) RTA = 0,3-0,8 arası ($A_{450nm} - A_{690nm}$)	Bu aralıkta değilse deney tekrarlanır.
	High Control (HC) RTA = 2-4 arası ($A_{450nm} - A_{690nm}$)	Bu aralıkta değilse deney tekrarlanır.
Örnek	$RTA = \frac{(A_s - A_{s,0})/A_{s,IS}}{(A_{TS8} - A_{TS8,0})/A_{TS8,IS}} x100$	Örnek RTA değeri < LC RTA değeri ise örneğin telomeraz enzim aktivitesi salıverilmesi için uygundur.

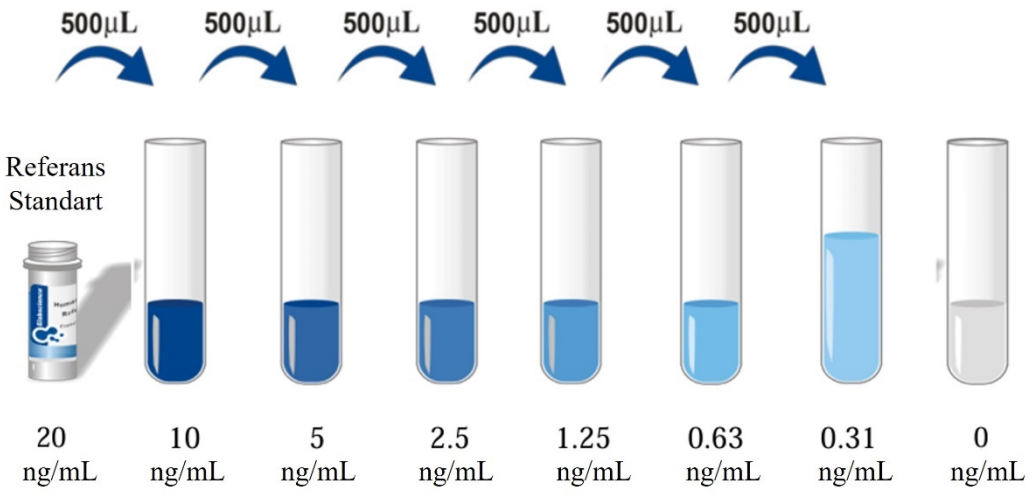
3.2.5. Potansi analizi (Parakrin sekresyonu)

Son ürün haline getirilen MKH'ler, $2x10^5$/göz olacak şekilde 6-gözlü petriye kültür besiyerinde rekombinant insan IFN-ɣ (100 ng/mL; 2000 IU) (Miltenyi Biotech, Almanya) varlığında ve yokluğunda 4 gün boyunca kültüre edildi ve bu sürenin sonunda kondüsyonlanmış besiyeri toplanarak analiz edilmek üzere -80ºC derin dondurucuda (Arctiko, Danimarka) saklandı (Gramlich vd., 2016).

ELISA analizinin gerçekleşeceği gün, örnekler çözdürüldü. Hücreler tarafından besiyerine salgılanan IDO, PGE2, HGF ve TGF-β1 proteinlerinin (Moll vd., 2016) analizinin yapılabilmesi için IDO, PGE2, HGF ve TGF-β1 ELISA kitleri (Elabscience, ABD) kullanıldı. Analizler üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi. Öncelikle reaktifler hazırlandı:

Yıkama Tamponu: 750 mL yıkama tamponu hazırlamak için 30 mL konsantre yıkama tamponu 720 mL distile su ile seyreltildi.

Standart çalışma çözeltisi: Standart 10000×g'de 1 dk santrifüjlendi. 1 mL Referans Standart ve Numune Seyreltici eklenerek 20 ng/mL'lik bir çalışma çözeltisi oluşturuldu. Ardından 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31 0 ng/mL olacak şekilde seri seyreltmeler yapıldı (Şekil 3.3.).



Şekil 3. 3. Standart çalışma çözeltisinin hazırlanmasına ilişkin şematik gösterim (Elabscience Kullanım Kılavuzundan alınmıştır)

Standart, blank ve örneklerin her bir dilüsyonu uygun kuyucuklara 100 µL olacak şekilde eklendi. Plaka kendinden yapışkanlı bant ile kapatıldı. 37°C'de 90 dk boyunca inkübe edildi, inkübasyon sonunda her bir kuyucuktan solüsyonlar boşaltıldı. Her bir kuyucuğa hemen 100 µL Biyotinlenmiş Detection Ab çalışma solüsyonu eklendi. Kuyucuklar tekrar kendinden yapışkanlı bant ile kapatıldı. 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Her bir kuyucuktan solüsyon boşaltılarak 350 µL yıkama solüsyonu her bir kuyucuğa eklenerek 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Her bir kuyucuğa 100 µL HRP Konjugat çalışma solüsyonu eklendi. 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Her bir kuyudan çözelti uzaklaştırıldı ve 5 kez yıkama işlemini gerçekleştirildi. Her bir kuyucuğa 90 µL Substrat Reaktifi eklenerek 37°C'de 15 dk inkübe edildi Sürenin sonunda her bir kuyucuğa 50 µL Durdurma Solüsyonu eklendi. Plaka okuyucuda 450 nm'de her bir kuyucuğun absorbans değerleri ölçüldü.

3.2.6. Apoptoz analizi

APC-konjuge Annexin V (Tonbo Bio, ABD) ve PI (Cayman Chemical, ABD) boyaması, popülasyondaki aktif olarak apoptoz geçiren hücrelerin yüzdesini belirlemek için kullanılmıştır (Tablo 3.7.). Annexin V, Ca^{+2}-bağımlı fosfolipid bağlama özelliği olan bir proteindir ve fosfotidilserine yüksek afinitesi vardır. Böylece apoptozu belirlemede etkilidir. PI ise akım sitometri analizlerinde canlı hücreleri canlı olmayandan ayırma da kullanılan non-vital bir boyadır.

Tablo 3. 7. Annexin V-PI boyama sonuçlarının yorumlanması

Annexin V	**PI**	**Sonuç/Yorum**
Pozitif	Negatif	Erken apoptotik
Pozitif	Pozitif	Geç apoptotik-Ölü
Negatif	Pozitif	Nekroze
Negatif	Negatif	Canlı

Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin membranları intakt (erken apoptozda) olmasına rağmen daha ileri dönemlerde geç apoptozis/sekonder nekrozun gelişmesi ile hücrelerin membran bütünlükleri bozulmaktadır. Sekonder nekroz aşamasına kadar olan süre içinde hücreler non-vital boyalar denilen (PI) boyalar ile boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olmasına rağmen membran intakt olmasından dolayı bu boyalarla boyanamazlar. Sekonder nekroz geliştikten sonraki aşamalarda hücreler membran bütünlüklerinin bozulması ile non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar. Zar bütünlüğü bozulmuş hücrelerde (geç apoptotik; nekrotik) çift zincirli DNA'nın GC bakımından zengin bölgelerine bağlanmaktadır (Güleş & Eren, 2008).

Kısaca, hücreler %1 sığır serum albümini (BSA) içeren PBS'de yıkandı. Ardından, hücreler $3x10^6$/mL hücre konsantrasyonunda 1X Annexin bağlama tamponunda yeniden süspanse edildi ve daha sonra karanlıkta Annexin V-APC ile 10 dk inkübe edildi. Hücrelere PI eklendi ve hemen ardından numuneler Agilent NovoCyte D3005 standart konfigürasyon (Agilent, ABD) akım sitometri cihazında analiz edildi (Luo vd., 2020; Ma vd., 2019). Hücre fragmentleri morfolojik kapılama ile dışlandı. Sonuçlar Tablo 3.7.'ye göre yorumlandı.

3.2.7. Hücre döngüsü analizi

Son ürünlerin akım sitometrik analizi ile anormal DNA içeriğinin varlığı tespit edilmiş ve bu DNA indeksinin hücre döngüsü faz dağılımları belirlenmiştir. Hücre döngüsünün G1, S ve M fazlarında hücre dağılımı farklı olduğundan, DNA içeriği hücrenin fazını belirlemek için de kullanılmıştır. Hücre zarı iyonik olmayan deterjanlarla bozulmuş, hücre iskeleti ve nükleer proteinler tripsin ile ortadan

kaldırılmış ve hücresel RNA enzimlerle sindirilmiştir. Nükleer kromatin poliaminler ile stabilize edilmiştir.

Bu amaçla, hücreler dPBS ile iki kez yıkandı ve %70 etanol ile 4°C'de 30 dk boyunca fikse edildi. 300xg'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti %0,1 BSA içeren dPBS ile iki kez santrifüj edilerek yıkandı. Hücreler 500 µL dPBS-BSA içinde süspanse edildi, 30 dk boyunca 0,5 mg/mL RNAse A Solüsyonu (kat no: 10009959; Cayman Chemical, ABD) ile muamele edildi. Ardından 37°C'de 30 dk boyunca 50 µg/mL PI (kat no: 10008351 Cayman Chemical, ABD) ile boyandı (Batsali vd., 2017).

PI ile boyanmış DNA içeriği, Agilent NovoCyte D3005 standart konfigürasyon (Agilent, ABD) akım sitometri cihazında ölçüldü. Farklı hücre döngüsü aşamalarındaki hücrelerin dağılımı, yazılım programında bulunan model kullanılarak analiz edildi.

3.2.8. CFSE ile canlılık ve proliferasyon analizi

Hücrelerin canlılığını ve proliferasyonunu belirlemek için son ürünler akım sitometri yöntemi ile analiz edildi. İşaretleme için 10µm "5-(ve -6)-karboksifluorescein diasetat süksinimidil ester" (CFSE) (kat no: 13-0850; Tonbo Bio, ABD) boyası kullanıldı. Bir hücredeki boya miktarı mitoz sırasında yavru hücreler arasında eşit olarak bölünür, böylece her yavru hücre ebeveynin yarısı kadar boya içerecek ve bu nedenle yarısı kadar parlak olacaktır (Urbani vd., 2006; Hsu vd., 2015). Bu amaçla; hücreler 10 dk boyunca boya ile muamele edildi ve 37ºC'de inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler 300xg'de 5 dk santrifüj edildi ve ardından PBS'de iki kez yıkandı. Hücreler her gün tripsin ile kültür kaplarından kaldırıldı ve 4 gün boyunca analiz edildi (Analiz kültürün her günü tekrarlandı). Takip eden günlerdeki analizler, boya dağılımının ilk gün (zaman noktası 1) tanımlananla karşılaştırılmasıyla gerçekleştirildi. Hücreler Agilent NovoCyte D3005 standart konfigürasyon (Agilent, ABD) akım sitometri cihazında analiz edildi.

3.2.9. Popülasyon ikiye katlama analizi

Popülasyon ikiye katlamaları daha önce Cristofalo ve ark. tarafından açıklanan formül kullanılarak hesaplandı (Cristofalo vd., 1998):

$2n = N_x/N_0$

N_x: tripsinizasyondan sonra sayılan hücre sayısı

N_0: başlangıçta ekilen hücre sayısı

Bu amaçla, hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına $2x10^5$/kuyucuk hücre olacak şekilde ekildi ve %80 konfluensiye ulaşan hücreler tripsinizasyon ile kültür kaplarından kaldırılarak sayıldı. 3 tekrarlı yapılan çalışma ile her bir deney gurubundaki hücrenin ulaştığı sayının ortalamaları alınarak hesaplama yapıldı.

3.2.10. Büyüme faktörü analizi

Hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına $2x10^5$/kuyucukta 4 gün boyunca kültürlenmiştir. Kondüsyonlanmış besiyeri deneyin son gününde toplandı, analiz edilmek üzere -80ºC derin dondurucuda saklandı. ELISA analizinin gerçekleşeceği gün, örnekler çözdürüldü. Hücreler tarafından besiyerine salgılanan VEGF, HGF, FGF-2, Angpt-1 ve PEDF proteinlerinin (Sagaradze vd., 2019) seviyelerinin ölçülebilmesi için VEGF, HGF, FGF-2, Angpt-1 ve PEDF ELISA kitleri (Elabscience, ABD) kullanıldı. Analizler üretici firmanın talimatlarına göre ve 3.2.5. başlığında anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Reaksiyonların sonlandırılmasının ardından örnekler bir mikroplaka okuyucu (BioRad Laboratories, ABD) ile 450 nm'de ölçüldü.

3.2.11. *In vitro* yara iyileşmesi deneyi

İn vitro yara iyileşmesi deneyi için, hücreler $2x10^5$/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve hücrelerin yapışıp %100 konfluent olmasına izin vermek için 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO_2 inkübatörde kültüre edildi. Bu birleşik tek tabaka daha sonra steril bir pipet ucuyla yaklaşık 0,4-0,5 mm genişliğinde bir çizik bırakacak şekilde işaretlendi ve böylece hücreler arasında hücrelerin göç etmesini ve yarayı iyileştirmesini sağlamak amacıyla bir boşluk oluşturuldu. Kültür ortamı daha sonra hemen yenilenerek yerinden oynamış hücreler uzaklaştırıldı. Hücreler 48 saat boyunca çoğalma açısından izlendi ve JuLi (NanoEnTek Inc., Güney Kore) tezgâh üstü mikroskobu kullanılarak fotoğraflandı. Göç aktivitesi, Image J yazılımı (NIH, Bethesda, MD https://imagej.nih.gov/ij/) ile her zaman noktasında her bir kuyucukta hücreler tarafından kapatılan görüntünün göreceli alanı ölçülerek hesaplandı.

Hücrelerin çoğalmasını değil göç kapasitesini analiz etmek için, yara alanının ilk fotoğrafları daha önce Latifi-Pupovci ve arkadaşları tarafından tarif edildiği gibi 6 ve 12. saatlerde çekildi (Latifi-Pupovci vd., 2015). Bu sürenin ardından, hücreler 48 saat boyunca çoğalma açısından izlendi ve fotoğraflar 24 saat sonra çekildi. Yara

kapanmasını ölçmek için, daha önce Latifi-Pupovci ve arkadaşları tarafından tarif edildiği gibi tanımlanmış bir yüzey alanına sahip bir dikdörtgen tanımlandı ve bu, diğer zaman noktalarının tüm fotoğraflarına geçirildi (Latifi-Pupovci vd., 2015).

Yüzde kapanma tahmini, tanımlanan yara alanının yüzey alanının (toplam yüzey alanı) ve yara alanına göç eden hücrelerin yüzey alanının (göç eden hücre yüzey alanı) belirlenmesinden sonra yapıldı:

Toplam yüzey alanı = 0,5 mm x uzunluk;

Göç eden hücre yüzey alanı = Hücre göçünün uzunluğu (mm) x 2 x uzunluk,

Kapanma yüzdesi (%)= (Göç eden hücre yüzey alanı /Toplam yüzey alanı) x 100 olarak belirlendi.

3.2.12. Mikoplazma analizi

Mikoplazma analizi, PCR yöntemi ile EZ-PCR Mycoplasma Test Kit (Biological Industries, İsrail, kat no: 20-700-20) kullanılarak gerçekleştirildi. Hücrelerden 1 ml besi yeri örneği alındı ve 250xg'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 17.000xg'de 10 dk tekrar santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice pipetle çekildi ve oluşan pelletin üzerine 50 µL Buffer Solution ekleyerek pipetaj yapıldı. Bu karışım 95ºC'de 3 dk. inkübasyona bırakıldı. PCR karışımları Tablo 3.8.'teki miktarlar kullanarak hazırlandı.

Tablo 3. 8. PCR karışımlarının hazırlanması

	Örnek (Bilinen)	**Pozitif Kontrol**	**Negatif Kontrol**
PCR H_2O	35 µL	39 µL	40 µL
Reaksiyon Karışımı	10 µL	10 µL	10 µL
Örnek	5 µL	-	-
Pozitif Template	-	1 µL	-

Hazırlanan PCR örnekleri Tablo 3.9.'da verilen parametrelere göre çalışıldı:

Tablo 3. 9. Mikoplazma analizi için PCR amplifikasyon programı

Sıcaklık	Süre	Döngü
94^0C	30 sn	-
94^0C	30 sn	35 Döngü
60^0C	120 sn	
72^0C	60 sn	
94^0C	30 sn	-
60^0C	120 sn	-
72^0C	5 dk	-

PCR sonunda %2'lik agoroz jele 20 µL PCR ürünleri yüklendi ve yatay elektroforez sisteminde 4-10 V/cm olacak şekilde yürütüldü (Huo vd., 2020). Ardından yürütülen jel BIO-RAD Jel Görüntüleme Sisteminde (Bio-Rad, ABD) görüntülendi. Görüntülenen jeldeki bant profilini incelenerek örnekler pozitif ve negatif kontroller ile karşılaştırıldı.

3.2.13. Mikrobiyolojik kontrol

Sterilite testi yapılacak ham doku taşıma solüsyonundan, üretim sürecindeki ara üründen, üretim işlemlerini tamamlamış son üründen LAF kabin içerisinde 1 mL örnek sterilite testi amacıyla ayrıldı. Bu örnek dikkatli bir şekilde bir şırınga yardımı ile Bactec FX PedsPlus ve Bactec FX Anaerobik şişelerine yüklendi.

Bactec FX (BD, ABD)'e yüklenen şişe, 5 gün boyunca cihaz içerisinde 37ºC'de inkübe edildi. Bactec FX, 5 gün boyunca 10 dk'da bir ölçüm yaparak şişe içerisinde herhangi bir mikroorganizma gelişimi olup olmadığını kaydetmektedir. İnkübasyon süresinin sonunda bir örnekte üreme tespit edilmezse (kolorimetrik sinyal değişimi yoksa) negatif, üreme tespit edilirse (kolorimetrik sinyal değişimi varsa) pozitif olarak değerlendirildi (Radrizzani vd., 2016).

3.2.14. Endotoksin analizi

Endotoksin testi için öncelikle standart eğri oluşturuldu. Bunun için, en az 3 endotoksin konsantrasyonu hazırlandı. Standart eğrinin ortasında ya da yakınında endotoksin konsantrasyonu seçildi ve çözeltiler Tablo 3.10.'da belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 3. 10. Endotoksin analizi için çözeltilerinin hazırlanması

Çözelti	Endotoksin Konsantrasyonu	Endotoksine eklenen çözelti	Paralel sayısı
A (Test çözeltisi)	Yok	Test çözeltisi	**2**
B (Örnek+Pozitif kontrol)	Standart eğrinin orta konsantrasyonu	Test çözeltisi	**2**
C (Pozitif kontrol)	Standart eğrinin orta konsantrasyonu	LRW	**2**
D (Negatif kontrol)	Yok	LRW	**2**

5 mL Pyrosoll tampon ile sulandırılan lizat (Limulus Amoebacyte Lysate Pyrotell) flakonu çok yavaşça çevrilerek köpürtülmeden çözdürüldü. Hazırlanan A, B, C, D çözeltilerinin her birinden 100'er µL alınarak tüplere pipetlendi. B çözeltisi için Çözelti A'dan 100'er µL alınarak 2 ayrı tüpe pipetlendi. Ayrı bir tüpte çözelti A'dan 900 µL, 1 EU/mL'lik standarttan 100 µL alınarak konsantrasyonu 0,1 EU/mL'lik dilüsyon elde edildi ve bu dilüsyon 2 ayrı tüpe 100 µL olarak pipetlendi. C çözeltisi için, LRW'den 100'er µL alınarak tüpe pipetlendi. Ayrı bir tüpte 900 µL LRW'ye 100 µL 1 EU/mL'lik standarttan eklenerek konsantrasyonu 0,1 EU/mL'lik dilüsyon elde edildi ve bu dilüsyon tüpe 100 µL olarak pipetlendi. A, B, C, D çözeltilerinin koyulduğu her bir tüpün üzerine 100 µL lizat pipetlendi ve Pyros Kinetix® Flex Tüplü Kinetik Okuyucuya (Associates of Cape Cod, Inc, ABD) yerleştirildi. 45 dk süre sonunda analiz sonlandırıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

3.3. İstatistiksel Analizler

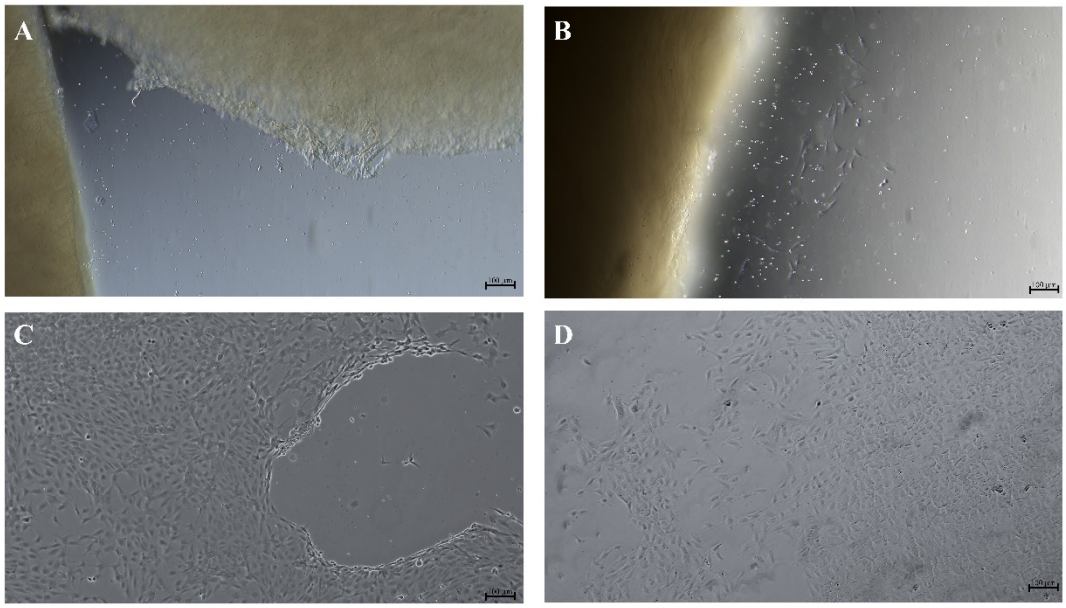
Her deney 3 tekrarlı olarak yapıldı Çalışmanın verileri, ortalama standart sapma (±SD) olarak raporlandı. Tüm grafikler, hesaplamalar ve istatistiksel analizler GaphPad Prism yazılımı sürüm 10.2.3 (GraphPad Software, ABD) kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey'in Çoklu Karşılaştırmalar son testi kullanılarak gerçekleştirildi.

p değerleri 0.05'ten küçükse istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

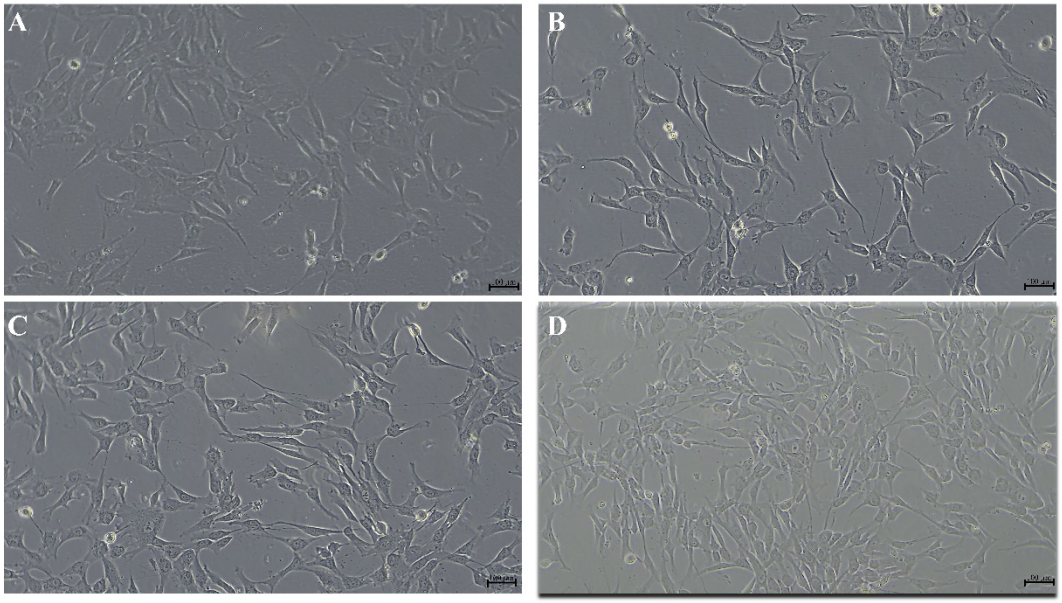
4. BULGULAR

4.1. İTTÜ Olarak MKH Ürünlerinin İzolasyonu ve Kültürü

Bağışçı kriterlerine uygun, bilgilendirilmiş ve yazılı onamı alınmış gönüllü vericilerden alınan göbek kordonu doku nakil solüsyonu içerisinde İİU laboratuvarına steril koşullarda getirildi ve aynı gün işlemine alındı. Laboratuvara gelen ham dokudan (göbek kordonu) eksplant kültür yöntemi ile izolasyon gerçekleştirildi. 72 saat sonra, doku parçalarından fibroblast benzeri, iğ şeklinde bir morfolojiye sahip hücrelerin çıkmaya başladığı görüldü (Şekil 4.1.). Bu hücreler koloniler şeklinde büyümeye başladılar ve 11. günde hücrelerin %80 konfluent olmasıyla, doku parçaları petri kaplarından uzaklaştırıldı (Şekil 4.1.). Hücreler bulundukları kaptan tripsinizasyon ile kaldırılarak alt kültürlere geçildi. Hücreler her gün mikroskop altında gözlemlendi ve alt kültürler boyunca hücreler morfolojilerini korudular (Şekil 4.2.).

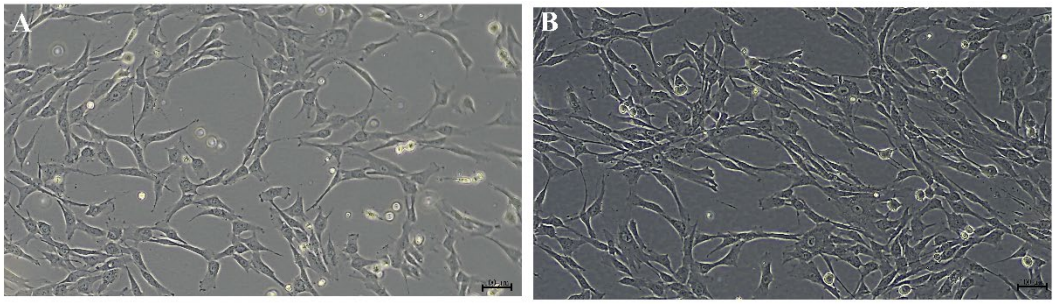


Şekil 4. 1. WJ-MKH'lerin morfolojik görüntüsü **A:** Eksplant izolasyonun yapıldığı gün (0. Gün), **B:** İzolasyondan sonra 72. saatte hücrelerin dokulardan çıkışı, **C:** İzolasyondan sonraki 11. günde hücrelerin %80 konfluensiye ulaşması ve dokuların ortamdan uzaklaştırılması, **D:** 11. günde hücrelerin morfolojik görüntüsü (ölçü çubuğu = 100 µm).



Şekil 4. 2. P1, P2 ve P3'te WJ-MKH'lerin morfolojik görüntüsü **A:** P1 2. günde hücrelerin morfolojik görüntüsü, **B:** P2 2. günde hücrelerin morfolojik görüntüsü, **C:** P3 3. günde hücrelerin morfolojik görüntüsü, **D:** P3 4. günde hücrelerin morfolojik görüntüsü, (ölçü çubuğu = 100 µm).

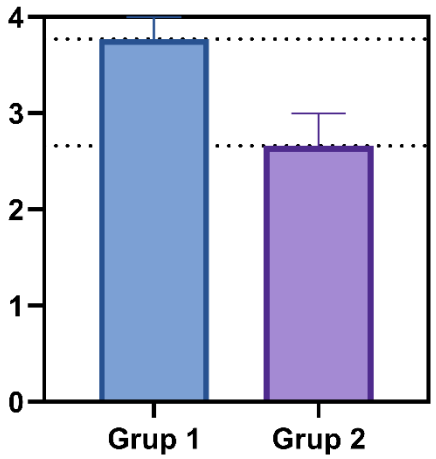
Her pasaj sonrasında hücreleri yedeklemek ve stok oluşturmak amacıyla, hücreler -196ºC sıvı azot tankında dondurularak saklandı. İlgili deneyleri gerçekleştirmek amacıyla hücreler su banyosunda çözdürülerek tekrar kültüre edildiler (Şekil 4.3.). Dondurma çözme işlemlerinde hücre canlılıkları Grup 4 hariç diğer gruplarda korundu ve tekrar kültüre edilen hücrelerin morfolojilerinde bir değişiklik gözlenmedi. Grup 4'te istenen hücre sayısı ve canlılığa ulaşmak için birden fazla kriyotüpün çözdürülmesi gerekti. Grup 3 ve Grup 4 için çözdürme sonrası ortalama canlılık sırasıyla %85,8 ve %81,0 iken, taze hazırlanmış son ürünler Grup 1 ve Grup 2 için ortalama canlılığı sırasıyla %94,2 ve %92,8 idi.



Şekil 4. 3. P3'te dondurularak saklandıktan 1 ay sonra çözdürülerek kültüre edilerek P4'e getirilen WJ-MKH'lerin morfolojik görüntüsü **A:** P4 3. günde hücrelerin morfolojik görüntüsü, **B:** P4 4. günde hücrelerin morfolojik görüntüsü, (ölçü çubuğu = 100 µm).

Kültüre edilen hücreler P3'e geldiklerinde immunofenotopik analiz ile karakterizasyonları yapıldı. Karakterizasyon sonuçları uygun bulunan hücreler diğer deney grupları (Grup 2, Grup 3 ve Grup 4) oluşturmak amacıyla kültüre edildi/ donduruldu/çözüldü. Daha sonra bu hücrelerin de akım sitometri ile immunofenotopik analizleri gerçekleştirildi. Sonuçları uygun bulunan hücreler üzerinde diğer analizler gerçekleştirildi.

Taze olarak hazırlanan son ürünler için (Grup 1 ve Grup 2) "Popülasyon İki Katına Çıkma Süreleri (Population Doubling Time: PDT)" hesaplandı, P3'teki hücrelere (Grup 1) kıyasla P4 hücreleri (Grup 2) için PDT değerlerinde bir düşüş olduğunu görüldü ve deneyin sonunda 1,41 kat azalma gözlendi (Şekil 4.4.). Spesifik olarak, Grup 1 hücreleri için PDT sonuçları 3,77 iken Grup 2 hücreleri için 2,66 idi. İstatistiksel analiz iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığını ortaya koydu ($p > 0,05$).



Şekil 4. 4. Grup 1 ve Grup 2 hücrelerine ait popülasyon iki katına çıkma sürelerine ilişkin grafik ($p > 0,05$).

4.1.1. Üretim ortamında partikül kontrolleri

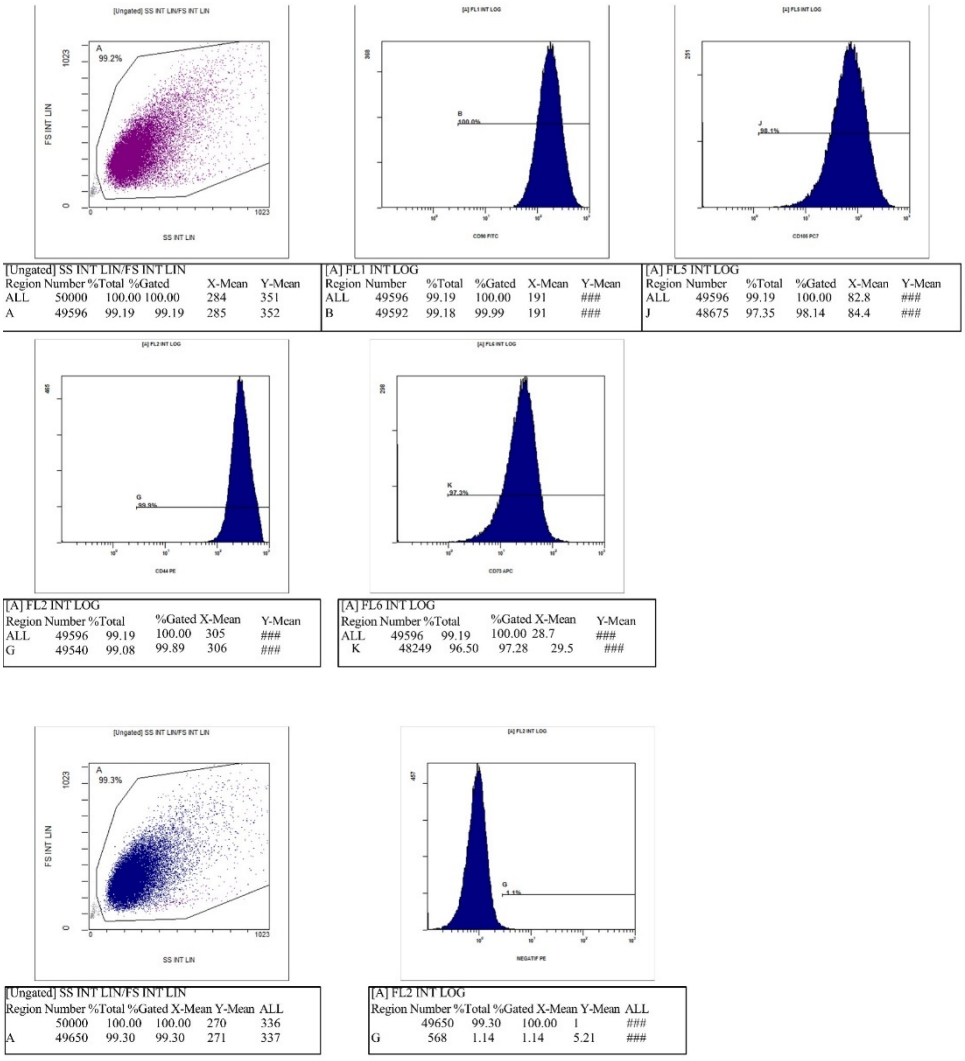
Partikül içeriği MKH üretiminin farklı aşamalarında ölçülmüştür. Üretimin herhangi bir aşamasında LAF kabin altında ölçülen 0,5 ve 5 μm'lik canlı olmayan partiküllerin sayısında önemli bir farklılık gözlenmedi.

4.2. Hücreler Üzerindeki Analizler

P3'e getirilen hücrelerden öncelikle akım sitometrisi ile immunofenotipik analiz gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçların uygunluğu tespit edildikten sonra bu hücreler çoğaltılarak diğer deney gruplarını hazırlamak için uygun şekilde üretim işlemlerine (kültüre etme/ dondurma/çözme) tabii tutuldu.

4.2.1. WJ-MKH'lerin akım sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu

Her bir deney grubu için akım sitometrisi ile immunofenotipik analiz gerçekleştirildi. Yapılan analizler sonucunda hücrelerin MKH'ler için pozitif kabul edilen CD90, CD44, CD105 ve CD73 belirteçlerini ifade ettiği; negatif belirteç olan CD34, CD11b, CD19, CD45 ve HLA-DR'i ise ifade etmediği görüldü (Şekil 4.5., 4.6., 4.7. ve 4.8.'de her bir gruba ait temsili bir analizin dot plot ve histogram görüntüleri, Tablo 4.1.'de ise her bir gruba ait ortalama sonuçların özeti gösterilmiştir). Elde edilen sonuçların "Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society of Cellular Therapy, ISCT)" kriterlerine uyarak son ürün serbest bırakma spesifikasyonlarına (Tablo 3.1.) uyduğu tespit edildi.



[Ungated] SS INT LIN/FS INT LIN

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	50000	100.00	100.00	284	351
A	49596	99.19	99.19	285	352

[A] FL1 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	49596	99.19	100.00	191	###
B	49592	99.18	99.99	191	###

[A] FL5 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	49596	99.19	100.00	82.8	###
J	48675	97.35	98.14	84.4	###

[A] FL2 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	49596	99.19	100.00	305	###
G	49540	99.08	99.89	306	###

[A] FL6 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	49596	99.19	100.00	28.7	###
K	48249	96.50	97.28	29.5	###

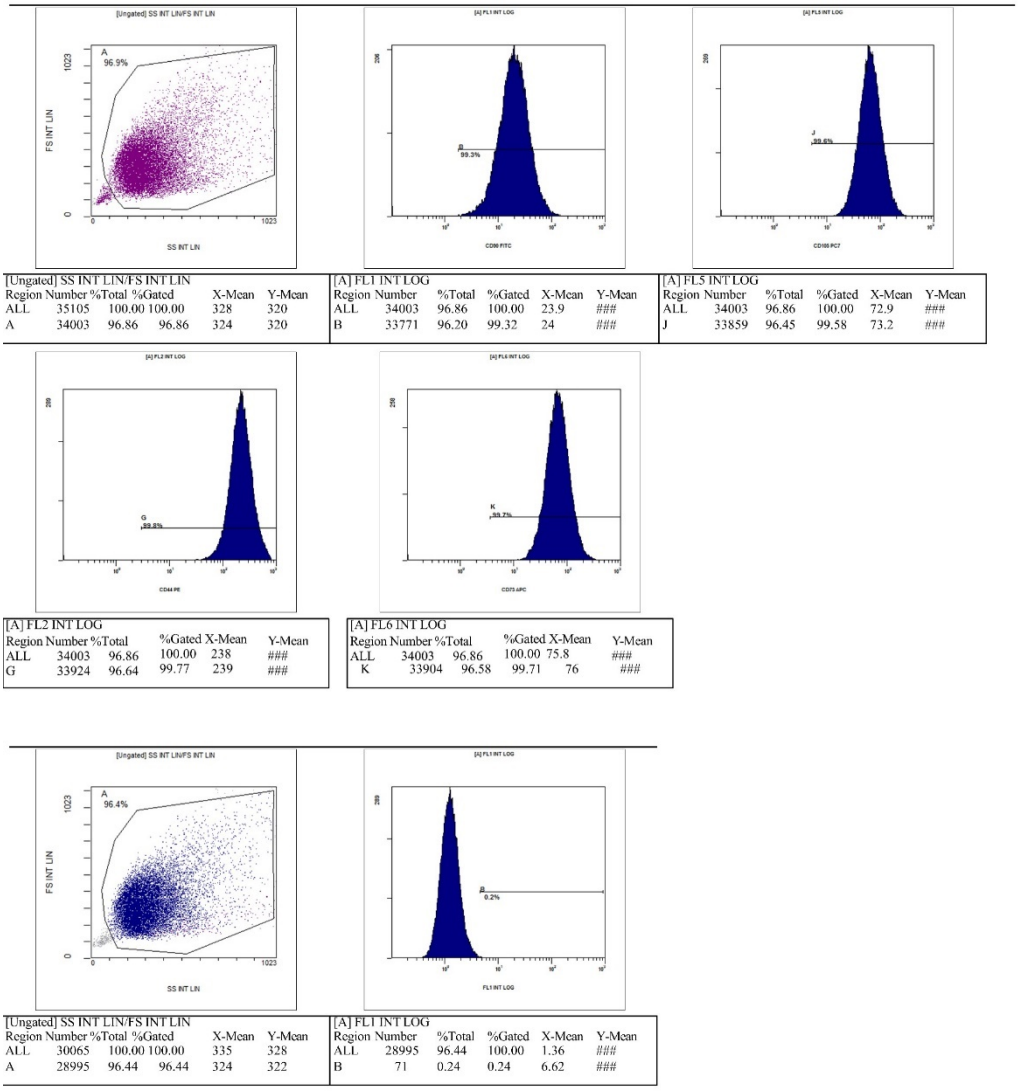
[Ungated] SS INT LIN/FS INT LIN

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean	ALL
	50000	100.00	100.00	270	336	
A	49650	99.30	99.30	271	337	

[A] FL2 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean	ALL
	49650	99.30	100.00	1		###
G	568	1.14	1.14	5.21		###

Şekil 4. 5. P3'e getirilen hücrelerin akım sitometri ile immunfenotipik karakterizasyonuna ilişkin analiz sonuçları



[Ungated] SS INT LIN/FS INT LIN

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	35105	100.00	100.00	328	320
A	34003	96.86	96.86	324	320

[A] FL1 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	34003	96.86	100.00	23.9	###
B	33771	96.20	99.32	24	###

[A] FL5 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	34003	96.86	100.00	72.9	###
J	33859	96.45	99.58	73.2	###

[A] FL2 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	34003	96.86	100.00	238	###
G	33924	96.64	99.77	239	###

[A] FL6 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	34003	96.86	100.00	75.8	###
K	33904	96.58	99.71	76	###

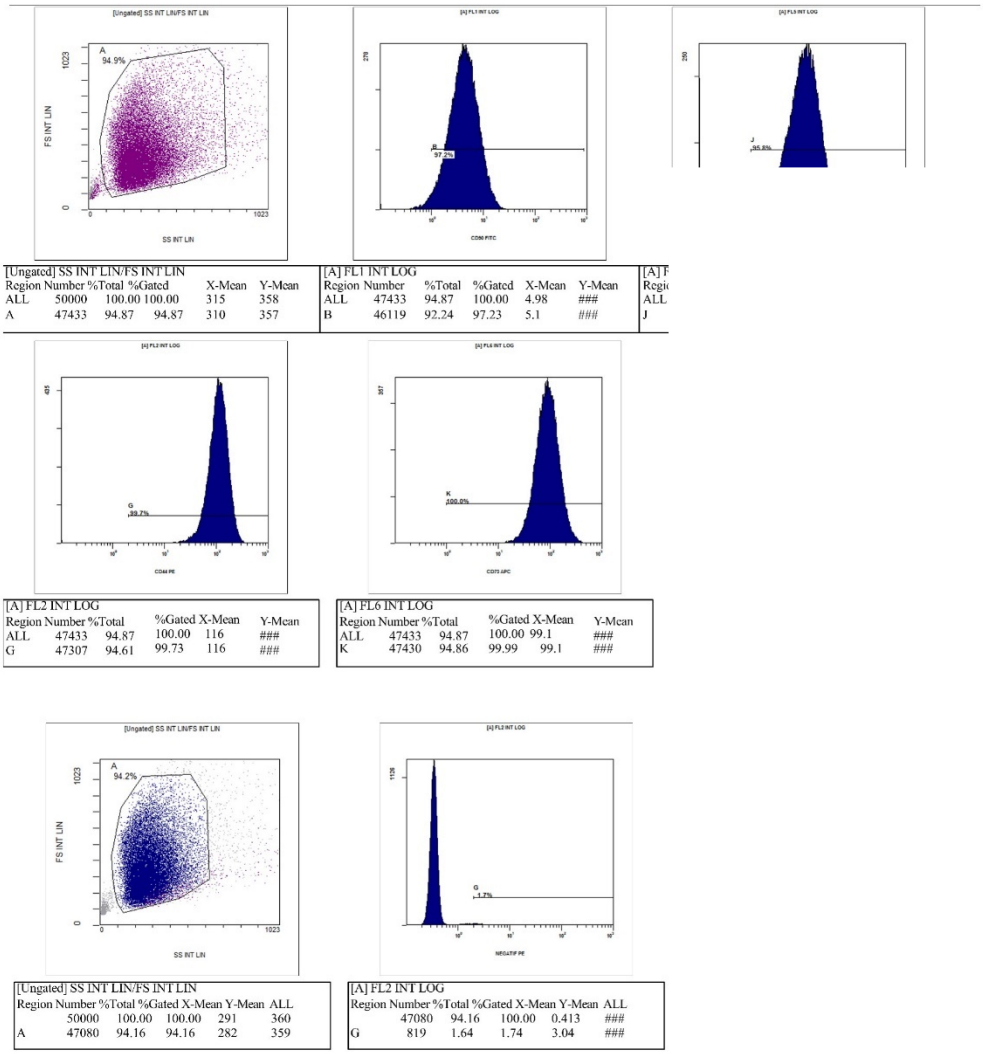
[Ungated] SS INT LIN/FS INT LIN

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	30065	100.00	100.00	335	328
A	28995	96.44	96.44	324	322

[A] FL1 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	28995	96.44	100.00	1.36	###
B	71	0.24	0.24	6.62	###

Şekil 4. 6. Grup 2 son ürünlerinin akım sitometri ile immunfenotipik karakterizasyonuna ilişkin analiz sonuçları



[Ungated] SS INT LIN/FS INT LIN

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	50000	100.00	100.00	315	358
A	47433	94.87	94.87	310	357

[A] FL1 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	47433	94.87	100.00	4.98	###
B	46119	92.24	97.23	5.1	###

[A] FL2 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	47433	94.87	100.00	116	###
G	47307	94.61	99.73	116	###

[A] FL6 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	47433	94.87	100.00	99.1	###
K	47430	94.86	99.99	99.1	###

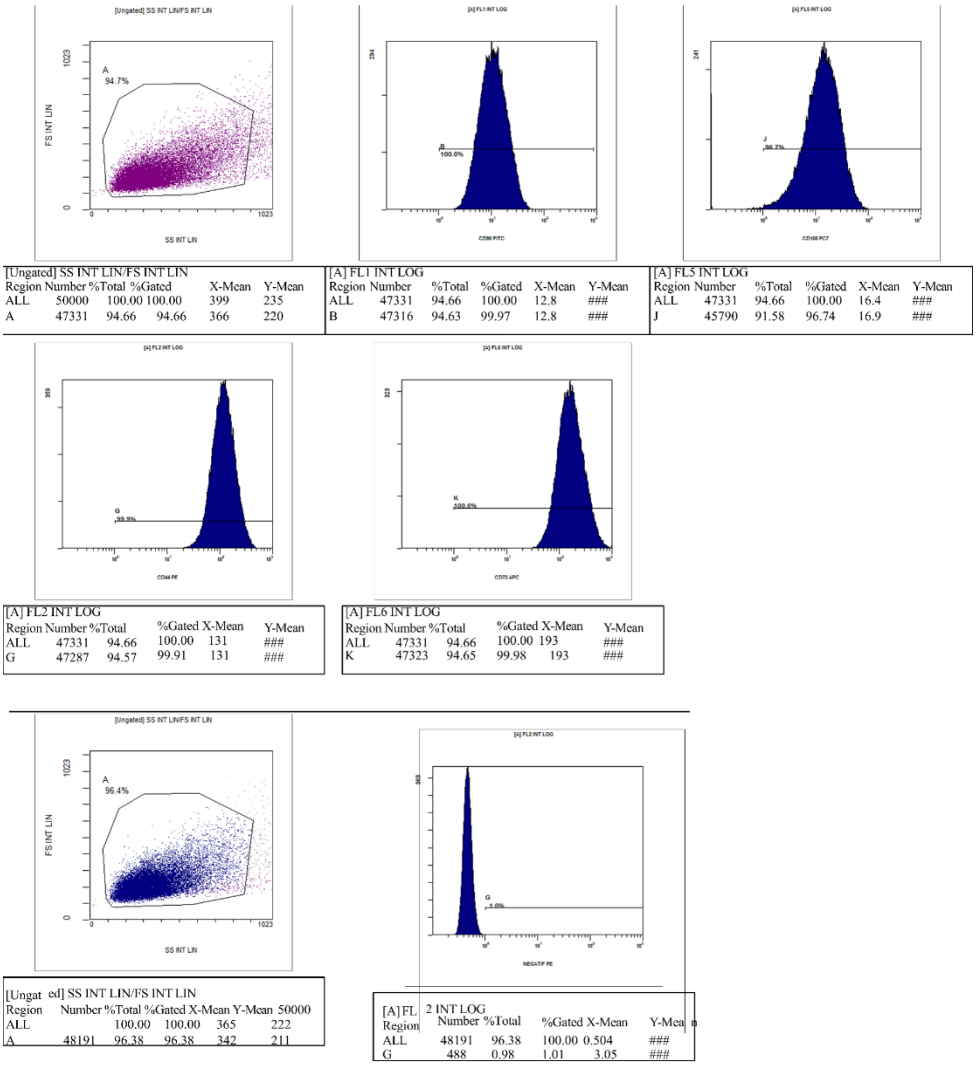
[Ungated] SS INT LIN/FS INT LIN

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean	ALL
	50000	100.00	100.00	291	360	
A	47080	94.16	94.16	282	359	

[A] FL2 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean	ALL
	47080	94.16	100.00	0.413	###	
G	819	1.64	1.74	3.04	###	

Şekil 4. 7. Grup 3 son ürünlerinin akım sitometri ile immunfenotipik karakterizasyonuna ilişkin analiz sonuçları



[Ungated] SS INT LIN/FS INT LIN

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	50000	100.00	100.00	399	235
A	47331	94.66	94.66	366	220

[A] FL1 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	47331	94.66	100.00	12.8	###
B	47316	94.63	99.97	12.8	###

[A] FL5 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	47331	94.66	100.00	16.4	###
J	45790	91.58	96.74	16.9	###

[A] FL2 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	47331	94.66	100.00	131	###
G	47287	94.57	99.91	131	###

[A] FL6 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	47331	94.66	100.00	193	###
K	47323	94.65	99.98	193	###

[Ungated] SS INT LIN/FS INT LIN

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean	50000
ALL			100.00	100.00	365	222
A	48191	96.38	96.38	342	211	

[A] FL2 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	48191	96.38	100.00	0.504	###
G	488	0.98	1.01	3.05	###

Şekil 4. 8. Grup 4 son ürünlerinin akım sitometri ile immunfenotipik karakterizasyonuna ilişkin analiz sonuçları

Tablo 4. 1. Akım sitometri ile immunfenotipik karakterizasyonuna ilişkin her bir grubun ortalama sonuçları.

Yüzey Belirteci	Grup 1 (ortalama)	Grup 2 (ortalama)	Grup 3 (ortalama)	Grup 4 (ortalama)
CD90 FITC	99.80 ± 0,34%	% 96,85±2,14	% 97,16±0,07	% 100,00±0,049
CD105 PC7	98.58 ± 1,13%	% 96,87±2,35	% 94,91±0,093	% 96,70±0,16
CD44 PE	99.89 ± 0%	% 99,83±0,52	% 99,69±0,03	% 99,91±0,68
CD73 APC	96.81 ± 0,47%	% 97,39±2,26	% 99,97±0,02	% 100,00±0,49
HLA-DR	% 1,09±0,29	% 1,22±0,032	% 1,85±0,11	% 1,01±0,52
CD14	% 1,09±0,29	% 1,22±0,032	% 1,85±0,11	% 1,01±0,52
CD11b	% 1,09±0,29	% 1,22±0,032	% 1,85±0,11	% 1,01±0,52
CD34	% 1,09±0,29	% 1,22±0,032	% 1,85±0,11	% 1,01±0,52
CD19	% 1,09±0,29	% 1,22±0,032	% 1,85±0,11	% 1,01±0,52
CD45	% 1,09±0,29	% 1,22±0,032	% 1,85±0,11	% 1,01±0,52
CD79a	% 1,09±0,29	% 1,22±0,032	% 1,85±0,11	% 1,01±0,52

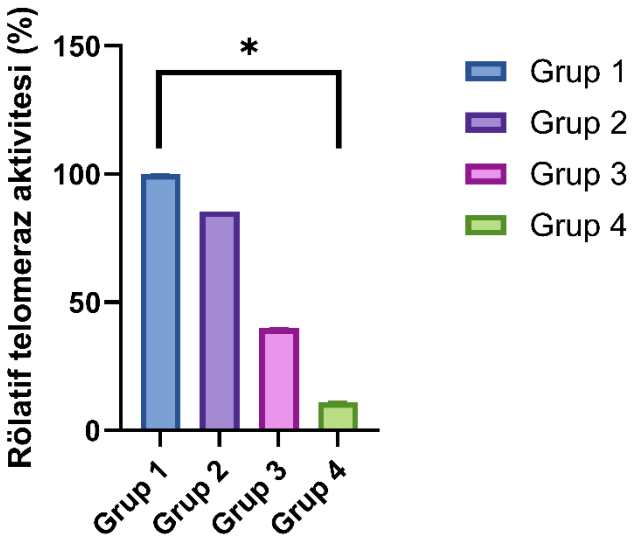
4.2.2. Tümörojenite analizi (Telomeraz enzim aktivitesi)

Son ürünlerin tümörojenitesinin kontrolü için telomeraz enzim aktivitesi tayini analizi "Telo TAGGG PCR ELISA Plus (Roche, ABD)" kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi. Kitin doğruluğunun kontrolü için negatif kontrol ve pozitif kontrol örneklerinin kit önerileri doğrultusundaki aralıklarda olmasına dikkat edildi. Negatif kontrol için 0,1'den küçük bir değer; pozitif kontrol için ise kit içeriğinde bulunan low kontrolün 0,3-0,8 değerleri arasında olması beklenmektedir. Çalışma sonucunda elde edilen değerler bu kriterlere uygundu. Kitin düzgün çalıştığı doğrulandıktan sonra deney gruplarının analiz sonuçları hesaplanmıştır.

Telomeraz enzim aktivitesi deney grupları arasında farklılık göstererek, Grup 1 en yüksek ve Grup 4 en düşük aktiviteyi sergiledi. Telomeraz enzim aktivitesi seviyeleri en yüksekten en düşüğe doğru aşağıdaki gibi sıralanmıştır: Grup 1 (0,21 ± 0,1), Grup 2 (0,28 ± 0,02), Grup 3 (0,08 ± 0,05) ve Grup 4 (0,02 ± 0,02). Grup 1'in,

Grup 4'ten yaklaşık 10,5 kat daha fazla telomeraz aktivitesine sahip olduğu tespit edildi.

Diğer son ürün gruplarıyla karşılaştırmak için, P3 MKH'lerde (Grup 1) rölatif telomeraz aktivitesi (RTA) %100 olarak kabul edildi ve diğer grupların hesaplamaları yapıldı. Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 son ürünlerinde gözlenen RTA değerlerine ilişkin grafik Şekil 4.9.'da gösterilmiştir. Bu sonuçlar, Grup 2'nin diğer gruplara kıyasla nispeten daha yüksek bir telomeraz aktivitesi seviyesini koruduğunu, Grup 4'ün ise gruplar arasında en düşük telomeraz aktivitesini sergilediğini göstermektedir. Grup 3, Grup 1'e kıyasla telomeraz aktivitesinde orta düzeyde bir düşüş göstererek arada kalmaktadır (p>0,05).



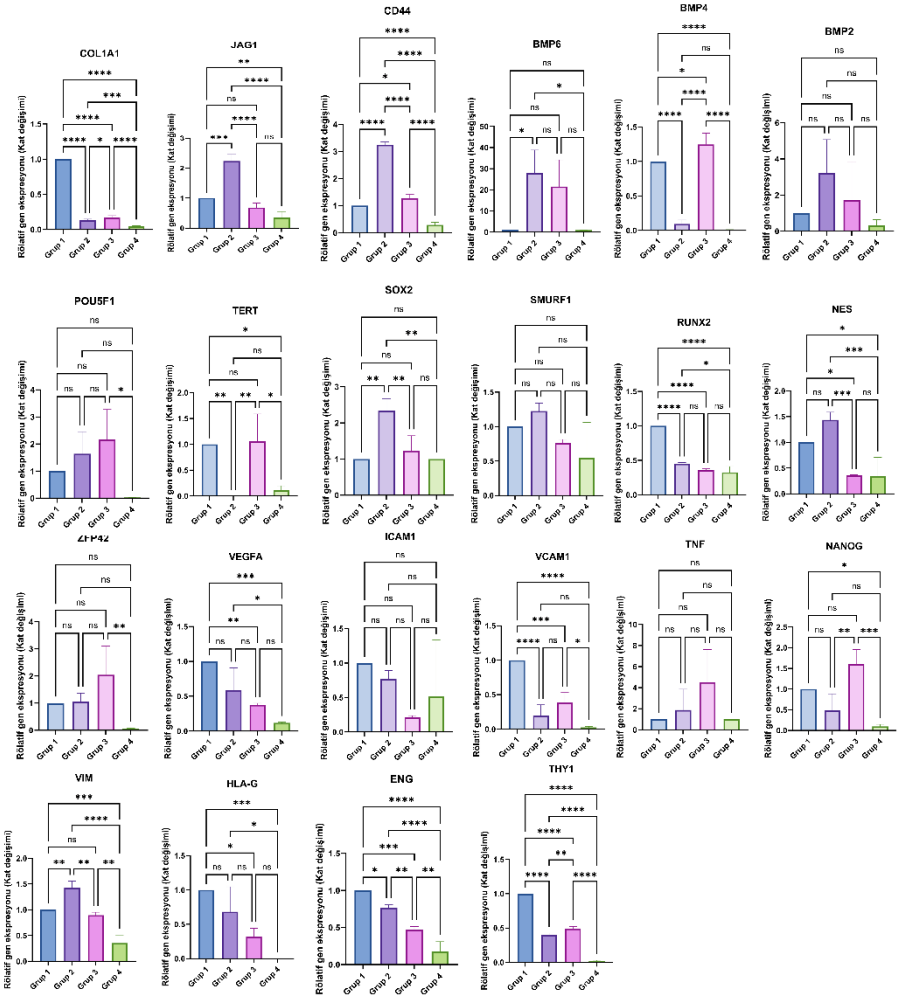
Şekil 4. 9. Son ürünlerde gözlenen RTA değerlerine ilişkin grafik. Grup 1'in RTA değeri %100 olarak kabul edildiğinde; Grup 2'nin 85,43; Grup 3'ün 39,89; Grup 4'ün ise 11,13 olarak hesaplanmıştır (*p<0,05).

4.2.3. Gen ekspresyon analizi

Son ürünlerdeki pluripotensi, farklılaşma ve kök hücre özellikleri ile ilgili genlerin ekspresyon profillerinin analizi amacıyla RT-PCR ile 22 genin ekspresyonları belirlendi. Ct değeri 30'un altında olan genler güçlü pozitif, 30-35 arasında olanlar pozitif ve 36-40 arasında olan genler zayıf ekspresyon veya çevresel kontaminasyon olarak kabul edildi. Serbest bırakma kriteri olarak pozitif genler için Ct <30 ve negatif genler için Ct >30 kabul edildi.

Grup 1, 2 ve 3 arasında gen ifadeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olsa da bunlar belirtilen aralıklar dahilindedir. Örneğin, ENG gen ifadesi bu 3 grupta yüksek oranda ifade edilirken, Grup 4'te bu ifade kaybolmuştur. Bu bulgular, hücreler uygun şekilde dondurulup çözüldüğünde gen ekspresyon düzeylerinin tutarlı kaldığını göstermektedir. Buna karşılık, hücreler aynı gün içinde çözülüp yeniden dondurulduğunda gen ifadesi seviyelerinde farklılıklar kaydedilmiştir. Grup 4, MKH ile ilişkili 22 genden 19'unda farklı ifade sergiledi. ENG (CD105), POU5F1 (Oct-4), VCAM1, BMP4, THY1, ZFP42 (Rex-1), NES, SMURF1, ICAM 1, RUNX2, CD44, HLA-G, JAG1 gibi genler diğer gruplara kıyasla değişmiş ekspresyon seviyeleri sergiledi.

Özellikle ENG, SMURF1 ve ICAM1 Grup 4 hücrelerinde ifade edilmezken diğer gruplarda güçlü bir şekilde eksprese edildi. POU5F1, VCAM1, BMP4, ZFP42, HLA-G ve JAG1 Grup 4 hücrelerinde ifade edilmezken, bu genlerin ifadesi diğer gruplarda gözlendi. THY1 ve NES gen ekspresyonları Grup 4'te zayıf ekspresyon gösterirken diğer gruplarda güçlü ekspresyon sergiledi (Şekil 4.10.)

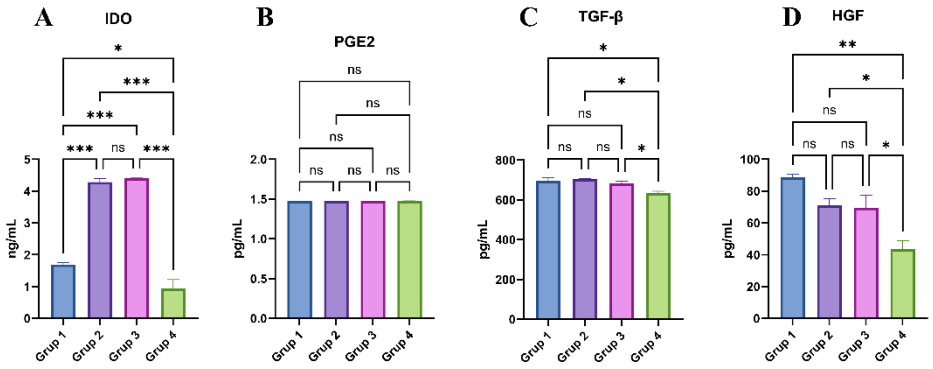


Şekil 4. 10. Son ürünlere ait rölatif gen ifadelerinin karşılaştırmalı grafiği (*p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001; ****p <0,0001).

4.2.4. Potansi analizi (Parakrin sekresyonu)

Son ürün haline getirilen MKH'ler, kültür besiyerinde rekombinant insan IFN-ɣ (100 ng/ml; 2000 IU) varlığında ve yokluğunda 4 gün boyunca kültüre edildi ve kondisyonlanmış besiyeri (CM), 4 günün sonunda toplanarak ELISA yöntemi ile IDO, PGE2, HGF ve TGF-β1 proteinleri analiz edildi. IDO'nun en yüksek tespit edildiği gruplar Grup 2 (4,28 ± 0,12 ng/mL) ve Grup 3 (4,40 ± 0,12 ng/mL) olup, kontrol grubu olan Grup 1'den (1,689 ± 0,06 ng/mL) yüksek sentezlendiği görüldü (p<0,001). Grup 4'e ait hücrelerdeki IDO sentezi (0,94 ± 0,28 ng/mL) Grup 1'e göre 1,8 kat daha düşüktü. (p<0,05). Grup 2 ve Grup 3'e göre ise ortalama 4,5 kat daha düşük sentezlendi (p<0,001) (Şekil 4.11.-A). PGE2 sekresyonu ise tüm gruplarda eşitti (1,48 pg/mL) (p>0,05). TGF-β sekresyonu PGE2'ye benzer şekilde gruplar arasında çok fark

göstermezken (Grup 1: 696,1 ± 16,50; Grup 2: 703,3 ± 3,14; Grup 3: 682,2 ± 11,00 pg/mL; p>0,05) yalnızca Grup 4 hücrelerinde diğer gruplara göre 634,4 ± 9,43 pg/mL ile daha az protein sekresyonu oldu (p<0,05) (Şekil 4.11.-B). HGF sekresyonu en yüksek Grup 1'de görülürken (88,67 ± 1,89 pg/mL), bunu sırasıyla Grup 2 (71,00 ± 4,24 pg/mL) ve Grup 3 (69,50 ± 7,78 pg/mL) takip etti (Şekil 4.11.-C). Bu gruplar arasındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05). Grup 4 hücrelerinde ise, 43,67 ± 5,19 pg/mL HGF protein sentezi ile en düşük değer ölçüldü (p<0,01). (Şekil 4.11.-D).

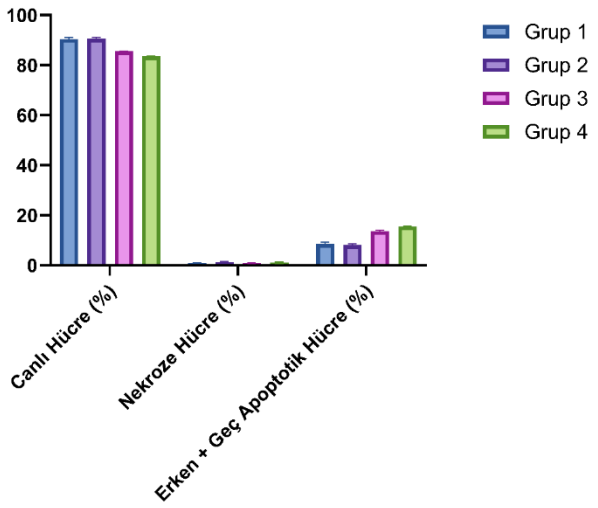


Şekil 4. 11. Son ürün haline getirilen hücrelerin IFN-ɣ varlığı ve yokluğunda kültüre edildikten sonra besiyerine salgıladıkları parakrin faktörlerin salgılarına ait grafik. **A:** IDO salınımı en yüksek Grup 2 ve Grup 3'te en düşük ise Grup 4'te görüldü. **B:** PGE2 salınımı tüm gruplarda aynı tespit edildi. **C:** TGF-β salınımı Grup 4'te diğer gruplara göre nispeten daha az olarak tespit edildi. **D:** HGF salınımı Grup 4'te en az olup en yüksek sekresyon kontrol grubunda saptanmıştır. (*p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001).

4.2.5. Apoptoz analizi

Son ürün elde etme yöntemlerinin hücrelerdeki apoptozis üzerindeki etkileri analiz edilmiştir. Ürünlerin son kullanma tarihi olarak belirlenen süre 48 saat olduğundan, apoptoz analizi hücreler son ürün haline getirildikten 48 saat sonra gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.12., dört son ürünün hayatta kalma ve apoptoz oranlarını göstermektedir. Grup 1 ve Grup 2 için apoptoz sonuçları düşüktür; bu gruplarda apoptoza uğrayan hücrelerin oranı <%10'du (Tablo 4.2.). Buna karşılık, Grup 3 ve 4'teki hücreler sırasıyla %13,7 ± 0,40 ve %15,50 ± 0,20 ile önemli ölçüde daha yüksek

apoptoz oranları sergiledi. Daha ileri kantitatif sonuçlar dondurma ve çözme işleminin kontrol hücrelerine kıyasla MKH apoptozunu önemli ölçüde indüklediğini gösterdi ($p<0,0001$) (Şekil 4.12.).



Şekil 4. 12. Son ürün haline getirildikten 48 saat sonra gerçekleşen apoptoz analizi sonuçlarına göre grupların karşılaştırılması grafiği.

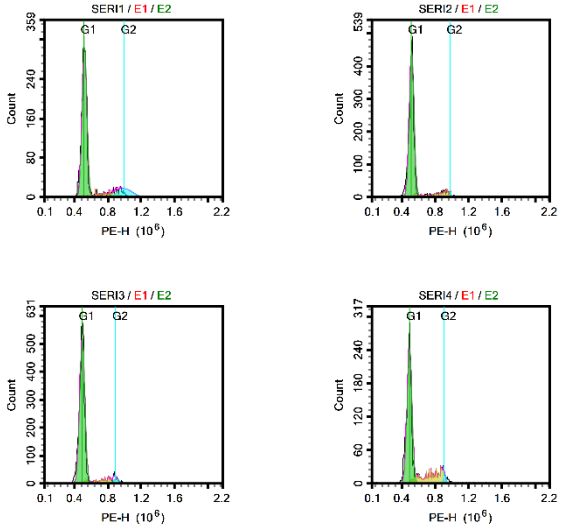
Tablo 4. 2. Apoptoz analizi sonuçlarına ilişkin her bir grubun ortalama sonuçları.

Seriler	Canlı	Ölü (Nekroz)	Geç Apoptotik (Apoptotik/ölü)	Erken Apoptotik (Apoptotik)
Grup 1	90,45±0,62	0,98±0,06	8,18±0,53	0,39±0,14
Grup 2	90,57±0,53	1,37±0,15	7,67±0,54	0,4±0,13
Grup 3	85,5±0,16	0,8±0,20	13,43±0,26	0,27±0,14
Grup 4	83,52±0,19	1,02±0,40	15,3±0,15	0,17±0,06

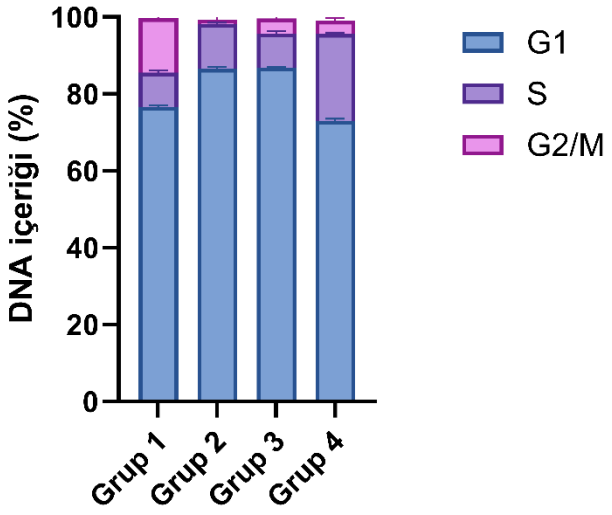
4.2.6. Hücre döngüsü analizi

Ürünlerin son haline getirilmesi sırasında büyüme özelliklerinde meydana gelen değişikliklerin işlevsel etkileri göz önünde bulundurularak, bu tez çalışmasında akım sitometrisi analizi kullanılarak dört son ürünün hücre döngüsü durumu analiz edilmiştir. DNA'nın tek değişkenli histogramları, hücre döngüsünün G0/G1, S ve G2/M aşamalarındaki hücrelerin yüzdelerini ölçen veriler sağlamıştır (Ding vd., 2024). Son ürünlerdeki DNA içeriğini değerlendirmek için, DNA'ya yakınlığı ile bilinen PI boyası analiz için kullanılmıştır.

Son ürünlerdeki akım sitometri cihazı ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizine ilişkin sonuçlar Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.'te, hücre döngüsü G1, S ve G2/M fazındaki hücrelerin ortalama yüzdeleri ise Tablo 4.3.'te belirtilmiştir. Grup 2 ve Grup 3 hücreleri G0/G1 fazındaki hücrelerin sıklığında kademeli bir artış gösterdi sakin G1 fazındaki hücrelerin oranı Grup 2 ve Grup 3'te (sırasıyla %86,55 ± 0,45 ve %86,88 ± 0,012; p> 0,05) Grup 1 ve Grup 4 hücrelerine (sırasıyla %76,64 ± 0,36 ve %72,95 ± 0,55; p<0,0001) kıyasla daha yüksekti. Grup 4'ün hücre döngüsü analizi, diğer gruplarla karşılaştırıldığında S fazındaki hücre sayısında belirgin bir artış ve G0/G1 fazındaki hücrelerde azalma olduğunu ortaya koydu. Grup 2 (sırasıyla %11,65 ± 0,35 ve %1,09 ± 0,91) ve Grup 3'teki (sırasıyla %8,80 ± 0,72 ve %3,97 ± 0,53) S ve G2/M fazındaki hücrelerin yüzdesi (S fazı için p <0,01 ve G2/M fazı için p<0,01) Grup 1 (sırasıyla %8,92 ± 0,58 ve %14,11 ± 0,89) ve Grup 4'e (sırasıyla %22,64 ± 0,36 ve %3,42 ± 0,78) kıyasla daha düşüktü (Şekil 4.14.).



Şekil 4. 13. Son ürünlerin akım sitometride hücre döngüsüne ait DNA histogramları.



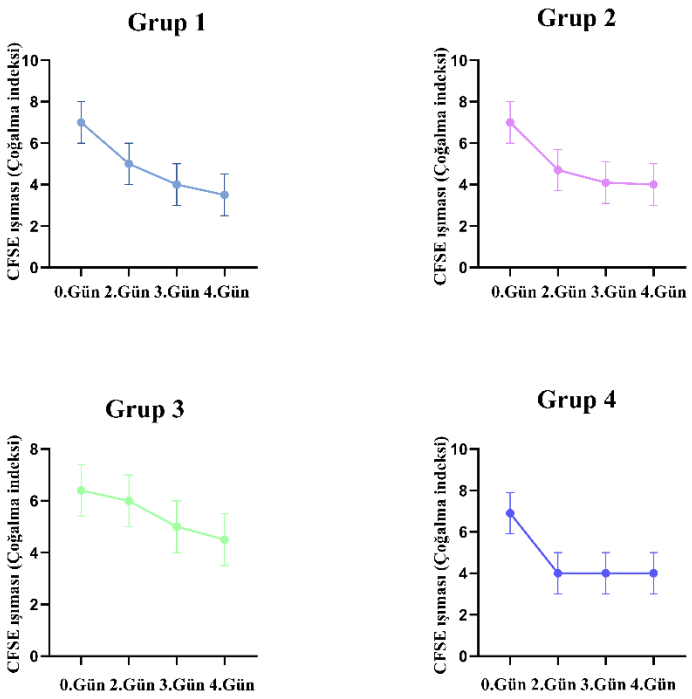
Şekil 4. 14. Hücre döngüsünün G1, S ve G2/M aşamalarındaki hücrelerin yüzdelerini karşılaştırmalı olarak gösteren grafik.

Tablo 4. 3. Son ürünlerdeki G1, S ve G2/M fazlarındaki değişimlerin gösterimi.

Gruplar	G1	S	G2/M
Grup 1	%76,64 ± 0,36	%8,92 ± 0,58	%14,11 ± 0,89
Grup 2	%86,55 ± 0,45	%11,65 ± 0,35	%1,09 ± 0,91
Grup 3	%86,88 ± 0,12	%8,80± 0,72	%3,97 ± 0,53
Grup 4	%72,95 ± 0,55	%22,64 ± 0,36	%3,42 ± 0,78

4.2.7. CFSE ile canlılık ve proliferasyon analizi

CFSE, ardışık hücre bölünmeleri boyunca boyanın seyrelmesini ölçerek hücre çoğalmasını izlemek için kullanılan floresan bir boyadır. Grup 4 hariç tüm gruplarda boya konsantrasyonu günler içinde azaldı (Şekil 4.15.). Floresan seviyeleri 4 günlük süre boyunca diğer gruplara göre nispeten yüksek kaldı, minimum seyrelme gözlendi ve bu da diğer gruplara kıyasla proliferatif aktivitede önemli bir azalmaya işaret etmiştir. Özellikle, Grup 4'te ilk 2 gün boyunca proliferasyon gözlenmiş ve sonrasında durmuştur.

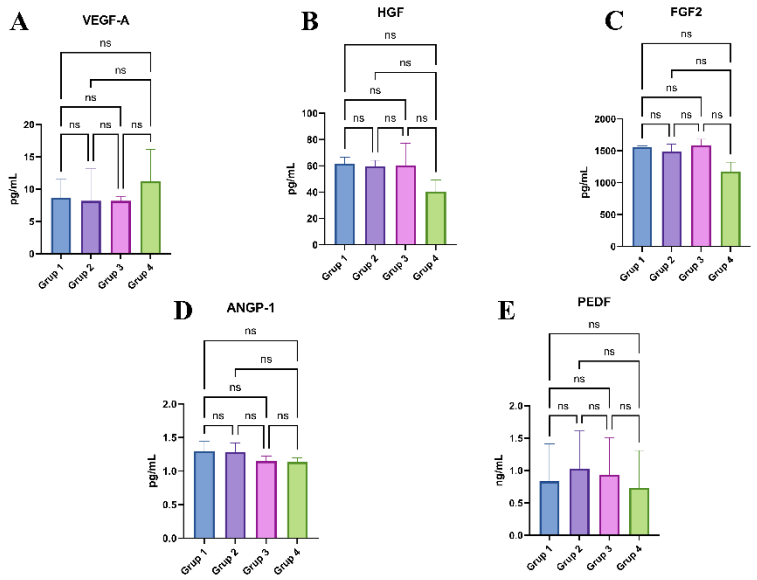


Şekil 4. 15. Son ürün haline getirmek için hazırlanan hücrelerin 4 gün boyunca CFSE ışımalarının ölçümüne ait grafik

4.2.8. Büyüme faktörü analizi

Son ürün haline getirilen MKH'ler, 4 gün boyunca kültüre edilerek 4 günlük kültürün sonunda kondisyonlanmış besiyeri (CM), toplandı ve ELISA yöntemi ile VEGF, HGF, FGF2, Angpt-1 ve PEDF sentezi için analiz edildi. VEGF sekresyonu, Grup 4'te 11,20 ± 4,95 pg/mL ile diğer gruplara göre (Grup 1: 8,70 2,83; Grup 2: 8,20 ± 4,95; Grup 3: 8,20 ± 0,71 pg/mL) ortalama 1,33 kat artmıştı (Şekil 4.16.-A) ancak bu artış; istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). HGF sentezinde Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 benzer bir sekresyon oranı sergilerken (sırasıyla; 61,56 ± 5,18, 59,56 ± 4,68, 60,44 ± 16,67 pg/mL), Grup 4 biraz daha azalmış bir sekresyona sahipti (40,33 ± 9,07 pg/mL) (Şekil 4.16.-B) ancak gruplar arasında istatistiksel bir fark görülmedi ($p>0,05$). FGF2 sentezi de HGF'ye benzer şekilde olup Grup 1 1.555 ± 20,43; Grup 2 1.485 ± 121; Grup 3 1.585 ± 95,85 ve Grup 4 1.175 ± 147,7 pg/mL olarak ölçüldü (Şekil 4.16.-C). Gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Angpt-1 sekresyonu Grup 3 (1,150 ± 0,07 pg/mL) ve Grup 4'te (1,14 ± 0,06 pg/mL) diğer iki gruba göre (Grup 1: 1,30 ± 0,14; Grup 2: 1,28 ± 0,14 pg/mL) daha az (Şekil 4.16.-D) olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

PEDF salınımında da P4 hücrelerinde (Grup 2 ve Grup 3; sırasıyla; 1,03 ± 0,58 ve 0,93 ± 0,58 ng/mL) diğerlerine göre (Grup 1 ve Grup 4; sırasıyla; 0,83 ± 0,58 ve 0,73 ± 0,58 ng/mL) bir miktar artış (Şekil 4.16.-E) olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0,05).

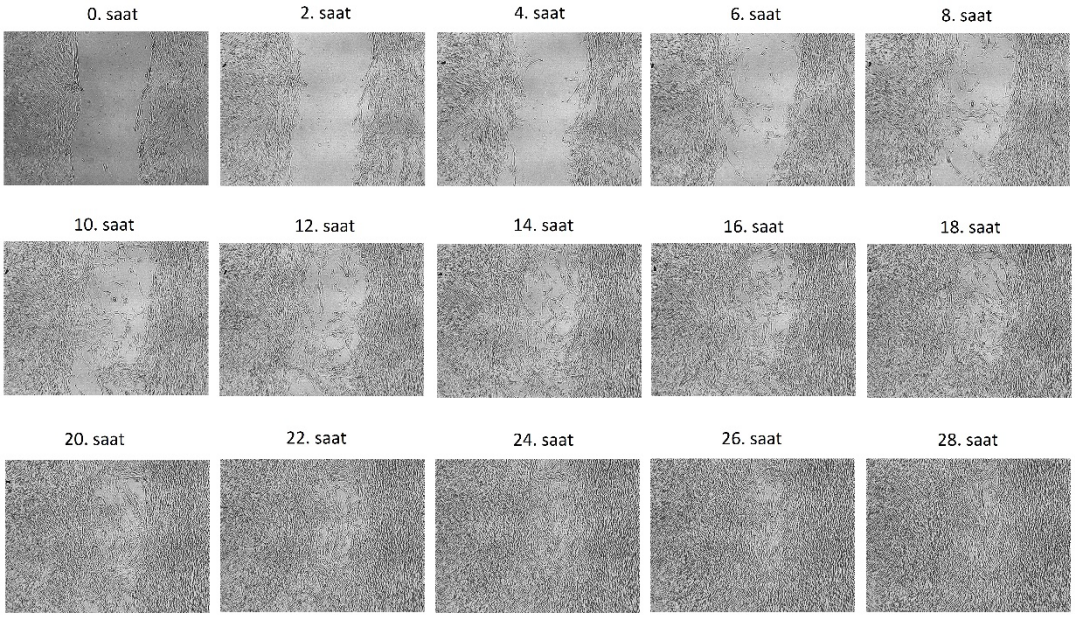


Şekil 4. 16. Son ürün haline getirilen hücrelerin 4 gün boyunca kültüre edildikten sonra besiyerine salgıladıkları büyüme faktörlerin salgılarına ait grafik. **A:** VEGF salınımı en yüksek Grup 4'te saptanırken, diğer gruplarda benzer düzeyde sekresyon tespit edildi. **B:** FGF2 salınımı Grup 4'te diğer gruplara göre daha az olarak saptandı. **C:** TGF-β salınımı Grup 4'te diğer gruplara göre daha az olarak saptandı. **D:** Angpt-1 salınımı tüm gruplarda benzer şekilde saptandı. **E:** PEDF salınımı Grup 2 ve Grup 3'te en yüksek iken, Grup 4'te en düşük olacak şekilde ölçüldü (*p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001; ****p <0,0001).

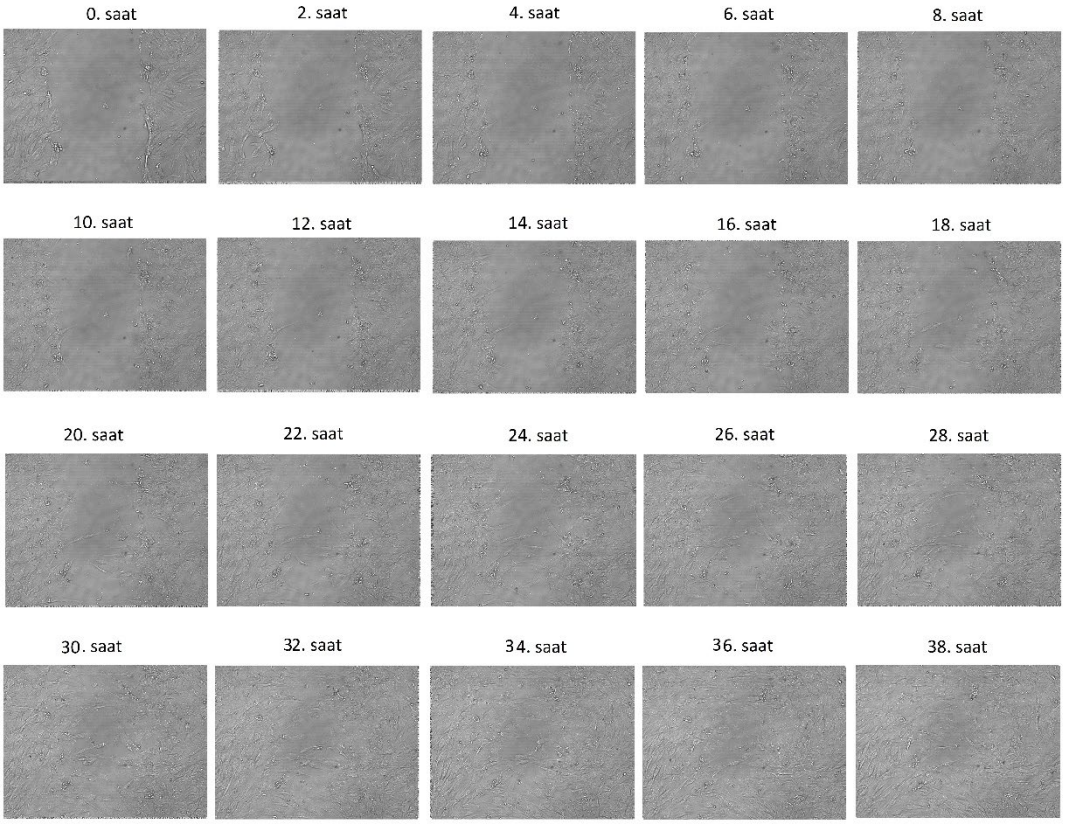
4.2.9. *İn vitro* yara iyileşmesi analizi

In vitro yara iyileşmesi deney sonuçları, son ürünlerin göç ve proliferatif yetenekleri hakkında değerli bilgiler vermektedir ve bu da terapötik potansiyelleri açısından önemli olabilir. Grup 1, 20 saat içinde beklenen etkili yara kapanmasını sergiledi (Şekil 4.17.). Grup 2 de yara alanını 38 saat gibi biraz gecikmeli bir zaman diliminde kapattı (Şekil 4.18.). İlginç bir şekilde, Grup 3 yarayı Grup 1'e benzer bir oranda; 20 saatte; kapattı (Şekil 4.19.). Ancak Grup 4 hücreleri 48 saat sonra bile tam

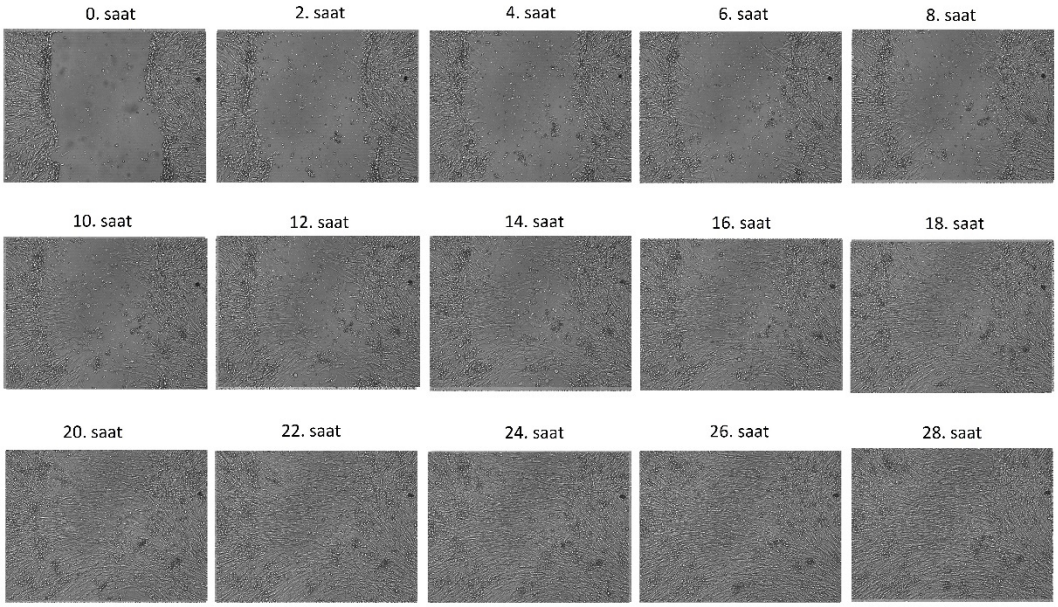
yara kapanması sağlayamadı (Şekil 4.20.). Grupların yara alanını saatler içerisinde kapatmasına ilişkin grafik Şekil 4. 21.'de sunulmuştur.



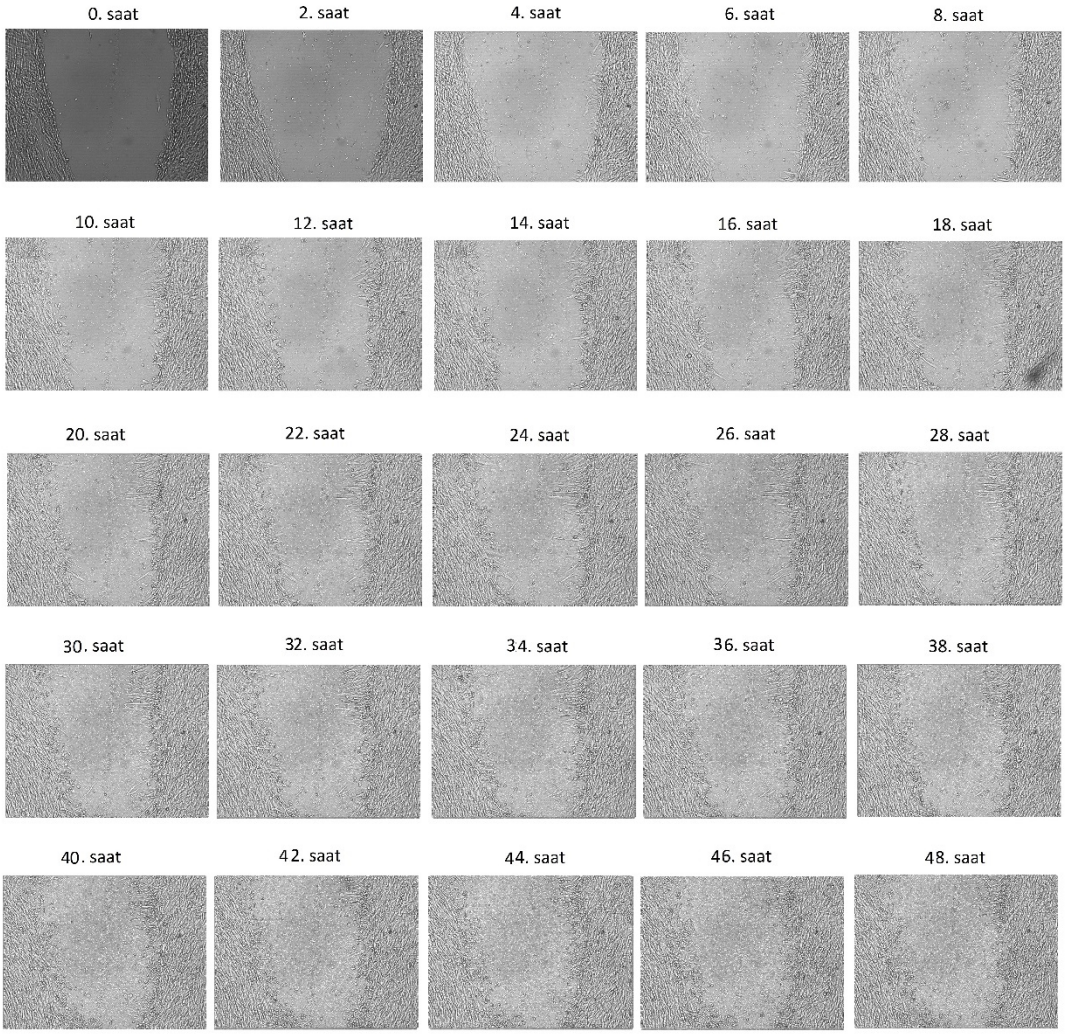
Şekil 4. 17. *İn vitro* yara oluşturulması sonrası Grup 1 hücrelerinin yara alanını kapatmasına ait mikroskop altındaki morfolojik görünümleri. (Orijinal Büyütme: 4X). Hücreler 20. saatte yara alanını tamamen kapamıştır.



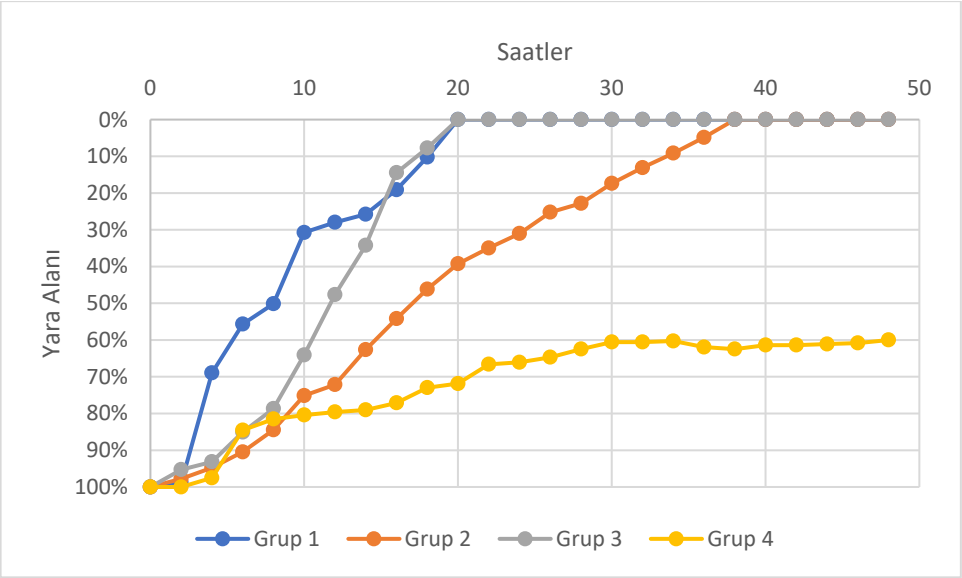
Şekil 4. 18. *İn vitro* yara oluşturulması sonrası Grup 2 hücrelerinin yara alanını kapatmasına ait mikroskop altındaki morfolojik görünümleri. (Orijinal Büyütme: 4X). Hücreler 38. saatte yara alanını tamamen kapamıştır.



Şekil 4. 19. *İn vitro* yara oluşturulması sonrası Grup 3 hücrelerinin yara alanını kapatmasına ait mikroskop altındaki morfolojik görünümleri. (Orijinal Büyütme: 4X). Hücreler 20. saatte yara alanını tamamen kapamıştır.



Şekil 4. 20. *İn vitro* yara oluşturulması sonrası Grup 4 hücrelerinin yara alanını kapatmasına ait mikroskop altındaki morfolojik görünümleri. (Orijinal Büyütme: 4X). Hücrelerin 48. saatin sonunda bile yara alanını kapatamadığı görülmüştür.



Şekil 4. 21. *İn vitro* yara iyileşmesi analizi sonucuna göre son ürün haline getirilen hücrelerin saatler içerisinde yara alanını kapatmalarına ilişkin grafik.

Daha önce Latifi-Pupovci ve arkadaşları (Latifi-Pupovci vd., 2015) tarafından açıklandığı gibi, yara iyileşme sürecinin hücrelerin hem göçünden hem de çoğalmasından etkilendiğini göz önünde bulundurarak, göçü yansıtması açısından 6 ve 12 saat sonra ve çoğalmayı yansıtması açısından 24 saat sonra karşılaştırmalı bir analiz gerçekleştirildi. Sonuçlar Tablo 4.4.'te sunulmuştur. Buna göre Grup 1 hücreleri göç ederek yara alanını %72 oranında kapatmış, bunu takiben Grup 3 hücreleri ise %52 oranıyla yara alanını kapatmıştır. Göç yeteneği bakımından Grup 2 ve Grup 4 birbirine benzer oranlar sergilemiş olup; Grup 2 %28, Grup 4 ise %20 oranında oluşturulan yara alanını kapatmıştır. Göç eden hücrelerin çoğalmasıyla da Grup 1 ve Grup 3 24. saatte yara alanını tamamen kapatırken; Grup 2 %69'luk bir alanı kapatabilmiştir. Grup 4 ise bu sürede çoğalarak yalnızca %14'lük bir alanı daha kapatarak toplamda sadece %34'lük bir yara alanını kapatabilmiştir.

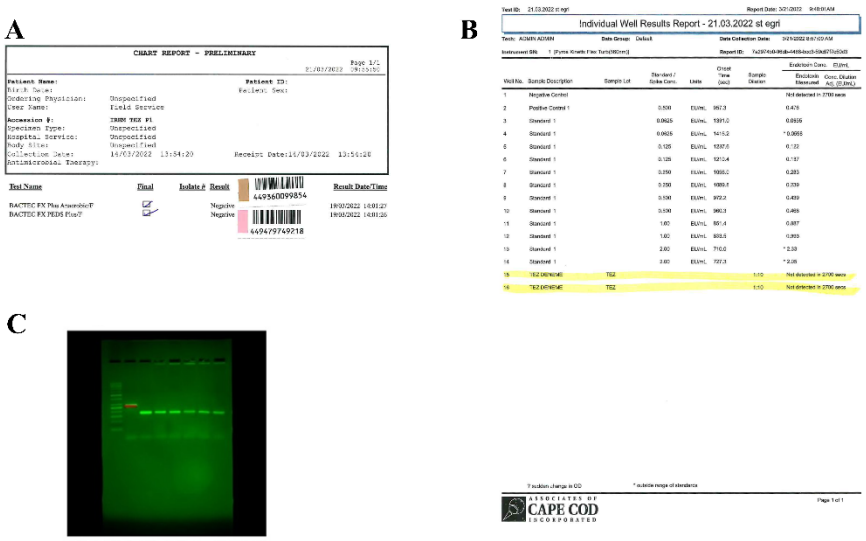
Tablo 4. 4. Son ürün haline getirilen hücrelerin göç ve çoğalmasını analiz edebilmek amacıyla 6., 12. ve 24. saatlerdeki yara alanı kapanma oranları.

Gruplar/Saat	6. saat	12. saat	24. saat
Grup 1	%44	%72	%100
Grup 2	%10	%28	%69
Grup 3	%15	%52	%100
Grup 4	%15	%20	%34

Karşılaştırmalı analiz, Grup 1'in yara iyileşme testinin başlamasından 12 saat sonra yarayı kapatmada diğer gruplardan önemli ölçüde daha etkili olduğunu gösterdi ($p<0,001$).

4.2.10. Mikoplazma, sterilite ve endotoksin analizleri

Yapılan analizlere ek olarak, hücrelerde mikoplazma tayini yapıldı ve elde edilen son ürünler üzerinde sterilite ve endotoksin analizleri de gerçekleştirildi. Elde edilen hücrelerin mikrobiyolojik olarak belirlenen spesifikasyonları karşıladığı ve insanlarda İTTÜ kullanımına uygun olduğu görüldü (Şekil 4. 22.). Bakteriyel kontaminasyon varlığını analiz eden BACTEC sonucu negatifti. Ayrıca, endotoksin testinde 2700 sn içinde tespit edilebilir endotoksin bulunmadı (0 EU/mL). Hücrelerin hepsi mikoplazma açısından negatifti.



Şekil 4. 22. Hücrelerde gerçekleştirilen mikoplazma tayini, sterilite testi ve endotoksin testi sonuçları. Hücreler mikrobiyolojik açıdan serbest bırakma kriterlerini karşılamıştır. Sterilite sonuçları negatif çıkmış, mikoplazma kontaminasyonuna rastlanmamış ve son ürünlerde endotoksin tespit edilmemiştir.

5. TARTIŞMA

MKH'ler, terapötik potansiyelleri nedeniyle translasyonel tıp ve klinik çalışmalarda büyük ilgi görmektedir. Bu hücreler birçok erişkin dokudan elde edilebilirler, teratojenik ve immunojenik değildirler ve bu nedenle de hücre tabanlı rejeneratif tedavilerde ön plana çıkmaktadırlar. Göbek kordonu dokusu, özellikle WJ, MKH izolasyonu için kemik iliğine önemli bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır ve bol miktarda bulunabilir olması, invaziv bir işlem gerektirmemesi, tedarik kolaylığı (Chatzistamatiou vd., 2014; Batsali vd., 2013), diğer MKH kaynaklarında bulunmayan HLA-G6'yı ifade etmesi (Marino vd., 2019), diğer MKH kaynaklarına göre daha yüksek proliferasyon özelliği göstermesi (Kim vd., 2013; Fazzina vd., 2015; Marquez-Curtis vd., 2015; Watson vd., 2015) ve yetişkin kök hücre sınıfında yer almasına rağmen embriyonik döneme ait genlerin ifadesine sahip olması (Batsali vd., 2013; Fazzini vd., 2015) onları daha avantajlı bir kaynak haline getirmiştir (Subramanian vd., 2015). WJ-MKH'leri hem enzimatik hem de eksplant olarak iki farklı şekilde izole edilebilir (Stefańska vd., 2020). FDA tarafından insan klinik deneyleri için "minimal düzeyde manipüle edilmiş" hücrelerin kullanılması tavsiye edilmiştir. Bu bağlamda, daha erken pasajlar ile göreceli olarak daha kısa sürelerde yeterli sayıda MKH üretmek önemlidir (Jung vd., 2012). Klinik tedaviler için gereken miktarları karşılamak üzere MKH'ler *in vitro* olarak genişletilir ve daha sonra bankacılık amacıyla kriyoprezerve edilir (Galipeau & Sensébé, 2018).

MKH'ler Avrupa Komisyonu'nun 1394/2007 sayılı tüzüğü uyarınca EMA tarafından İTTÜ (ATMP) olarak kabul edilmektedir ve terapötik ürünün tekrarlanabilirliğini, etkinliğini ve güvenliğini sağlamak için İİU yönergelerine uygun olarak üretilmelidir (Fekete vd., 2012; Torre vd., 2015; Bakopoulou vd., 2017; Mebarki vd., 2021). Tanımlanan İİU standartları, hücrelerin standart bir üretim prosedürünü takiben en yüksek kalitede sterilite, kalite kontrol ve dokümantasyon standartları altında üretilmesini sağlar (Fekete vd., 2012).

Hücresel tedavilerde başarı oranı; hastalık (El-Kadiry vd., 2021), doğru hasta seçimi, hastanın yaşı, uygulanacak hücre kaynağı, uygulama yolu, doğru dozun belirlenmesi gibi etkenlere bağlı olmakla beraber (Hoang vd., 2022) büyük oranda tedavide kullanılan hücrelerin kalitesine de bağlıdır. Bu nedenle istenilen dokudan hücreleri başarılı bir şekilde izole etmek, verimli bir şekilde *in vitro* kültüre ederek

çoğaltmak ve klinik kullanım için hazır hale getirildiklerinde de tüm MKH özelliklerini korumaya devam etmesi hücresel tedaviler için oldukça önemlidir.

Şu anda ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri (www.clinicaltrials.gov) tarafından derlenen bir veri tabanında MKH ile ilgili 1400'den fazla klinik çalışma kayıtlı olmasına rağmen, MKH'lerin klinik kullanım için hazırlanma şekli ve prosedürlerinde önemli farklılıklar görülmektedir (Bakopoulou vd., 2017). Klinik çalışmalarda, MKH'ler taze ve kriyoprezerve edilmiş hücreler dahil olmak (Hanley, 2015; Moll vd., 2014; Cruz vd., 2015; Moll vd., 2016; Mastrolia vd., 2019; Oja vd., 2019; Jere vd., 2021; García-Bernal vd., 2021) üzere farklı ürün gruplarından elde edilebilir. Taze son ürünler, donmuş hücrelerin çözülmesi, 3-4 gün boyunca kültüre edilmesi ve planlanan günde son ürüne dönüştürülmesiyle hazırlanır. Alternatif olarak, GVHD veya COVID-19 vakaları gibi acil durum senaryolarında, acil talep nedeniyle hücreler doğrudan çözülür ve ara kültür adımı atlanarak son ürünlere hazırlanır. Ayrıca, COVID-19 pandemisi sırasında, bazı son hücre ürünleri hasta kayıpları nedeniyle kullanılamamış ve gelecekte potansiyel kullanım için yeniden kriyoprezerve edilmiştir. Sonuç olarak, çeşitli son ürün hatları şu anda hastalarda kullanılmaktadır ve bu hücreler üzerinde tüm işlevsel değerlendirmeler yapılmamıştır.

Bu çalışmada, şu anda klinik kullanımda olan farklı ürün gruplarından elde edilen klinik sınıf MKH son ürünleri üzerinde kapsamlı analizler gerçekleştirilmiş ve bu son ürünler karşılaştırılarak tartışılmıştır. Buradaki amaç, son ürünler arasındaki potansiyel kalite farklılıklarını ve bunların klinik uygulamalar için uygunluğunu araştırmaktır. Göbek kordonunun Wharton jeli bölgesinden eksplant kültür yöntemi kullanılarak hücreler izole edildikten sonra, İİU koşulları altında 3. pasaja kadar kültüre edilmiş ve akım sitometrisi ile immünofenotipleme, RT-PCR ile gen ekspresyon analizi ve TRAP ve ELISA yöntemi ile telomeraz enzim aktivitesi dahil olmak üzere ilk karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. İlgili son ürünler elde edilmeden önce bu hücrelerin klinik kullanıma uygunluğunu teyit etmek için ayrıca mikoplazma, sterilite ve endotoksin testleri de yapılmıştır.

Hücre canlılık analizi, istenen hücre sayısı ve canlılığa ulaşmak için birden fazla kriyotüpün çözdürülmesi gereken Grup 4 hariç tüm gruplarda çözdürme sonrasında canlılığın korunduğunu ortaya koymuştur. Grup 3 ve 4 için çözdürme sonrası ortalama canlılık sırasıyla %85,8 ± 5,99 ve %81,0 ± 4,43 iken, Grup 1 ve 2 için taze hazırlanmış son ürünlerin ortalama canlılığı sırasıyla %94,2 ± 1,54 ve %92,8 ± 3,17 olmuştur. FDA

≥%70 ve EMA ≥%80'i son ürün canlılığı için serbest bırakma kriteri olarak kabul etmektedir (Guadix vd., 2019), sonuçlar dondurma-çözdürmenin hücre canlılığını olumsuz etkilediğini göstermekte ve diğer çalışmaları desteklemektedir (Antebi vd, 2019; Chinnadurai vd., 2014; Mohyeddin Bonab vd., 2021; Park vd., 2018).

Cooper ve Viswanathan tarafından WJ-MKH'leri ile yapılan bir çalışmada dondurulmadan önce hücre canlılıkları %98-99 iken, hücreler sıvı azotta dondurulup 1 ay, 6 ay, 1 yıl, 2 yıl ve 3 yıl sonra çözdürülerek tekrar analiz edildiklerinde hücre sayısında ve canlılığında göz ardı edilebilir bir düşüş gösterdiği rapor edilmiştir (Cooper & Viswanathan, 2011). Chinnadurai ve arkadaşlarının kriyoprezervasyonun Kİ-MKH'lerin işlevsel özelliklerini ne ölçüde etkilediğini daha fazla açıklığa kavuşturmak için yaptığı bir çalışmada ise, dondurma sonrası çözülen hücrelerin bağlanma potansiyeli, *in vitro* kültüre edilmekte olan taze MKH'lerin potansiyeli ile karşılaştırılmış. Beş farklı donörden alınan erken pasaj (P3-P5) MKH'lerin taze hücreler için canlılık %92 ± %2,51 iken; çözülmeden hemen sonra canlılıkta küçük ama önemli bir azalma olduğu ve %87 ± %2,76'ya düştüğü raporlanmış (Chinnadurai vd., 2014). Ding ve arkadaşlarının Kİ-MKH'ler üzerinde yaptığı bir başka çalışmada, taze hücrelerle (%92,58 ± 0,5) karşılaştırıldığında, dondurulmuş-çözülmüş hücrelerin (%83,77 ± 1,4) hücre canlılığında yaklaşık %10'luk bir azalma görülmüş (Ding vd., 2024). Hücre canlılığının dondurma işlemlerine maruziyet ile bir dereceye kadar tehlikeye girmesi beklenebilir. Bazı çalışmalar canlılık oranlarının %50 kadar düştüğünü bildirirken, diğerleri ise çözülme sonrası canlılığın %90'a kadar korunduğunu bildirmiştir (Antebi vd., 2019). Çalışmalar arasında bu farklılıklar doku kaynağına, kriyoprezervasyon ve çözdürme yöntemine, depolama süresine ve kullanılan reaktiflere bağlıdır. Bunun yanı sıra, çözdürme işlemi sonrasında hücre canlılığının değerlendirilmesi standardizasyondan yoksundur (Chabot vd., 2017); bazı çalışmalarda tripan mavisi ile dışlama yöntemini kullanılırken, bazılarında akım sitometrisi veya otomatik cihazlar kullanılmıştır. Bu da farklı çalışmalar arasındaki sonuçların karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır (Chabot vd., 2017). Ayrıca, çözdürme sonrası canlılığı korunan hücrelerin işlevsel olarak bozulabileceğini çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Francois vd., 2012; Moll vd., 2014; Chinnadurai vd., 2016; Chabot vd., 2017). Dolayısıyla çözülme sonrası canlılığın MKH potansiyelini tahmin etmek için en iyi belirteç olmayabileceğini öne sürülmektedir (Chabot vd., 2017).

Bununla birlikte, donmuş MKH'lerin önemli bir kısmı, donma-çözülme süreci sırasında apoptoza maruz kalabilir (Cruz vd., 2015). Chinnadurai ve arkadaşlarının yaptığı aynı çalışmada, Annexin V/PI boyaması sonuçları, apoptoza uğramış MKH yüzdesinin, canlı MKH'lere kıyasla dondurulmuş-çözdürülmüş MKH'lerde her zaman daha yüksek olduğunu göstermiştir (Chinnadurai vd., 2014). Ding ve arkadaşlarının çalışmasında ise AnnexinV-FITC/PI boyaması ile yapılan akım sitometri analizi sonuçları taze hücrelere kıyasla dondurulup çözdürülmüş hücrelerde apoptotik hücrelerin %10~15 arttığını göstermiştir (Ding vd., 2024). Antebi ve arkadaşlarının Kİ-MKH'ler üzerinde yaptığı çalışmasında, canlı hücre yüzdesi dondurulup-çözdürülen hücrelerde, çözme sonrası 24 saat *in vitro* kültüre edilerek iyileşme fırsatı verilen hücrelere ve *in vitro* kültüre edilen taze hücrelere kıyasla önemli ölçüde düşük olarak bulunmuş. Buna paralel olarak, apoptotik ve nekrotik hücre yüzdesi dondurulup-çözdürülen MKH'lerde diğer iki gruba kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olarak rapor edilmiş. Bu veriler bizim çalışmamız ile uyum içerisindedir. Çalışmamızda Grup 1 (%8,57 ± 0,65) ve Grup 2 (%8,10 ± 0,40)'ye kıyasla Grup 3 (%13,70 ± 0,40) ve Grup 4'te (%15,50 ± 0,20) önemli ölçüde daha yüksek oranda apoptotik ($p<0,0001$) ve nekrotik ($p>0,05$) hücre gözlenmiştir. Bu bulgular, Grup 3 ve 4 için kullanılan kriyoprezervasyon yöntemlerinin taze son ürünlere kıyasla daha fazla apoptotik hücreye neden olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, dondurulup çözme işlemleri hücrelerde apoptozu indükler, apoptoza bağlı olarak hücre canlılığı ve canlı geri kazanım oranını azaltır. Ding ve arkadaşları bu durumu ROS üretiminin artan ifadesinin hücre apoptozunun, DNA hasarının/onarımının ve hücre döngüsü durmalarının nedenlerinden biri olabileceğini savunmuşlardır (Ding vd., 2024).

Moll ve arkadaşları dondurulup çözülen MKH'lerin anlık kan aracılı enflamatuar reaksiyonu aktive etmeye daha yatkın olduğu ve kompleman lizisine karşı daha fazla hassasiyet gösterdiğini raporlamıştır (Moll vd., 2014). Bu da terapötik MKH sağkalımını tehlikeye attığını düşündürmüştür. Kompleman aktivasyonunun apoptotik ve nekrotik hücre özelliklerinin artmasına ve sonuç olarak MKH'lerin lizisine yol açtığı, uzun vadeli engraftman etkilenmese bile, özellikle erken pasajda taze MKH'ler kullanıldığında bu hücrelerin daha iyi terapötik etkinler gösterebileceği raporlanmıştır (Moll vd., 2014). François ve arkadaşları, dondurma işlemi sonrası MKH'lerin canlılıklarında düşüş olduğu, bu nedenle de inflamatuar uyaranlara tepki verebilecek hücre sayısının azaldığı bildirilmiştir (François vd., 2012). Bu hücresel debrisin, ortak

kültür deneylerinde ise T hücrelerin hiper-proliferasyonuna neden olduğu da raporlanmıştır. François ve arkadaşları, çözülme sonrası 24 saatlik bir *in vitro* kültür sürecinin hücrelerinin erken apoptozunu tersine çevirebileceğini ve Annexin-V pozitif hücrelerin *in vivo*'da fagositler tarafından temizlenmesinin önlenebileceğini raporlamıştır (François vd., 2012). Standart canlılık analizleri yalnızca ölü hücreleri boyayarak tespit eder ve erken apoptotik hücreleri hesaba katmaz. Bu nedenle, klinik uygulama zamanı dondurulup-çözülmüş hücrelerin canlılığı, büyük olasılıkla olduğundan fazla tahmin edilmektedir (Francois vd., 2012). Bu nedenle bu çalışmada biz apoptoz analizlerini son ürünlerin son kullanma tarihi olarak daha önceki validasyon çalışmalarımızda belirlenen 48 saatlik sürenin sonunda gerçekleştirdik. Son ürün haline getirildikten 48 saat sonra yapılan apoptoz analizine göre Grup 1 ve Grup 2 hücrelerinin canlılıkları, Grup 3 ve Grup 4 canlılıklarına göre daha yüksek bulunmuş (sırasıyla; %90,45 ± 0,62, %90,57 ± 0,53, %85,5 ± 0,16 ve %83,52 ± 0,19); Grup 3 ve Grup 4'teki hücrelerde sırasıyla %13,7 ± 0,40 ve %15,50 ± 0,20 ile önemli ölçüde daha yüksek apoptoz oranları elde edilmiştir. Klinik kullanım öncesi yüksek canlılığa ve düşük apoptotik hücre yüzdesine sahip hücrelerin elde edilmesi, klinik etkinin en yüksek düzeyde sağlanabilmesi için bir ön basamak olarak düşünülebilir. Bu bağlamda hücrelerin son ürün haline getirilmeden önce bir süre *in vitro* kültür ortamında kültüre edilmeleri klinik açıdan daha verimli sonuçların elde edilmesini sağlayabilir.

Canlılık analizlerine ek olarak Grup 1 ve Grup 2 hücreleri için popülasyon iki katına çıkma süreleri (PDT'ler) hesaplanmış ve bu gruplar arasında PDT'lerde önemli bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$), bu da incelenen deneysel koşullar arasında nispeten tutarlı *in vitro* genişleme özelliklerine işaret etmektedir. Bununla birlikte, Grup 3 ve Grup 4 hücrelerinin son ürün haline getirilirken herhangi bir *in vitro* kültür sürecine tabi tutulmaması ve bu nedenle *in vitro* genişleme özelliklerinin bu analiz kapsamında bilinmediğini vurgulamak gerekmektedir. Bu nedenle, bu hücrelerin derecelendirilmesinde *in vitro* genişleme derecelerinin uygulanabilirliği belirsizliğini korumaktadır. Tez çalışmasının asıl amacı klinikte hali hazırda kullanılmakta olan son ürünleri karşılaştırmalı olarak analiz etmek olduğundan; Grup 3 ve Grup 4 hücreleri PDT hesaplaması yapmak için ayrıca tekrar kültüre edilmemiştir. Bununla beraber, *in vitro* yara iyileşmesi için kültüre edilmeleri sırasında hücre yapışması ve ardından prolifere olarak konfluensiye ulaşmaları sırasında Grup 3 hücrelerinde bir sorunla

karşılaşılmamışken Grup 4 hücrelerinin %100 konfluensiye ulaşması diğer gruplardaki hücrelere göre daha uzun sürmüştür (+1 gün). CFSE ile canlılık ve proliferasyon analizine göre de Grup 4 hücrelerinin proliferasyonu diğer gruplara göre sorunluydu. Grup 4 hariç tüm gruplarda boya konsantrasyonu beklendiği gibi günler içinde azalırken; bu grupta floresan seviyeleri 4 günlük süre boyunca diğer gruplara göre nispeten yüksek kaldı. Bu da diğer gruplara kıyasla proliferatif aktivitede önemli bir azalmaya işaret etmiştir. CFSE analiz sonuçlarına göre, Grup 4'te ilk 2 gün boyunca proliferasyon gözlenmiş ve sonrasında durmuştur.

ISCT'ye göre, akım sitometrisi ile ölçüldüğünde, MKH popülasyonunun ≥ %95'i CD105, CD73 ve CD90'ı ifade etmelidir. Ayrıca, bu hücreler CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA sınıf II ifadelerinden yoksun olmalıdır (≤ %2 pozitif) (Dominici vd., 2006). Bahsoun ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılan sistematik bir analize göre, kriyoprezervasyonun Kİ-MKH'ler üzerinde canlılık ve apoptoz, hücresel bağlanma, immünomodülasyon ve metabolizma üzerinde etkisi olduğu, ancak, proliferasyon, morfoloji, farklılaşma veya immünofenotipleme üzerinde neden olduğu önemli ortak bir etki bildirilmemiştir (Bahsoun vd., 2019). Yine Bahsoun ve arkadaşları tarafından 2020 yılında Kİ-MKH'ler üzerinde yapılan bir çalışmada, taze hazırlanan hücrelerde CD90 ifadesinin dondurulup çözdürülmüş hücrelere kıyasla daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada üç farklı vericiden elde edilen hücreler analiz edilmiş ve iki vericiye ait sonuçlarda bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu nedenle araştırmacılar, kriyoprezervasyon etkisinin donöre bağlı olabileceğini düşünmektedir (Bahsoun vd., 2020). Oja ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise Kİ-MKH'lerinin dondurma-çözme işlemi sonrasında pozitif belirteçleri ≥95 olarak ifade ettiği, negatif belirteçleri de ≤2 ifade ettiğini ancak HLA-DR ifadesinin %2'den yüksek olduğunu ifade etmiştirler (Oja vd., 2019).

Taze hücreler, taze çözülmüş hücreler ve dondurma-çözdürme işleminin ardından 24 saat *in vitro* kültüre edilen Kİ-MKH'ler kullanılarak Antebi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada akım sitometri analizi, taze çözülmüş hücrelerde CD44 (%88) ve CD105 (%91) yüzey belirteçlerinin ekspresyonunun azaldığı, diğer iki grupta ise yüzey belirteçlerinin ifadesinin %95'in üzerinde korunduğu; CD73 ve CD90 ifadesinin değişmeden kaldığı (≥95); hiçbir grupta ise doku faktörü (CD142, pro-trombojenik eğilimin göstergesi) ifadesinin tespit edilmediği rapor edilmiştir (Antebi vd., 2019).

Chabot ve arkadaşları tarafından WJ-MKH'ler üzerinde yapılan bir çalışmaya göre ise, taze ve dondurulup çözülen hücreler immunfenotipik açıdan bir fark göstermemiştir (Chabot vd., 2017). Bunun yanında taze MKH'ler ve dondurulup çözülen hücrelerin canlılık, işlevsellik ve bütünlük açısından bir fark göstermediği de rapor edilmiştir (Chabot vd., 2017). Ding ve arkadaşları ise immunfenotipik özellikleri açısından iki grup arasında bir fark görmezken; hücre canlılığının dondurulup-çözdürülen hücrelerde azaldığını raporlamıştır (Ding vd., 2024). Benzer şekilde Bárcia ve arkadaşlarının umblikal kord MKH'ler üzerinde yaptığı çalışmada hücrelerin immunfenotipik özellikleri arasında bir fark görülmemiştir (Bárcia vd., 2017).

Bizim çalışmamızda ise akım sitometrisi ile immünofenotipik karakterizasyon sonuçları, P3 hücrelerinin CD90, CD105, CD44, CD73 için pozitif ve HLA-DR, CD14, CD11b, CD34, CD19, CD45 ve CD79a için negatif olan karakteristik MKH yüzey belirteçlerini ifade ettiğini doğrulamıştır. Daha da önemlisi, son ürünlerin fenotipik özellikleri akım sitometrik analizle doğrulandığı üzere kriyoprezervasyon süresinden (Grup 3 ve Grup 4) bağımsız olarak korunmuş ve tüm son ürünler serbest bırakma kriterlerini karşılamıştır.

Hücre sayımı, canlılık, akım sitometrisi, mikoplazma, mikrobiyolojik analiz ve endotoksin testleri dahil olmak üzere serbest bırakma öncesi değerlendirmeler, hasta uygulamasına yönelik hücreler üzerinde gerçekleştirilmiş ve son ürünler olarak analiz edilmiştir. Gen ekspresyonu ve telomeraz testleri ise stok olarak hazırlanan ana hücre hattından (P3 hücreleri=Grup 1) analiz edilmiş ve kabul kriterlerine uygunlukları gösterildikten sonra diğer son ürün serileri oluşturulmuştur. Sonuç olarak, daha önceki çalışmalarda bu testler diğer son ürün serilerinde (Grup 2, Grup3 ve Grup 4) piyasaya sürülmeden önce yapılmamıştır. Buna dayanarak, bu çalışmada tüm son ürünlerde gen ekspresyonu ve telomeraz enzim aktivitesi analiz edilmiş ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak tartışılarak her bir son ürünün kalitesi ve klinik uygulamalar için uygunluğunu kapsamlı bir şekilde değerlendirmek amaçlanmıştır. Ek olarak, gen ekspresyon profilleri, telomeraz enzim aktivitesi ve diğer ilgili parametreler arasındaki potansiyel korelasyonları keşfetmek için daha fazla değerlendirme yapılmış ve çeşitli son ürün serilerindeki MKH'lerin işlevsel özellikleri hakkında değerli bilgiler sağlanması amaçlanmıştır.

Bu bağlamda yapılan gen ekspresyonu analizleri sonucunda elde edilen RT-PCR verileri, gruplar arasında önemli kök hücre ve farklılaşma ile ilgili genlerin ifadesinde

kayda değer farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Grup 1-3 nispeten benzer ifade profilleri sergilerken, Grup 4 analiz edilen 22 genden 11'inde değişmiş ifade göstermiştir. Grup 4'te ENG, POU5F1, VCAM1, BMP4, ZFP42 ve HLA-G gibi genler için ekspresyon eksikliği, diğer gruplara kıyasla tehlikeye atılmış kök hücre ve farklılaşma potansiyeline işaret edebilir. Ayrıca, Grup 4'te NES, SMURF1, ICAM1 ve JAG1'in diferansiyel ekspresyonu hücre kaderi, göç ve hücreler arası sinyal iletişimini yöneten yolakların potansiyel düzensizliğine işaret etmektedir. Grup 4'teki bu gen ifadesi değişiklikleri, potansiyel olarak doğrudan kriyoprezervasyon işlemi sırasında kilit düzenleyici ağlardaki bozulmalardan kaynaklanan azalmış proliferasyon, göç ve yara iyileşme kapasiteleri gibi gözlemlenen işlevsel bozukluklarla uyumludur.

Benzer şekilde Antebi ve arkadaşları kriyoprezervasyon ve çözdürmenin etkilerini MKH yanıtı, doku hasarı, apoptoz, pluripotensi, anjiyogenez ve anti-enflamatuar işlevi ile ilgili genler açısından değerlendirmiştir. Gen ekspresyon analizi, dondurulup-çözdürülmüş MKH'lerde diğer iki gruba kıyasla doku yaralanmasıyla ilişkili genlerin (HMGB1 ve reseptörü TLR-4) ifadelerinde düşüş olduğunu; apoptozla ilişkili genlerin (BCL-2, BAX ve sitokrom C) ifadelerinde ise, taze hücrelere kıyasla çözdürme sonrası 24 saat kültüre edilerek iyileşme fırsatı tanınan hücrelerde ve dondurulup-çözdürülen hücrelerde önemli ölçüde düşüş olduğunu raporlamıştır. Kök hücre ilişkili genlerin (SOX2 ve OCT-4) ise, taze hücrelere kıyasla diğer iki grup hücrede ifadesinin azaldığı bildirilmiştir. Benzer şekilde adezyon ilişkili genlerin ifadesi de bu gruplarda azalmış. Diğer iki gruba kıyasla 24 saat kültüre edilerek iyileşme fırsatı tanınan hücrelerde anti-enflamatuar genler (TSG-6 ve HMOX-1) ve ile anjiyogenez geni VEGF'de anlamlı artış görülmüştür. Proinflamatuvar TNF-α geni hem bu grup hücrelerde hem de dondurulup-çözdürülmüş hücrelerde önemli ölçüde azalmıştır (Antebi vd., 2019).

Hoogduijn ve arkadaşları tarafından adipoz doku kaynaklı MKH ile yapılan bir çalışmada MKH gen ifadesi, taze hücreler, kriyoprezerve edilmiş hücrelerin çözülmesinden sonra ve farelerde IV uygulamadan sonra akciğerlerde tutulan MKH'lerde mRNA dizilimi kullanılarak analiz edilmiş. Dondurulmuş-çözdürülmüş MKH'ler ve *in vitro* kültüre edilen taze MKH grupları arasında, önemli ölçüde farklı ifade gösteren 294 gen rapor edilmiş. Dondurulup çözdürülen hücrelerde, hücresel çoğalmanın engellenmesi ve büyümenin durdurulmasının indüklenmesinde rol oynayan bir dizi bireysel gen ifadesi artmış, ancak hücre sağkalımı veya hücre apoptoz

yolaklarının diferansiyel ekspresyonunu ortaya koymamıştır. MKH'lerin dondurulup çözülmesinin doğuştan gelen bağışıklık yolakları üzerinde etkisi olduğu raporlanmıştır (Hoogduijn vd., 2016). Park ve arkadaşlarının adipoz doku kaynaklı MKH'ler üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada, dondurulup çözdürülen hücreler ile taze hücreler arasında büyüme, immünofenotipik karakterizasyon, gen ifadeleri ve farklılaşma potansiyelleri arasında bir fark görülmeyip, bu hücrelerin kök hücre özelliklerini korudukları rapor edilmiştir (Park vd., 2018). Bu veriler ışığında, sonuçlarımızın literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Telomeraz enzim aktivitesi analizi, Grup 1'den (%100) Grup 4'e (%11,12) ilerleyen bir düşüş olduğunu, Grup 2 (%85,43) ve 3'te (%39,90) ise orta seviyelerde olduğunu ortaya koymuştur. Grup 1, aktif olarak çoğalan kültürlenmiş MKH'lerle tutarlı olarak en yüksek telomeraz aktivitesini sergilemiştir ve üstün farklılaşma kapasitesi ve immünomodülatör özelliklerin göstergesidir (Lupatov vd., 2022). Grup 2, Grup 1'e kıyasla göreceli telomeraz aktivitesinde yalnızca mütevazı bir azalma göstermiş, bu da proliferatif mekanizmalarının büyük ölçüde korunduğunu düşündürmüştür. Bununla birlikte, kriyoprezervasyon adımlarını içeren Grup 3 ve 4, Grup 4'ün en düşük seviyeleri sergilemesiyle önemli ölçüde daha düşük telomeraz aktiviteleri sergilemiştir. Bu veriler, kriyoprezervasyonun, özellikle de Grup 4 için kullanılan doğrudan dondurma yönteminin, telomeraz seviyelerini ve potansiyel olarak MKH'lerin uzun vadeli proliferatif ömrünü olumsuz etkilediğini düşündürmektedir.

İn vitro kültüre edilen veya çözülme sonrası iyileşme amacıyla 24 saat boyunca kültüre edilen hücreler ile karşılaştırıldığında, dondurulup-çözdürülmüş MKH'lerde DNA sentezinin tehlikeye girdiği Johnstone ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Johnstone vd., 2023). Verilerimiz literatür ile uyumlu olup; çalışmamızda Grup 4, Grup 3'e kıyasla biraz daha yüksek apoptoz yaşamıştır ve hücre döngüsü verileriyle uyumlu olarak Grup 4'ün işlemden sonra doğrudan kriyoprezervasyonunun hücreler için daha yıkıcı olabileceğini düşündürmektedir.

Johnstone ve arkadaşları, Kİ-MKH'ler ile yaptıkları güncel bir çalışmada çözülmeden hemen sonra, taze hücrelere kıyasla kriyoprezerve hücrelerin apoptoz ve canlılığı açısından bir fark görmemişlerdir. Apoptotik (Annexin V+/DAPI-) ve ölü (DAPI+) hücrelerin yüzdesinin kültürde zamanla arttığı, yaklaşık 4 saat içinde sırasıyla %9,5 ± 0,48 ve %10,0 ± 3,8 ile zirve yaptığı ve çözülmeden hemen sonrasına

kıyasla önemli ölçüde yüksek bulunduğu belirtilmiştir. 4 saat içinde canlı hücre yüzdesi %94 ± 0,12'den %81 ± 3,3'e düşmüş. Araştırmacılar, çözülme sonrası hemen yapılan analizlerin hücre sağlığının güvenilir bir belirleyicisi olmayacağını, hücrelerin besin açısından zengin koşullarda kültürlendiğinde bile zaman içinde önemli ölçüde azaldığını öne sürmüştür (Johnstone vd., 2023). Araştırmacılar, kriyoprezervasyon kaynaklı DNA çift sarmal kırığına bağlı hücre ölümünün gecikmeli bir etki olduğunu ve ancak *in vitro* kültürün uzun sürmesiyle ortaya çıktığını özellikle vurgulayarak; bu durumun muhtemelen *in vivo* hücre kalıcılığının kinetiğini modellediğini savunmuştur. Bu nedenle, infüzyon için hücrelerin çözülme zamanına yakın bir aralıkta tek bir zaman noktasına dayanan canlılık değerlendirmelerinin, terapötik uygulamalar için kullanılan hücrelerin gerçek fizyolojik durumunun göstergesi olmayacağını savunmuşturlar. Benzer şekilde Pollock ve arkadaşları da Kİ-MKH'ler ile yaptıkları bir çalışmada, hücrelerin çözülme sonrası 48 saat boyunca kültürlendiğinde, hücresel popülasyon ikiye katlanmalarındaki farklılıkların daha belirgin hale geldiğini; dolayısıyla yalnızca çözülme sonrası iyileşme ve canlılığa bakıldığında büyümenin durması için bu potansiyelin gözlenmeyebileceğini öne sürmüştür (Pollock vd., 2015).

Falk ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada kriyoprezervasyonun S fazı replikasyonu sırasında tek sarmallı DNA'da kırılmalara neden olduğu raporlanmıştır. Başlangıçta tek sarmallı lezyonların oluştuğu, daha sonra DNA çift sarmal kırığı ve kromatin düzeninin bozulmalarının izlediği gösterilmiştir (Falk vd., 2018). Araştırmacılar apoptozu hücre döngüsü durumu ile ilişkili olarak araştırıp, bunu DNA sentezi ile ilişkilendirmiştir (Johnstone vd., 2023). Çözülmüş MKH'lerde DNA sentezinin tehlikeye girdiği görülmüş ve buradan yola çıkarak araştırmacılar S fazı hücrelerinin donma ve çözülmeden etkilendiği düşünmüştür.

Çalışmamızda hücre döngüsü analizi deney grupları arasında kayda değer farklılıklar ortaya koymuştur. Grup 1, yüksek G1 ve düşük S fazı popülasyonu ile tipik bir MKH profili sergilemiştir. Grup 2 hücreleri (P4), muhtemelen temas inhibisyonu veya besin tükenmesi nedeniyle zenginleştirilmiş bir G1 fraksiyonu göstermiştir. İlginç bir şekilde, Grup 3'teki P4 hücrelerinin kriyoprezervasyonu, Grup 2'ye kıyasla hücre döngüsü durumunu önemli ölçüde değiştirmemiştir, bu da dondurma-çözme işleminin tek başına minimum etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, hücrelerin çözdürülerek son ürün haline getirildikten hemen sonra

kriyoprezervasyona tabi tutulduğu Grup 4, Grup 1-3'teki düşük S fazı seviyelerinin aksine önemli bir S fazı artışı (%22,64 ± 0,36) sergilemiştir. Bu durum, hücrelerin son ürün halime getirildikten hemen sonra, bir ara kültür/iyileşme dönemi olmaksızın kriyoprezerve edilmesinin, potansiyel olarak mikroçevresel stresler nedeniyle daha fazla hücrenin anormal şekilde S fazına ilerlemesine neden olmuş olabileceğini düşündürmektedir. Grup 4'teki yüksek S fazı oranının MKH ürününün terapötik özellikleri üzerinde etkileri olabilir çünkü S fazında aktif olarak DNA kopyalayan hücreler sakin G1 durumuna kıyasla değişmiş proliferasyon, farklılaşma gücü ve salgı profilleri sergileyebilir. Son ürün sonrası 48 saatteki bulgularımıza göre, hücreler muhtemelen DNA hasarı onarımı için geçici bir hücre döngüsü gecikmesine uğradığından, kriyoprezervasyonu takiben ilk G0/G1 durmasına ilişkin önceki raporları desteklemektedir (Ding vd.,2024). Grup 4'ün önemli S fazı popülasyonu, dondurmadan önce G0/G1 kontrol noktasını başlatmak için yetersiz zaman olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar toplu olarak, kriyoprezervasyon yöntemlerinin MKH hücre döngüsü kinetiği üzerindeki etkisini ve sakin G1 fenotipini korumak için dondurmadan önce kültür/iyileşme için bir pencere sağlamanın önemini vurgulamaktadır.

İn vitro yara iyileşme deneyi sonuçları Grup 1 ve Grup 3 için 20 saat içinde etkili yara kapanması gösterirken, Grup 2 için 35 saat sürmüş ve Grup 4 48 saat sonra bile tam yara kapanması sağlayamamıştır. Tüm grupların başlangıçta bir miktar göç aktivitesi (6 ve 12 saat) sergilemesine rağmen, Grup 1 ve 3 için %100'e kıyasla Grup 4'ün 24 saatte sadece %34 yara kapanması sergilediği görülmüş ve 48 saat sonra bile tam yara kapanması sağlayamamıştır. Bu keskin fark, proliferatif potansiyelinin ciddi şekilde tehlikeye girdiğini göstermiştir. Bu bulgular hücre döngüsü ve apoptoz verileriyle uyumludur ve MKH'leri terapötik uygulamalar için kriyoprezerve etmeden önce işlem sonrası bir ekim dönemine izin vermenin önemini vurgulamaktadır. Ayrıca gen ekspresyon analizlerinde homing ile ilgili genlerden NES ve ICAM ile migrasyon ile genlerden VIM'in ifadelerindeki düşüş de Grup 4'ün yara alanını kapatamamasının bir nedeni olabilir. Bu sonuçlar son ürün elde edildikten hemen sonra hücrelerin dondurulmasının, proliferatif mekanizmalarını ve yara iyileştirme kapasitelerini olumsuz etkileyerek *in vivo* terapötik etkinliklerini önemli ölçüde engelleyebileceğini düşündürmektedir.

CFSE bulguları, hücre döngüsü analizi, apoptoz analizi ve *in vitro* yara iyileşmesi deneylerinden elde edilen sonuçlara göre; Grup 4, birden fazla analizde sürekli olarak bozulmuş proliferatif potansiyel göstermiştir. Bu durum bize, hücre döngüsü düzensizliği, artan apoptoz veya *in vitro* kültüre edilerek bir iyileşme dönemine olanak tanımaksızın dondurma işlemi sırasında proliferatif yolakların hasar görmesi gibi çeşitli faktörlere bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Büyüme faktörleri açısından değerlendirildiğinde literatürde genel olarak taze hücreler ile dondurulup çözülmüş hücreler arasında benzer bir profil olduğu görülmüştür (Gramlich vd., 2016; Samsonraj vd., 2015). Samsonraj ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada P4 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen analizler sonrası, büyüme faktörleri, sitokin salınımı, büyüme kapasiteleri arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Gramlich ve arkadaşları tarafından hücreler 48 saat boyunca kültüre edildikten sonra kondisyonlanmış besiyeri (CM) toplanarak 40 farklı büyüme faktörü analiz edilmiş. Bu çalışmada da genel olarak büyüme faktörü profillerinin dondurulup çözülmüş hücreler ile taze olarak elde edilmiş hücreler açısından benzer olduğu vurgulanmıştır (Gramlich vd., 2016). Bizim sonuçlarımız da literatürle uyumlu olup, gruplar VEGF-A, FGF2, Angp-1, HGF ve PEDF büyüme faktörleri açısından analiz edildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir ($p>0,05$). İlerleyen çalışmalarda mRNA düzeyinde analizler yapılarak bu veriler doğrulanabilir veya mRNA düzeyinde farklılıklar bulunması durumunda elde edilen sonuçlar ELISA sonuçları ve diğer analiz yöntemlerinden elde edilen veriler ile tartışılabilir ve literatüre önemli katkılarda bulunulabilir.

Yapılan literatür araştırmasında dondurma işleminin MKH'lerin immünomodülatör potansiyelleri üzerinde önemli etkilerinin olduğunu savunan ve bu süreçlerin hücrelerin potansiyeli üzerinde bir etkisi olmadığını savunan çelişkili sonuçların raporlandığı görülmüştür. Antebi ve arkadaşları, çözülen ve bir süre kültüre edilen hücrelerin diğer gruplara (taze kültüre edilmiş ve direkt çözülmüş) kıyasla TSG-6, VEGF-A ve HMOX-1 gen ifadelerinin önemli derece arttığını raporlamış ve kısa bir süre hücreleri *in vitro* kültüre etmenin terapötik etkilerini güçlendirebileceğini savunmuştur. Bu bulgu, hücrelerin T hücreler ile ortak kültürü sonrasında elde edilen sonuçlar ile de desteklenmiştir. Dondurma süresinden bağımsız olarak tüm grupların T hücre proliferasyonunu önemli derecede baskıladığı ancak çözüldükten sonra bir süre kültüre edilen hücrelerde diğer iki gruba göre önemli ölçüde daha fazla etki

gösterdiği raporlanmıştır. Direkt çözülerek analiz edilen grup ise en düşük etkiyi göstermiştir (Antebi vd., 2019). Araştırmacılar, dondurmanın hücrelerin immunosupresif potansiyellerini tehlikeye atabileceğini ancak bu hücrelerin hala işlevsel olarak aktif olduğunu ve en önemlisi hücrelerin çözüldükten sonra *in vitro* kültüre edilerek kendilerine gelmelerine fırsat tanınmasının kültürde hali hazırda taze olarak bulunan hücrelerden bile daha yüksek seviyelerde etkilere sahip olabileceğini savunmuştur (Antebi vd., 2019).

François ve arkadaşlarının Kİ-MKH'ler ile yaptıkları bir çalışmada, IFN- γ ile uyarılan taze çözülmüş MKH'lerin, kültüre edilmiş MKH'lere kıyasla çok düşük seviyelerde IDO protein ekspresyonu gösterirken, kültürün en az 24 saat boyunca geri kazanılmasının IFN- γ duyarlılığını ve IDO indüksiyonunu geri kazandırdığını raporlamıştır. Bu çalışmanın sonuçları dondurma çözme işleminin MKH'lerin immunosüpresif özelliklerini tersine çevrilebilir bir şekilde olumsuz olarak etkilediğini ve bunun çözme işlemi sırasında başlatılan bir ısı şoku stres yanıtı ile ilişkili olduğu göstermiştir (François vd., 2012).

Oja ve arkadaşları dondurup çözmenin hücreler üzerindeki etkisini araştırmak için hücreleri çeşitli pasajlarda dondurmuş ve yaptıkları immunosupresyon analizleri sonrası çelişkili sonuçlar elde ettiklerini raporlamıştır (Oja vd., 2019). Araştırmacılar tüm MKH ürünlerinin eşit olmadığını ve dondurulmuş-çözülmüş MKH'lerin taze MKH'lerden bir ölçüde farklı olabileceğini, ancak bu durumun dondurulan hücrelerin etkili olmayacağı anlamına gelmeyeceğini, yalnızca taze MKH'lerden farklı çalışabileceğini savunmuştur. Mevcut klinik veriler ışığında, etkinliği etkileyen nihai parametrenin aslında dondurma işlemi olmadığı, MKH'lerin üretim stratejilerindeki temel farklılıklar olabileceği yönünde yorumlamanın doğru olabileceğini raporlamıştır (Oja vd., 2019).

Moll ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada taze ve dondurularak çözülmüş MKH'ler arasında donör eşleştirmeli bir karşılaştırma yapılmış ve taze MKH'lerin 24 saatlik IFN- γ ile muamelesi sonrası dondurularak çözdürülmüş hücrelere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek IDO mRNA ekspresyonu gösterirken, hücrelerden toplanan besiyerinde (CM) düşük seviyelerde IDO proteini tespit edilmiştir (Moll vd., 2014).

Bunun yanı sıra dondurma çözme işlemlerinin hücrelerin immunosupresif özelliklerini etkilemediğini raporlayan birçok çalışma da bulunmaktadır. Burand ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, dondurulup çözülmüş hücrelerin enflamatuar uyaranlara karşı duyarlılığının değişmediğini, PBMC ile ortak kültüre edildiklerinde immun baskılama yeteneklerinin önemli bir değişime uğramadığını göstermiştir. Bu çalışmanın ardından araştırmacılar MKH'leri 24 ve 48 saat boyunca IFN-γ ile muamele edip dondurmuş ve ardından çözerek IFN-γ'lı besiyerinde *in vitro* kültüre etmiş, ardından IDO ekspresyon seviyelerini incelemiştir. Hücreler çözdürüldükten ve 48 saat kültüre edildikten sonra taze elde edilmiş MKH'ler ve IFN-γ ile daha önceden muamele edilmiş (toplam 72 saat muamele edilmiş) MKH'ler arasında fark bulunmadığı raporlanmıştır (Burand vd., 2017). IFN- γ ile uyarılan taze çözülmüş MKH'ler, kültüre edilmiş MKH'lere göre çok düşük seviyelerde IDO protein ekspresyonu gösterirken, kültürün en az 24 saat boyunca geri kazanılması IFN-γ duyarlılığını ve IDO indüksiyonunu geri kazandırmıştır (Gramlich vd., 2016;). Bu bulgular, dondurma çözme işlemlerinin MKH'lerin biyokimyasal yanıtının ve/veya protein sentez mekanizmasının tehlikeye girdiğini düşündürmektedir (Gramlich vd., 2016).

Bárcia ve arkadaşları, UCX® adını verdikleri ürünleri umblikal kod kaynaklı MKH'ler ile yaptığı bir çalışmada, dondurma işleminin hücrelerin immünomodülatör özellikleri üzerinde zararlı bir etkisi olmadığını göstermiştir. Çözme işleminin hücreler üzerinde fizyolojik etkileri olabileceği ve MKH'lerin farmasötik olarak uygunluğunu bir süreliğine bozabileceğinin söyleyen çalışmaların aksine, UCX® hücrelerinin çözülme sonrası bir süre kültüre edilerek iyileşme adımına ihtiyaç duymadığını, hücrelerin çözüldükten hemen sonra infüze edilebileceğini savunmuştur. Bunun nedenleri arasında, özel izolasyon süreçlerinde dokunun mekanik manipülasyonunun büyük ölçüde azaltılması olduğunu savunmuşturlar.

Hoogduijn ve arkadaşlarının AD-MKH'ler ile yaptığı bir çalışmada, hücrelerin işlevselliğinin 24 saatlik bir kültür döneminden sonra tamamen geri kazanıldığı raporlanmıştır. Bu çalışmada, hücreler çözüldükten 1 saat sonra sınırlı doğuştan gelen bağışıklık yolaklarında ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde rol oynayan genlerde değişiklikler olduğu raporlanmış. Kriyoprezerve edilmiş hücreler çözüldükten sonra 1 saat süspansiyonda tutulmuş ve bu koşulların hücre iskeleti protein ekspresyonunu artıran şekilde teşvik etmiş olabileceği savunulmuştur. Sürekli

kültürden elde edilen MKH ve dondurulmuş-çözdürülmüş MKH'ler, IV olarak fare akciğerine enjekte edildiğinde, sonuçların immünolojik yanıtlar açısından karşılaştırılabilir olduğu rapor edilmiştir. Benzer şekilde, Cruz ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (Cruz vd., 2015) da hava yolu enflamasyonunu iyileştirmede kriyoprezerve edilmiş ve sürekli kültüre edilen MKH''lerin etkileri arasında yalnızca sınırlı farklılıklar olduğu gösterilmiş ve her iki hücre grubunda da *in vivo* olarak eşit derecede etkili olduğu kavramı desteklenmiştir (Hoogduijn vd., 2016).

Bizim çalışmamızda, IFN- γ ile muamele sonrası hücrelerdeki HGF salınımı dondurma çözme işlemlerinden etkilenmemiştir. Ancak Grup 4'teki hücreler aynı gün içerisinde çözülüp tekrar dondurulduğundan Grup 3 hücreleri ile kıyaslandığında bu süreçten fazlasıyla etkilenmiştir. TGF-β salınımının da dondurup çözme işlemlerinden HGF'ye benzer şekilde etkilendiği görülmüştür. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 arasında bir fark görülmezken ($p>0,05$), Grup 4'ün salınımında bir miktar düşüş olmuştur ($p<0,01$). PGE2 salınımı hiçbir şekilde etkilenmemiştir ve tüm gruplarda eşit salgılanmıştır. IDO salınımı ise bu süreçlerden en çok etkilenen sitokin olmuştur. Grup 1 hücrelerine kıyasla Grup 2 ve Grup 3 hücrelerinde IDO salınımı anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,001$). P3'teki hücrelerde (Grup 1) 1,689 ng/mL iken, P4 hücrelerinde sırasıyla Grup 2 için 4,281 ng/mL; Grup 3 için 4,397 ng/mL'dir. Bu, pasaj sayısı arttıkça salınımın arttığına yönelik Cruz ve arkadaşlarının (Cruz vd., 2015) sonuçları ile uyumludur. P4'teki hücreler (Grup 2 ve Grup 3) incelendiğinde ise dondurup çözmenin aynı pasajdaki hücreler arasında IDO salınımı üzerinde bir etkisi olmadığı görülmüştür. Bu konuda daha önce de bahsedildiği gibi literatürde kesin bir sonuç yoktur. Literatürdeki bu farklılıkların kullanılan hücrelerin kaynağına, hücre kültürü işlemleri sırasındaki manipülasyonlara, kullanılan reaktiflere bağlı olabileceği düşünülmektedir. IDO salınımı Grup 4'te ise diğer gruplara göre daha az olup 0,9399 ng/mL olarak ölçülmüştür.

Antebi ve arkadaşları kök hücre genleri NANOG, SOX2 ve OCT-4, VCAM1 ve ICAM1 ve proinflamatuar gen TNF-α ifadelerinin, kriyoprezervasyonun ardından önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. VCAM-1, hem taze hem de dondurulmuş-çözülmüş hücrelere kıyasla 24 saat *in vitro* kültüre edilerek iyileşme fırsatını sunulan hücrelere göre önemli ölçüde azalmış. Bu azalan yapışma potansiyelinin, 'sitokin fırtınasının' bu proteinleri aşırı derecede aktive ederek hastalık sekellerine katkıda bulunduğu ARDS gibi inflamatuar endikasyonlar için faydalı olabileceğini

savunmuşturlar. Araştırmacılar elde edilen bu sonuçlar ile, kısa bir alışma süresinin MKH'lerin terapötik işlevini güçlendirdiğini gösterebileceğini savunmuşturlar (Antebi vd., 2019). Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, farklı hastalıklara yönelik olup hastalık özelinde farklı sonuçlar literatürde bulunmaktadır (Burand vd., 2017) Kriyoprezerve MKH'lerin, alerjik hava yolu inflamasyonu (Cruz vd., 2015) ve gözde iskemi/reperfüzyon hasarı (Gramlich vd., 2016) hastalık modellerinin tedavisinde etkili olduğunu gösterilirken fare bazlı kondrosite duyarlı bir biyo-analizde kondrojenik bir yanıtı indüklemede başarısız olduğu raporlanmıştır (Otsuru vd., 2015). İnsanlarda yapılan klinik çalışmalarda ise dondurulup çözülmüş MKH'lerin, kritik uzuv iskemisi için klinik çalışmalarda olumlu yanıtlar ortaya çıkardığı görülürken (Gupta vd., 2013), taze ve çözülmüş MKH tedavisi uygulanan GVHD hastalarının retrospektif analizine yönelik raporlar taze MKH'lerin daha etkili olduğunu göstermektedir (Moll vd., 2014). Bu bilgiler, dondurulup çözülmüş MKH'lerin bazı endikasyonlar için uygun olamayacakken bazı endikasyonlar için ise verimli olabileceğini düşündürmektedir. Bunun için bu tez çalışması ve benzer çalışmaların ardından *in vivo* hayvan çalışmaları yapılarak elde edilen veriler doğrulabilir ve insan çalışmaları öncesinde yeterli araştırma verileri elde edilerek faz çalışmalarına başlanabilir. Endikasyonlara özgü terapötik mekanizmalar hakkındaki bilgilerimiz arttıkça, MKH'lerin daha verimli kullanılmasına ilişkin *in vitro* kültür koşullarının ve dondurma-çözme tekniklerinin belirlenmesi ve geliştirilmesine yönelik çalışmalar hız alacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, yeni doğum yapmış gönüllü vericilerden alınan göbek kordonu ham dokusundan İİU koşullarında başarı bir şekilde WJ-MKH'leri izole edilmiş ve klinik kullanıma yönelik olarak işlenerek son ürün haline getirilmiştir. Üretim işlemleri boyunca bakteriyel, fungal veya mikoplazma kontaminasyonu ile karşılaşılmamıştır. İzole edilen hücreler öncelikle P3'e getirilerek immunfenotipik olarak analiz edilmiş, sonuçların spesifikasyonlar dahilinde olmasının ardından telomeraz enzim aktivitesi ve gen ekspresyonu analizleri ile karakterize edilmiştir. Günümüzde MKH'lerin klinik kullanımına yönelik olarak hazırlanan farklı son ürün serileri belirlenerek deney grupları oluşturulmuş ve bu araştırmanın temelini oluşturmuştur. Bu amaçla belirlenen spesifikasyonlara uygunluğu tespit edilen P3 hücreleri *in vitro* kültüre edilerek ve/veya dondurulup-çözdürülerek deney grupları oluşturulmuştur. 4 farklı deney grubu (son ürün serisi) üzerinde karşılaştırılmalı analizler gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analizler sonucunda son ürün haline getirilen hücrelerin hepsinin serbest bırakma kriterlerini karşıladığı, ancak yapılan ayrıntılı analizlerde gruplar arası farkların olduğu tespit edilmiştir. Hücrelerin canlılıkları dondurma işleminden etkilense bile bu etki serbest bırakma kriterleri açısından anlamlı bir farka neden olmamıştır. İmmunfenotipik olarak da gruplar arasında bir fark görülmeyip tüm gruplar serbest bırakma kriterlerini kolaylıkla karşılamışlardır. Gen ekspresyon seviyeleri analiz edildiğinde, Grup 4 hücrelerinde önemli farklar olduğu ve uygulanan üretim basamaklarının hücreler üzerinde önemli etkilere neden olduğu görülmüştür. Benzer şekilde telomeraz enzim aktivitesi de bu süreçlerden etkilenmiştir. Son ürün serbest bırakma süreçlerinde kullanılan canlılık analiz yöntemlerinin yanı sıra apoptoz analizinin de gerçekleştirilmesi gerekliliği bizim çalışmamızda da bir kez daha gösterilmiştir. Taze ürün grubunu oluşturan Grup 1 ve Grup 2'de apoptoza uğrayan hücre sayıları diğer gruplara göre çok daha azken, Grup 4'te bu oran yüksek bulunmuştur. Bu bulguları hücre döngüsü analizi de desteklemektedir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre, klinik kullanım öncesi bir süre *in vitro* kültür süresine tabii tutulan hücrelerin çok daha klinik kalitede olabileceği gösterilmiştir. Bugüne kadar gerçekleştirilen klinik deneme sonuçlarının değerlendirilmesi ile bu uygulamalardan kullanılan MKH son ürünlerinin hangi üretim basamakları sonrasında serbest bırakma iznine tabii olduğu detaylıca araştırılıp, bu

hücrelerin klinik etkileri hakkında yapılacak araştırmaların sonuçları, bizim *in vitro* temelli çalışmalarımızı destekleyecektir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

Abu-El-Rub, E., Khasawneh, R. R., Almahasneh, F., Altaany, Z., Bataineh, N., Zegallai, H., & Sekaran, S. (2021). Mesenchymal stem cells and COVID-19: What they do and what they can do. *World journal of stem cells*, *13*(9), 1318–1337. https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i9.1318

Adams, J. M., & Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in biochemical sciences*, *26*(1), 61–66.

V., Carias, R. B., Granjeiro, J. M., & Borojevic, R. (2014). Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem cell research & therapy*, *5*(2), 53. https://doi.org/10.1186/scrt442

Angelini, A., Castellani, C., Vescovo, G., & Thiene, G. (2004). Pathological evidence of stem cell regeneration in the heart. *International journal of cardiology*, *96*(3), 499–504. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2004.07.001

Antebi, B., Asher, A. M., Rodriguez, L. A., 2nd, Moore, R. K., Mohammadipoor, A., & Cancio, L. C. (2019). Cryopreserved mesenchymal stem cells regain functional potency following a 24-h acclimation period. *Journal of translational medicine*, *17*(1), 297. https://doi.org/10.1186/s12967-019-2038-5

Atluri, S. 2020. "Expanded Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (UC-MSCs) as a Therapeutic Strategy in Managing Critically Ill COVID-19 Patients: The Case for Compassionate Use. Pain physician" Pain Physician, 23(2), E71–E83.

Aurora, A. B., & Olson, E. N. (2014). Immune modulation of stem cells and regeneration. *Cell stem cell*, *15*(1), 14–25. https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.009

Aydoğdu, N., Öztel, O. N., & Karaöz, E. (2021). Isolation, Culture, Cryopreservation, and Preparation of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Final Cellular Product Under Good Manufacturing Practices-Compliant Conditions. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *2286*, 73–84. https://doi.org/10.1007/7651_2020_332

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Bacakova, L., Zarubova, J., Travnickova, M., Musilkova, J., Pajorova, J., Slepicka, P., Kasalkova, N. S., Svorcik, V., Kolska, Z., Motarjemi, H., & Molitor, M. (2018). Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnology advances*, *36*(4), 1111–1126. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.011

Bahsoun, S., Coopman, K., & Akam, E. C. (2019). The impact of cryopreservation on bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a systematic review. *Journal of translational medicine*, *17*(1), 397. https://doi.org/10.1186/s12967-019-02136-7

Bahsoun, S., Coopman, K., & Akam, E. C. (2020). Quantitative assessment of the impact of cryopreservation on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: up to 24 h post-thaw and beyond. *Stem cell research & therapy*, *11*(1), 540. https://doi.org/10.1186/s13287-020-02054-2

Bajada, S., Mazakova, I., Richardson, J. B., & Ashammakhi, N. (2008). Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, *2*(4), 169–183. https://doi.org/10.1002/term.83

Bakopoulou, A., Apatzidou, D., Aggelidou, E., Gousopoulou, E., Leyhausen, G., Volk, J., Kritis, A., Koidis, P., & Geurtsen, W. (2017). Isolation and prolonged expansion of oral mesenchymal stem cells under clinical-grade, GMP-compliant conditions differentially affects "stemness" properties. *Stem cell research & therapy*, *8*(1), 247. https://doi.org/10.1186/s13287-017-0705-0

Bárcia, R. N., Santos, J. M., Teixeira, M., Filipe, M., Pereira, A. R. S., Ministro, A., Água-Doce, A., Carvalheiro, M., Gaspar, M. M., Miranda, J. P., Graça, L., Simões, S., Santos, S. C. R., Cruz, P., & Cruz, H. (2017). Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells maintain immunomodulatory and angiogenic potencies after cryopreservation and subsequent thawing. *Cytotherapy*, *19*(3), 360–370. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.11.008

Batsali, A. K., Kastrinaki, M. C., Papadaki, H. A., & Pontikoglou, C. (2013). Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Current stem cell research & therapy*, *8*(2), 144–155. https://doi.org/10.2174/1574888x11308020005

Batsali, A. K., Pontikoglou, C., Koutroulakis, D., Pavlaki, K. I., Damianaki, A., Mavroudi, I., Alpantaki, K., Kouvidi, E., Kontakis, G., & Papadaki, H. A. (2017). Differential expression of cell cycle and WNT pathway-related genes

accounts for differences in the growth and differentiation potential of Wharton's jelly and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*, *8*(1), 102. https://doi.org/10.1186/s13287-017-0555-9

Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell*, *2*(4), 313–319. https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.03.002

Board on Health Sciences Policy; Board on Life Sciences; Division on Earth and Life Studies; Institute of Medicine; National Academy of Sciences. Stem Cell Therapies: Opportunities for Ensuring the Quality and Safety of Clinical Offerings: Summary of a Joint Workshop. Washington (DC): National Academies Press (US); 2014 Jun 18. 4, Comparative Regulatory and Legal Frameworks. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK223198/

Bouwens L. (1998). Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet beta-cells in the pancreas. *Microscopy research and technique*, *43*(4), 332–336. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19981115)43:4<332::AID-JEMT7>3.0.CO;2-1

Boyalı, O., Kabatas, S., Civelek, E., Ozdemir, O., Bahar-Ozdemir, Y., Kaplan, N., Savrunlu, E. C., & Karaöz, E. (2024). Allogeneic mesenchymal stem cells may be a viable treatment modality in cerebral palsy. *World journal of clinical cases*, *12*(9), 1585–1596. https://doi.org/10.12998/wjcc.v12.i9.1585

Bunpetch, V., Wu, H., Zhang, S., & Ouyang, H. (2017). From "Bench to Bedside": Current Advancement on Large-Scale Production of Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells and development*, *26*(22), 1662–1673. https://doi.org/10.1089/scd.2017.0104

Burand, A. J., Gramlich, O. W., Brown, A. J., & Ankrum, J. A. (2017). Function of Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells With and Without Interferon-γ Prelicensing is Context Dependent. Stem cells (Dayton, Ohio), 35(5), 1437–1439. https://doi.org/10.1002/stem.2528

Burr, S. P., Dazzi, F., & Garden, O. A. (2013). Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance?. *Immunology and cell biology*, *91*(1), 12–18. https://doi.org/10.1038/icb.2012.60

Caplan A. I. (2015). Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How. *Stem cells international*, *2015*, 628767. https://doi.org/10.1155/2015/628767

Chabot, D., Tremblay, T., Paré, I., Bazin, R., & Loubaki, L. (2017). Transient warming events occurring after freezing impairs umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells functionality. *Cytotherapy*, *19*(8), 978–989. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.04.005

Chatzistamatiou, T. K., Papassavas, A. C., Michalopoulos, E., Gamaloutsos, C., Mallis, P., Gontika, I., Panagouli, E., Koussoulakos, S. L., & Stavropoulos-Giokas, C. (2014). Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: an MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transfusion*, *54*(12), 3108–3120. https://doi.org/10.1111/trf.12743

Chen, X., Ye, S., & Ying, Q. L. (2015). Stem cell maintenance by manipulating signaling pathways: past, current and future. *BMB reports*, *48*(12), 668–676. https://doi.org/10.5483/bmbrep.2015.48.12.215

Chinnadurai, R., Copland, I. B., Garcia, M. A., Petersen, C. T., Lewis, C. N., Waller, E. K., Kirk, A. D., & Galipeau, J. (2016). Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Are Susceptible to T-Cell Mediated Apoptosis Which Is Partly Rescued by IFNγ Licensing. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *34*(9), 2429–2442. https://doi.org/10.1002/stem.2415

Chinnadurai, R., Garcia, M. A., Sakurai, Y., Lam, W. A., Kirk, A. D., Galipeau, J., & Copland, I. B. (2014). Actin cytoskeletal disruption following cryopreservation alters the biodistribution of human mesenchymal stromal cells in vivo. *Stem cell reports*, *3*(1), 60–72. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.003

Chuang, H. M., Shih, T. E., Lu, K. Y., Tsai, S. F., Harn, H. J., & Ho, L. I. (2018). Mesenchymal Stem Cell Therapy of Pulmonary Fibrosis: Improvement with Target Combination. *Cell transplantation*, *27*(11), 1581–1587. https://doi.org/10.1177/0963689718787501

Contreras, R. A., Figueroa, F. E., Djouad, F., & Luz-Crawford, P. (2016). Mesenchymal Stem Cells Regulate the Innate and Adaptive Immune Responses Dampening Arthritis Progression. *Stem cells international*, *2016*, 3162743. https://doi.org/10.1155/2016/3162743

Cooper, K., & Viswanathan, C. (2011). Establishment of a mesenchymal stem cell bank. *Stem cells international*, *2011*, 905621. https://doi.org/10.4061/2011/905621

Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G. L., Pistoia, V., & Uccelli, A. (2006). Human

mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, *107*(1), 367–372. https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2657

Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews. Cancer*, *2*(9), 647–656. https://doi.org/10.1038/nrc883

Cristofalo, V. J., Allen, R. G., Pignolo, R. J., Martin, B. G., & Beck, J. C. (1998). Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(18), 10614–10619. https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10614

Croci, S., Bonacini, M., Dolci, G., Massari, M., Facciolongo, N., Pignatti, E., Pisciotta, A., Carnevale, G., Negro, A., Cassone, G., Muratore, F., Belloni, L., Zerbini, A., & Salvarani, C. (2021). Human Dental Pulp Stem Cells Modulate Cytokine Production *in vitro* by Peripheral Blood Mononuclear Cells From Coronavirus Disease 2019 Patients. *Frontiers in cell and developmental biology*, *8*, 609204. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.609204

Cruz, F. F., Borg, Z. D., Goodwin, M., Sokocevic, D., Wagner, D., McKenna, D. H., Rocco, P. R., & Weiss, D. J. (2015). Freshly thawed and continuously cultured human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells comparably ameliorate allergic airways inflammation in immunocompetent mice. *Stem cells translational medicine*, *4*(6), 615–624. https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0268

da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*, *119*(Pt 11), 2204–2213. https://doi.org/10.1242/jcs.02932

Dağdeviren, (2021) T. Programlı Hücre Ölümü; Apoptoz. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 13(3), 120-135.

Dai, A., Baspinar, O., Yeşilyurt, A., Sun, E., Aydemir, Ç. İ., Öztel, O. N., Capkan, D. U., Pinarli, F., Agar, A., & Karaöz, E. (2018). Efficacy of stem cell therapy in ambulatory and nonambulatory children with Duchenne muscular dystrophy - Phase I-II. *Degenerative neurological and neuromuscular disease*, *8*, 63–77. https://doi.org/10.2147/DNND.S170087

De Becker, A., & Riet, I. V. (2016). Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy?. *World journal of stem cells*, *8*(3), 73–87. https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i3.73

Demircan, P. C., Sariboyaci, A. E., Unal, Z. S., Gacar, G., Subasi, C., & Karaoz, E. (2011). Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte reaction systems. *Cytotherapy*, *13*(10),1205–1220. https://doi.org/10.3109/14653249.2011.605351

Deng, Y., Yi, S., Wang, G., Cheng, J., Zhang, Y., Chen, W., Tai, Y., Chen, S., Chen, G., Liu, W., Zhang, Q., & Yang, Y. (2014). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells instruct dendritic cells to acquire tolerogenic phenotypes through the IL-6-mediated upregulation of SOCS1. *Stem cells and development*, *23*(17), 2080–2092. https://doi.org/10.1089/scd.2013.0559

Ding, D. C., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*, *20*(1), 5–14. https://doi.org/10.3727/096368910X

Ding, Y., Liu, S., Liu, J., Jin, S., & Wang, J. (2024). Cryopreservation with DMSO affects the DNA integrity, apoptosis, cell cycle and function of human bone mesenchymal stem cells. *Cryobiology*, *114*, 104847. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2024.104847

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.j, & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. https://doi.org/10.1080/14653240600855905

Donders, R., Bogie, J. F. J., Ravanidis, S., Gervois, P., Vanheusden, M., Marée, R., Schrynemackers, M., Smeets, H. J. M., Pinxteren, J., Gijbels, K., Walbers, S., Mays, R. W., Deans, R., Van Den Bosch, L., Stinissen, P., Lambrichts, I., Gyselaers, W., & Hellings, N. (2018). Human Wharton's Jelly-Derived Stem Cells Display a Distinct Immunomodulatory and Proregenerative Transcriptional Signature Compared to Bone Marrow-Derived Stem Cells. *Stem cells and development*, *27*(2), 65–84. https://doi.org/10.1089/scd.2017.0029

Dörnen, J., & Dittmar, T. (2021). The Role of MSCs and Cell Fusion in Tissue Regeneration. *International journal of molecular sciences*, *22*(20), 10980. https://doi.org/10.3390/ijms222010980

Efimenko, A. Y., Kalinina, N. I., Rubina, K. A., Semina, E. V., Sysoeva, V. Y., Akopyan, Z. A., & Tkachuk, V. A. (2021). Secretome of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells as a Promising Treatment and for Rehabilitation of Patients with the Novel Coronaviral Infection. *Herald of the Russian Academy of Sciences*, *91*(2), 170–175. https://doi.org/10.1134/S101933162102012X

El-Kadiry, A. E., Rafei, M., & Shammaa, R. (2021). Cell Therapy: Types, Regulation, and Clinical Benefits. *Frontiers in medicine*, *8*, 756029. https://doi.org/10.3389/fmed.2021.756029

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, *35*(4), 495–516. https://doi.org/10.1080/01926230701320337

EMA. European Commission Guidelines on Principles of Good Distribution Practice of Active Substances for Medicinal Products for Human Use; European Union: Brussels, Belgium, 2013; Volume C 343/1-14.

Falanga V. (2012). Stem cells in tissue repair and regeneration. *The Journal of investigative dermatology*, *132*(6), 1538–1541. https://doi.org/10.1038/jid.2012.77

Falk, M., Falková, I., Kopečná, O., Bačíková, A., Pagáčová, E., Šimek, D., Golan, M., Kozubek, S., Pekarová, M., Follett, S. E., Klejdus, B., Elliott, K. W., Varga, K., Teplá, O., & Kratochvílová, I. (2018). Chromatin architecture changes and DNA replication fork collapse are critical features in cryopreserved cells that are differentially controlled by cryoprotectants. *Scientific reports*, *8*(1), 14694. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32939-5

Fang, Y., Lao, P., Tang, L., Chen, J., Chen, Y., Sun, L., Tan, W., & Fan, X. (2023). Mechanisms of Potential Therapeutic Utilization of Mesenchymal Stem Cells in COVID-19 Treatment. *Cell transplantation*, *32*, 9636897231184611. https://doi.org/10.1177/09636897231184611

Fausto N. (2004). Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *39*(6), 1477–1487. https://doi.org/10.1002/hep.20214

Fazzina, R., Mariotti, A., Procoli, A., Fioravanti, D., Iudicone, P., Scambia, G., Pierelli, L., & Bonanno, G. (2015). A new standardized clinical-grade protocol for banking human umbilical cord tissue cells. *Transfusion*, *55*(12), 2864–2873. https://doi.org/10.1111/trf.13277

Fekete, N., Rojewski, M. T., Fürst, D., Kreja, L., Ignatius, A., Dausend, J., & Schrezenmeier, H. (2012). GMP-compliant isolation and large-scale expansion of bone marrow-derived MSC. *PloS one*, *7*(8), e43255. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043255

Feng, X. R., Yao, J., Wu, Y., Cheng, X., Zou, P. J., Wang, H., & Yang, M. (2021). *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Sichuan University. Medical science edition*, *52*(3), 373–379. https://doi.org/10.12182/20210560304

Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*, *73*(4), 1907–1916. https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005

Fong, C. Y., Chak, L. L., Biswas, A., Tan, J. H., Gauthaman, K., Chan, W. K., & Bongso, A. (2011). Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem cell reviews and reports*, *7*(1), 1–16. https://doi.org/10.1007/s12015-010-9166-x

François, M., Copland, I. B., Yuan, S., Romieu-Mourez, R., Waller, E. K., & Galipeau, J. (2012). Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon-γ licensing. *Cytotherapy*, *14*(2), 147–152. https://doi.org/10.3109/14653249.2011.623691

Fu, X., Liu, G., Halim, A., Ju, Y., Luo, Q., & Song, A. G. (2019). Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells*, *8*(8), 784. https://doi.org/10.3390/cells8080784

Galderisi, U., Peluso, G., & Di Bernardo, G. (2022). Clinical Trials Based on Mesenchymal Stromal Cells are Exponentially Increasing: Where are We in Recent Years?. *Stem cell reviews and reports*, *18*(1), 23–36. https://doi.org/10.1007/s12015-021-10231-w

Galipeau J. (2013). The mesenchymal stromal cells dilemma--does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road?. *Cytotherapy*, *15*(1), 2–8. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.10.002

Galipeau, J., & Sensébé, L. (2018). Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell stem cell*, *22*(6), 824–833. https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.004

Gao, L. R., Zhang, N. K., Ding, Q. A., Chen, H. Y., Hu, X., Jiang, S., Li, T. C., Chen, Y., Wang, Z. G., Ye, Y., & Zhu, Z. M. (2013). Common expression of stemness molecular markers and early cardiac transcription factors in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells and embryonic stem cells. *Cell*

transplantation, *22*(10), 1883–1900. https://doi.org/10.3727/096368912X662444

García-Bernal, D., García-Arranz, M., Yáñez, R. M., Hervás-Salcedo, R., Cortés, A., Fernández-García, M., Hernando-Rodríguez, M., Quintana-Bustamante, Ó., Bueren, J. A., García-Olmo, D., Moraleda, J. M., Segovia, J. C., & Zapata, A. G. (2021). The Current Status of Mesenchymal Stromal Cells: Controversies, Unresolved Issues and Some Promising Solutions to Improve Their Therapeutic Efficacy. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 650664. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.650664

Gardner R. L. (2002). Stem cells: potency, plasticity and public perception. *Journal of anatomy*, *200*(Pt 3), 277–282. https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00029.x

Gentile, P., & Sterodimas, A. (2020). Adipose-derived stromal stem cells (ASCs) as a new regenerative immediate therapy combating coronavirus (COVID-19)-induced pneumonia. *Expert opinion on biological therapy*, *20*(7), 711–716. https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1761322

Glassberg, M. K., Csete, I., Simonet, E., & Elliot, S. J. (2021). Stem Cell Therapy for COPD: Hope and Exploitation. *Chest*, *160*(4), 1271–1281. https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.04.020

Gomes, A., Coelho, P., Soares, R., & Costa, R. (2021). Human umbilical cord mesenchymal stem cells in type 2 diabetes mellitus: the emerging therapeutic approach. *Cell and tissue research*, *385*(3), 497–518. https://doi.org/10.1007/s00441-021-03461-4

Gómez-López, S., Lerner, R. G., & Petritsch, C. (2014). Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *71*(4), 575–597. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1386-1

Gramlich, O. W., Burand, A. J., Brown, A. J., Deutsch, R. J., Kuehn, M. H., & Ankrum, J. A. (2016). Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Maintain Potency in a Retinal Ischemia/Reperfusion Injury Model: Toward an off-the-shelf Therapy. *Scientific reports*, *6*, 26463. https://doi.org/10.1038/srep26463

Guadix, J. A., López-Beas, J., Clares, B., Soriano-Ruiz, J. L., Zugaza, J. L., & Gálvez-Martín, P. (2019). Principal Criteria for Evaluating the Quality, Safety and Efficacy of hMSC-Based Products in Clinical Practice: Current Approaches and

Challenges. *Pharmaceutics*, *11*(11), 552. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110552

Gupta, P. K., Chullikana, A., Parakh, R., Desai, S., Das, A., Gottipamula, S., Krishnamurthy, S., Anthony, N., Pherwani, A., & Majumdar, A. S. (2013). A double blind randomized placebo controlled phase I/II study assessing the safety and efficacy of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cell in critical limb ischemia. Journal of translational medicine, 11, 143. https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-143

Güleş, Ö., Eren Ü. (2008). Derleme- Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, (2) 73-78 ISSN 1017-8422; e-ISSN: 1308-3651.

Han, W., Yu, Y., & Liu, X. Y. (2006). Local signals in stem cell-based bone marrow regeneration. *Cell research*, *16*(2), 189–195. https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310026

Han, Y., Yang, J., Fang, J., Zhou, Y., Candi, E., Wang, J., Hua, D., Shao, C., & Shi, Y. (2022). The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, *7*(1), 92. https://doi.org/10.1038/s41392-022-00932-0

Hanley P. J. (2015). Therapeutic mesenchymal stromal cells: where we are headed. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1283*, 1–11. https://doi.org/10.1007/7651_2014_175

Hashemian, S. R., Aliannejad, R., Zarrabi, M., Soleimani, M., Vosough, M., Hosseini, S. E., Hossieni, H., Keshel, S. H., Naderpour, Z., Hajizadeh-Saffar, E., Shajareh, E., Jamaati, H., Soufi-Zomorrod, M., Khavandgar, N., Alemi, H., Karimi, A., Pak, N., Rouzbahani, N. H., Nouri, M., Sorouri, M., … Baharvand, H. (2021). Mesenchymal stem cells derived from perinatal tissues for treatment of critically ill COVID-19-induced ARDS patients: a case series. *Stem cell research & therapy*, *12*(1), 91. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02165-4

He, S., Nakada, D., & Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual review of cell and developmental biology*, *25*, 377–406. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113248

Heldring, N., Mäger, I., Wood, M. J., Le Blanc, K., & Andaloussi, S. E. (2015). Therapeutic Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles. *Human gene therapy*, *26*(8), 506–517. https://doi.org/10.1089/hum.2015.072

Hoang, D. M., Nguyen, K. T., Nguyen, A. H., Nguyen, B. N., & Nguyen, L. T. (2021). Allogeneic human umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells for chronic obstructive pulmonary disease (COPD): study protocol for a matched case-control, phase I/II trial. *BMJ open*, *11*(5), e045788. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-045788

Hoang, D. M., Pham, P. T., Bach, T. Q., Ngo, A. T. L., Nguyen, Q. T., Phan, T. T. K., Nguyen, G. H., Le, P. T. T., Hoang, V. T., Forsyth, N. R., Heke, M., & Nguyen, L. T. (2022). Stem cell-based therapy for human diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, *7*(1), 272. https://doi.org/10.1038/s41392-022-01134-4

Hoogduijn, M. J., de Witte, S. F., Luk, F., van den Hout-van Vroonhoven, M. C., Ignatowicz, L., Catar, R., Strini, T., Korevaar, S. S., van IJcken, W. F., Betjes, M. G., Franquesa, M., Moll, G., & Baan, C. C. (2016). Effects of Freeze-Thawing and Intravenous Infusion on Mesenchymal Stromal Cell Gene Expression. *Stem cells and development*, *25*(8), 586–597. https://doi.org/10.1089/scd.2015.0329

Hsu, P. J., Liu, K. J., Chao, Y. Y., Sytwu, H. K., & Yen, B. L. (2015). Assessment of the Immunomodulatory Properties of Human Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Journal of visualized experiments : JoVE*, (106), e53265. https://doi.org/10.3791/53265

Huang, Q., Huang, Y., & Liu, J. (2021). Mesenchymal Stem Cells: An Excellent Candidate for the Treatment of Diabetes Mellitus. *International journal of endocrinology*, *2021*, 9938658. https://doi.org/10.1155/2021/9938658

Huang, Y., Wu, Q., & Tam, P. K. H. (2022). Immunomodulatory Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells and Their Potential Clinical Applications. *International journal of molecular sciences*, *23*(17), 10023. https://doi.org/10.3390/ijms231710023

Huo, Y., Wang, J., He, J., Kong, D., & Ma, J. (2020). Establishment of human induced pluripotent stem cell line from dermal fibroblasts of a healthy individual. *Stem cell research*, *44*, 101762. https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101762

Hussar, P. (2022). Apoptosis Regulators Bcl-2 and Caspase-3. *Encyclopedia*, 2(4):1624-1636. https://doi.org/10.3390/encyclopedia2040111

Israels, E. D., & Israels, L. G. (2001). The cell cycle. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *19*(1), 88–91. https://doi.org/10.1634/stemcells.19-1-88

Jacques, E., & Suuronen, E. J. (2020). The Progression of Regenerative Medicine and its Impact on Therapy Translation. *Clinical and translational science*, *13*(3), 440–450. https://doi.org/10.1111/cts.12736

Jan, R., & Chaudhry, G. E. (2019). Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Advanced pharmaceutical bulletin*, *9*(2), 205–218. https://doi.org/10.15171/apb.2019.024

Jere, D., Sediq, A. S., Huwyler, J., Vollrath, I., Kardorff, M., & Mahler, H. C. (2021). Challenges for Cell-Based Medicinal Products From a Pharmaceutical Product Perspective. *Journal of pharmaceutical sciences*, *110*(5), 1900–1908. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.11.040

Jiang, T., Xu, G., Wang, Q., Yang, L., Zheng, L., Zhao, J., & Zhang, X. (2017). In vitro expansion impaired the stemness of early passage mesenchymal stem cells for treatment of cartilage defects. *Cell death & disease*, *8*(6), e2851. https://doi.org/10.1038/cddis.2017.215

Johnstone, B. H., Gu, D., Lin, C. H., Du, J., & Woods, E. J. (2023). Identification of a fundamental cryoinjury mechanism in MSCs and its mitigation through cell-cycle synchronization prior to freezing. *Cryobiology*, *113*, 104592. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2023.104592

Jones, J., Estirado, A., Redondo, C., Pacheco-Torres, J., Sirerol-Piquer, M. S., Garcia-Verdugo, J. M., & Martinez, S. (2015). Mesenchymal stem cells improve motor functions and decrease neurodegeneration in ataxic mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, *23*(1), 130–138. https://doi.org/10.1038/mt.2014.143

Jung, S., Panchalingam, K. M., Rosenberg, L., & Behie, L. A. (2012). Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells in defined serum-free media. *Stem cells international*, *2012*, 123030. https://doi.org/10.1155/2012/123030

Kabatas, S., Civelek, E., Savrunlu, E. C., Kaplan, N., Boyalı, O., Diren, F., Can, H., Genç, A., Akkoç, T., & Karaöz, E. (2021). Feasibility of allogeneic mesenchymal stem cells in pediatric hypoxic-ischemic encephalopathy: Phase I study. *World journal of stem cells*, *13*(5), 470–484. https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i5.470

Kabatas, S., Civelek, E., Savrunlu, E. C., Kaplan, N., Boyalı, O., Diren, F., Can, H., Genç, A., Akkoç, T., & Karaöz, E. (2021). Feasibility of allogeneic mesenchymal stem cells in pediatric hypoxic-ischemic encephalopathy: Phase I study. *World journal of stem cells*, *13*(5), 470–484. https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i5.470

Kabatas, S., Civelek, E., Sezen, G. B., Kaplan, N., Savrunlu, E. C., Cetin, E., Diren, F., & Karaoz, E. (2020). Functional Recovery After Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cell Administration in a Patient with Traumatic Brain Injury: A Pilot Study. *Turkish neurosurgery*, *30*(6), 914–922. https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.31732-20.1

Kabataş, S., Civelek, E., Kaplan, N., Savrunlu, E. C., Sezen, G. B., Chasan, M., Can, H., Genç, A., Akyuva, Y., Boyalı, O., Diren, F., & Karaoz, E. (2021). Phase I study on the safety and preliminary efficacy of allogeneic mesenchymal stem cells in hypoxic-ischemic encephalopathy. *World journal of experimental medicine*, *11*(2), 17–29. https://doi.org/10.5493/wjem.v11.i2.17

Kaffash Farkhad, N., Reihani, H., Sedaghat, A., Moghadam, A. A., Moghadam, A. B., & Tavakol-Afshari, J. (2021). Are mesenchymal stem cells able to manage cytokine storm in COVID-19 patients? A review of recent studies. *Regenerative therapy*, *18*, 152–160. https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.05.007

Kalaszczynska, I., & Ferdyn, K. (2015). Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells: future of regenerative medicine? Recent findings and clinical significance. *BioMed research international*, *2015*, 430847. https://doi.org/10.1155/2015/430847

Kalinina, N. I., Sysoeva, V. Y., Rubina, K. A., Parfenova, Y. V., & Tkachuk, V. A. (2011). Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair. *Acta naturae*, *3*(4), 30–37.

Karaoz, E., Kalemci, S., & Ece, F. (2020). Improving effects of mesenchymal stem cells on symptoms of chronic obstructive pulmonary disease. *Bratislavske lekarske listy*, *121*(3), 188–191. https://doi.org/10.4149/BLL_2020_028

Karaöz, E., Çetinalp Demircan, P., Erman, G., Güngörürler, E., & Eker Sarıboyacı, A. (2017). Comparative Analyses of Immunosuppressive Characteristics of Bone-Marrow, Wharton's Jelly, and Adipose Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells. Kemik İliği, Wharton Jölesi ve İnsan Yağ Doku-Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünsüpresif Özelliklerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. *Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology*, *34*(3), 213–225. https://doi.org/10.4274/tjh.2016.0171

Karaöz, E., Ovalı, E. (2004) Kök Hücreler, 1 -15. Türkiye:Derya Kitapevi

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, *26*(4), 239–257. https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33

Kim, D. W., Staples, M., Shinozuka, K., Pantcheva, P., Kang, S. D., & Borlongan, C. V. (2013). Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *International journal of molecular sciences*, *14*(6), 11692–11712. https://doi.org/10.3390/ijms140611692

Kishimoto T. (2018). MPF-based meiotic cell cycle control: Half a century of lessons from starfish oocytes. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, *94*(4), 180–203. https://doi.org/10.2183/pjab.94.013

Kobayashi, K., Kubota, T., & Aso, T. (1998). Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly: expression and localization of alpha-smooth muscle actin. *Early human development*, *51*(3), 223–233. https://doi.org/10.1016/s0378-3782(97)00123-0

Kolf, C. M., Cho, E., & Tuan, R. S. (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis research & therapy*, *9*(1), 204. https://doi.org/10.1186/ar2116

Kondratskyi, A., Kondratska, K., Skryma, R., Prevarskaya, N. (2015). Ion channels in the regulation of apoptosis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Volume 1848, Issue 10, Part B, Pages 2532-2546. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.030.

Kyurkchiev, D., Bochev, I., Ivanova-Todorova, E., Mourdjeva, M., Oreshkova, T., Belemezova, K., & Kyurkchiev, S. (2014). Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World journal of stem cells*, *6*(5), 552–570. https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.552

Lakshmipathy, U., & Verfaillie, C. (2005). Stem cell plasticity. *Blood reviews*, *19*(1), 29–38. https://doi.org/10.1016/j.blre.2004.03.001

Lane, S., Rippon, H. J., & Bishop, A. E. (2007). Stem cells in lung repair and regeneration. *Regenerative medicine*, *2*(4), 407–415. https://doi.org/10.2217/17460751.2.4.407

Lanzoni, G., Linetsky, E., Correa, D., Alvarez, R. A., Marttos, A., Hirani, K., Cayetano, S. M., Castro, J. G., Paidas, M. J., Efantis Potter, J., Xu, X., Glassberg, M., Tan, J., Patel, A. N., Goldstein, B., Kenyon, N. S., Baidal, D., Alejandro, R., Vianna, R., Ruiz, P., … Ricordi, C. (2020). Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells for COVID-19 Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *CellR4-- repair, replacement, regeneration, & reprogramming*, *8*, e2839. https://doi.org/10.32113/cellr4_20204_2839

Laroye, C., Boufenzer, A., Jolly, L., Cunat, L., Alauzet, C., Merlin, J. L., Yguel, C., Bensoussan, D., Reppel, L., & Gibot, S. (2019). Bone marrow vs Wharton's jelly mesenchymal stem cells in experimental sepsis: a comparative study. *Stem cell research & therapy*, *10*(1), 192. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1295-9

Latifi-Pupovci, H., Kuçi, Z., Wehner, S., Bönig, H., Lieberz, R., Klingebiel, T., Bader, P., & Kuçi, S. (2015). In vitro migration and proliferation ("wound healing") potential of mesenchymal stromal cells generated from human CD271(+) bone marrow mononuclear cells. *Journal of translational medicine*, *13*, 315. https://doi.org/10.1186/s12967-015-0676-9

Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., & Ringdén, O. (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental hematology*, *31*(10), 890–896. https://doi.org/10.1016/s0301-472x(03)00110-3

Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M., & Ringdén, O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet (London, England)*, *363*(9419), 1439–1441. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16104-7

Leng, Z., Zhu, R., Hou, W., Feng, Y., Yang, Y., Han, Q., Shan, G., Meng, F., Du, D., Wang, S., Fan, J., Wang, W., Deng, L., Shi, H., Li, H., Hu, Z., Zhang, F., Gao, J., Liu, H., Li, X., … Zhao, R. C. (2020). Transplantation of ACE2$^-$ Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia. *Aging and disease*, *11*(2), 216–228. https://doi.org/10.14336/AD.2020.0228

Li, T. T., Zhang, B., Fang, H., Shi, M., Yao, W. Q., Li, Y., Zhang, C., Song, J., Huang, L., Xu, Z., Yuan, X., Fu, J. L., Zhen, C., Zhang, Y., Wang, Z. R., Zhang, Z. Y., Yuan, M. Q., Dong, T., Bai, R., Zhao, L., … Wang, F. S. (2023). Human mesenchymal stem cell therapy in severe COVID-19 patients: 2-year follow-up results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *EBioMedicine*, *92*, 104600. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104600

Liau, L. L., Ruszymah, B. H. I., Ng, M. H., & Law, J. X. (2020). Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells. *Current research in translational medicine*, *68*(1), 5–16. https://doi.org/10.1016/j.retram.2019.09.001

Ligasová, A., Frydrych, I., & Koberna, K. (2023). Basic Methods of Cell Cycle Analysis. *International journal of molecular sciences*, *24*(4), 3674. https://doi.org/10.3390/ijms24043674

Liu, Z. J., Zhuge, Y., & Velazquez, O. C. (2009). Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*, *106*(6), 984–991. https://doi.org/10.1002/jcb.22091

Lodi, D., Iannitti, T., & Palmieri, B. (2011). Stem cells in clinical practice: applications and warnings. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, *30*(1), 9. https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-9

Luo, Y., Medina Bengtsson, L., Wang, X., Huang, T., Liu, G., Murphy, S., Wang, C., Koren, J., 3rd, Schafer, Z., & Lu, X. (2020). UQCRH downregulation promotes Warburg effect in renal cell carcinoma cells. *Scientific reports*, *10*(1), 15021. https://doi.org/10.1038/s41598-020-72107-2

Lupatov, A. Y., & Yarygin, K. N. (2022). Telomeres and Telomerase in the Control of Stem Cells. *Biomedicines*, *10*(10), 2335. https://doi.org/10.3390/biomedicines10102335

Mansergh, F. C., Wride, M. A., & Rancourt, D. E. (2000). Neurons from stem cells: implications for understanding nervous system development and repair. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, *78*(5), 613–628.

Marescal, O., & Cheeseman, I. M. (2020). Cellular Mechanisms and Regulation of Quiescence. *Developmental cell*, *55*(3), 259–271. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.09.029

Marino, L., Castaldi, M. A., Rosamilio, R., Ragni, E., Vitolo, R., Fulgione, C., Castaldi, S. G., Serio, B., Bianco, R., Guida, M., & Selleri, C. (2019). Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential. *International journal of stem cells*, *12*(2), 218–226. https://doi.org/10.15283/ijsc18034

Marquez-Curtis, L. A., Janowska-Wieczorek, A., McGann, L. E., & Elliott, J. A. (2015). Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*, *71*(2), 181–197. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.07.003

Mason, C., & Dunnill, P. (2008). A brief definition of regenerative medicine. *Regenerative medicine*, *3*(1), 1–5. https://doi.org/10.2217/17460751.3.1.1

Mastrolia, I., Foppiani, E. M., Murgia, A., Candini, O., Samarelli, A. V., Grisendi, G., Veronesi, E., Horwitz, E. M., & Dominici, M. (2019). Challenges in Clinical Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Concise Review. *Stem cells translational medicine*, *8*(11), 1135–1148. https://doi.org/10.1002/sctm.19-0044

McElreavey, K. D., Irvine, A. I., Ennis, K. T., & McLean, W. H. (1991). Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochemical Society transactions*, *19*(1), 29S. https://doi.org/10.1042/bst019029s

Mebarki, M., Abadie, C., Larghero, J., & Cras, A. (2021). Human umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells: a promising candidate for the development of advanced therapy medicinal products. *Stem cell research & therapy*, *12*(1), 152. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02222-y

Mebarki, M., Iglicki, N., Marigny, C., Abadie, C., Nicolet, C., Churlaud, G., Maheux, C., Boucher, H., Monsel, A., Menasché, P., Larghero, J., Faivre, L., & Cras, A. (2021). Development of a human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cell-based advanced therapy medicinal product to treat immune and/or inflammatory diseases. *Stem cell research & therapy*, *12*(1), 571. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02637-7

Metkar, S. S., Wang, B., Ebbs, M. L., Kim, J. H., Lee, Y. J., Raja, S. M., & Froelich, C. J. (2003). Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *The Journal of cell biology*, *160*(6), 875–885. https://doi.org/10.1083/jcb.200210158

Mirotsou, M., Jayawardena, T. M., Schmeckpeper, J., Gnecchi, M., & Dzau, V. J. (2011). Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *50*(2), 280–289. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.08.005

Mizukami, A., & Swiech, K. (2018). Mesenchymal Stromal Cells: From Discovery to Manufacturing and Commercialization. *Stem cells international*, *2018*, 4083921. https://doi.org/10.1155/2018/4083921

Mohammadian M., Abasi E., Akbarzadeh A (2015) Mesenchymal stem cell-based gene therapy: A promising therapeutic strategy; Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1029624

Mohyeddin Bonab, M., Talebian, F., Borzabadi, A. *et al.* (2021). A novel method for maintaining the stability of freshly cultured Mesenchymal stem cells in clinical grade injection ready state without cryopreservation. T*ransl med commun* **6**, 24. https://doi.org/10.1186/s41231-021-00103-3

Moll, G., Alm, J. J., Davies, L. C., von Bahr, L., Heldring, N., Stenbeck-Funke, L., Hamad, O. A., Hinsch, R., Ignatowicz, L., Locke, M., Lönnies, H., Lambris, J. D., Teramura, Y., Nilsson-Ekdahl, K., Nilsson, B., & Le Blanc, K. (2014). Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties?. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *32*(9), 2430–2442. https://doi.org/10.1002/stem.1729

Moll, G., Geißler, S., Catar, R., Ignatowicz, L., Hoogduijn, M. J., Strunk, D., Bieback, K., & Ringdén, O. (2016). Cryopreserved or Fresh Mesenchymal Stromal Cells: Only a Matter of Taste or Key to Unleash the Full Clinical Potential of MSC Therapy?. *Advances in experimental medicine and biology*, *951*, 77–98. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3_7

Murphy, M. B., Moncivais, K., & Caplan, A. I. (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & molecular medicine*, *45*(11), e54. https://doi.org/10.1038/emm.2013.94

Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, *93*(1), 19–31. https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242

Musial-Wysocka, A., Kot, M., & Majka, M. (2019). The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies. *Cell transplantation*, *28*(7), 801–812. https://doi.org/10.1177/0963689719837897

Müller, L., Tunger, A., Wobus, M., von Bonin, M., Towers, R., Bornhäuser, M., Dazzi, F., Wehner, R., & Schmitz, M. (2021). Immunomodulatory Properties of

Mesenchymal Stromal Cells: An Update. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 637725. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.637725

Nakano R. (1997). Apoptosis: gene-directed cell death. An overview. *Hormone research*, *48 Suppl 3*, 2–4. https://doi.org/10.1159/000191292

Nguyen, L.Q., Jameson, J.L. (1998). The Cell Cycle. In: Jameson, J.L. (eds) Principles of Molecular Medicine. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-726-0_6

Ohlstein, B., Kai, T., Decotto, E., & Spradling, A. (2004). The stem cell niche: theme and variations. *Current opinion in cell biology*, *16*(6), 693–699. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.003

Oja, S., Kaartinen, T., Ahti, M., Korhonen, M., Laitinen, A., & Nystedt, J. (2019). The Utilization of Freezing Steps in Mesenchymal Stromal Cell (MSC) Manufacturing: Potential Impact on Quality and Cell Functionality Attributes. *Frontiers in immunology*, *10*, 1627. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01627

Okur, S. Ç., Erdoğan, S., Demir, C. S., Günel, G., & Karaöz, E. (2018). The Effect of Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in a Patient with Cerebral Palsy: A Case Report. *International journal of stem cells*, *11*(1), 141–147. https://doi.org/10.15283/ijsc17077

Oliver-Vila, I., Coca, M. I., Grau-Vorster, M., Pujals-Fonts, N., Caminal, M., Casamayor-Genescà, A., Ortega, I., Reales, L., Pla, A., Blanco, M., García, J., & Vives, J. (2016). Evaluation of a cell-banking strategy for the production of clinical grade mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly. *Cytotherapy*, *18*(1), 25–35. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.001

Olsen, T. R., Ng, K. S., Lock, L. T., Ahsan, T., & Rowley, J. A. (2018). Peak MSC-Are We There Yet?. Frontiers in medicine, 5, 178. https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00178

Otsuru, S., Hofmann, T. J., Raman, P., Olson, T. S., Guess, A. J., Dominici, M., & Horwitz, E. M. (2015). Genomic and functional comparison of mesenchymal stromal cells prepared using two isolation methods. Cytotherapy, 17(3), 262–270. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.10.013

Paladino, F. V., Sardinha, L. R., Piccinato, C. A., & Goldberg, A. C. (2017). Intrinsic Variability Present in Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells and T Cell

Responses May Impact Cell Therapy. Stem cells international, 2017, 8492797. https://doi.org/10.1155/2017/8492797

Panés, J., García-Olmo, D., Van Assche, G., Colombel, J. F., Reinisch, W., Baumgart, D. C., Dignass, A., Nachury, M., Ferrante, M., Kazemi-Shirazi, L., Grimaud, J. C., de la Portilla, F., Goldin, E., Richard, M. P., Leselbaum, A., Danese, S., & ADMIRE CD Study Group Collaborators (2016). Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet (London, England)*, *388*(10051), 1281–1290. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31203-X

Papadaki M. (2017). Adaptation through Collaboration: Developing Novel Platforms to Advance the Delivery of Advanced Therapies to Patients. *Frontiers in medicine*, *4*, 56. https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00056

Park, S., Lee, D. R., Nam, J. S., Ahn, C. W., & Kim, H. (2018). Fetal bovine serum-free cryopreservation methods for clinical banking of human adipose-derived stem cells. *Cryobiology*, *81*, 65–73. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.02.008

Pawitan J. A. (2022). Mesenchymal stem/stromal cells as adjuvant therapy in COVID-19-associated acute lung injury and cytokine storm: Importance of cell identification. *World journal of stem cells*, *14*(3), 264–266. https://doi.org/10.4252/wjsc.v14.i3.264

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, *284*(5411), 143–147. https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143

Pollock, K., Sumstad, D., Kadidlo, D., McKenna, D. H., & Hubel, A. (2015). Clinical mesenchymal stromal cell products undergo functional changes in response to freezing. *Cytotherapy*, *17*(1), 38–45. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.06.008”

Potten, C. S., & Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development (Cambridge, England)*, *110*(4), 1001–1020. https://doi.org/10.1242/dev.110.4.1001

Pretheeban, T., Lemos, D. R., Paylor, B., Zhang, R. H., & Rossi, F. M. (2012). Role of stem/progenitor cells in reparative disorders. *Fibrogenesis & tissue repair*, *5*(1), 20. https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-20

Prockop D. J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science (New York, N.Y.)*, *276*(5309), 71–74. https://doi.org/10.1126/science.276.5309.71

Pucci, B., Kasten, M., & Giordano, A. (2000). Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *2*(4), 291–299. https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900101

Qian, S., Wei, Z., Yang, W., Huang, J., Yang, Y., & Wang, J. (2022). The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Frontiers in oncology*, *12*, 985363. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.985363

Radrizzani, M., Soncin, S., Lo Cicero, V., Andriolo, G., Bolis, S., & Turchetto, L. (2016). Quality Control Assays for Clinical-Grade Human Mesenchymal Stromal Cells: Methods for ATMP Release. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1416*, 313–337. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0_19

Rennert, R. C., Sorkin, M., Garg, R. K., & Gurtner, G. C. (2012). Stem cell recruitment after injury: lessons for regenerative medicine. *Regenerative medicine*, *7*(6), 833–850. https://doi.org/10.2217/rme.12.82

Ringdén, O., Uzunel, M., Rasmusson, I., Remberger, M., Sundberg, B., Lönnies, H., Marschall, H. U., Dlugosz, A., Szakos, A., Hassan, Z., Omazic, B., Aschan, J., Barkholt, L., & Le Blanc, K. (2006). Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*, *81*(10), 1390–1397. https://doi.org/10.1097/01.tp.0000214462.63943.14

Rogers, C. J., Harman, R. J., Bunnell, B. A., Schreiber, M. A., Xiang, C., Wang, F. S., Santidrian, A. F., & Minev, B. R. (2020). Rationale for the clinical use of adipose-derived mesenchymal stem cells for COVID-19 patients. *Journal of translational medicine*, *18*(1), 203. https://doi.org/10.1186/s12967-020-02380-2

Sagaradze, G., Grigorieva, O., Nimiritsky, P., Basalova, N., Kalinina, N., Akopyan, Z., & Efimenko, A. (2019). Conditioned Medium from Human Mesenchymal Stromal Cells: Towards the Clinical Translation. *International journal of molecular sciences*, *20*(7), 1656. https://doi.org/10.3390/ijms20071656

Samsonraj, R. M., Rai, B., Sathiyanathan, P., Puan, K. J., Rötzschke, O., Hui, J. H., Raghunath, M., Stanton, L. W., Nurcombe, V., & Cool, S. M. (2015). Establishing criteria for human mesenchymal stem cell potency. Stem cells (Dayton, Ohio), 33(6), 1878–1891. https://doi.org/10.1002/stem.1982

Sarugaser, R., Hanoun, L., Keating, A., Stanford, W. L., & Davies, J. E. (2009). Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. *PloS one*, *4*(8), e6498. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006498

Schiess, M., Suescun, J., Doursout, M. F., Adams, C., Green, C., Saltarrelli, J. G., Savitz, S., & Ellmore, T. M. (2021). Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Safety in Idiopathic Parkinson's Disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, *36*(8), 1825–1834. https://doi.org/10.1002/mds.28582

Sekiya, E. J., Forte, A., Kühn, T. I., Janz, F., Bydlowski, S. P., & Alves, A. (2012). Establishing a stem cell culture laboratory for clinical trials. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, *34*(3), 236–241. https://doi.org/10.5581/1516-8484.20120057

Shahriyari, L., & Komarova, N. L. (2013). Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer?. *PloS one*, *8*(10), e76195. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076195

Shaker, A., & Rubin, D. C. (2012). Stem cells: One step closer to gut repair. *Nature*, *485*(7397), 181–182. https://doi.org/10.1038/485181a

Song, N., Scholtemeijer, M., & Shah, K. (2020). Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends in pharmacological sciences*, *41*(9), 653–664. https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.009

Spierings, D. C., de Vries, E. G., Vellenga, E., van den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J., Hollema, H., & de Jong, S. (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, *52*(6), 821–831. https://doi.org/10.1369/jhc.3A6112.2004

Spurway, J., Logan, P., & Pak, S. (2012). The development, structure and blood flow within the umbilical cord with particular reference to the venous system. *Australasian journal of ultrasound in medicine*, *15*(3), 97–102. https://doi.org/10.1002/j.2205-0140.2012.tb00013.x

Squillaro, T., Peluso, G., & Galderisi, U. (2016). Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell transplantation*, *25*(5), 829–848. https://doi.org/10.3727/096368915X689622

Stefańska, K., Ożegowska, K., Hutchings, G., Popis, M., Moncrieff, L., Dompe, C., Janowicz, K., Pieńkowski, W., Gutaj, P., Shibli, J. A., Prado, W. M., Piotrowska-Kempisty, H., Mozdziak, P., Bruska, M., Zabel, M., Kempisty, B., & Nowicki, M. (2020). Human Wharton's Jelly-Cellular Specificity, Stemness Potency, Animal Models, and Current Application in Human Clinical Trials. *Journal of clinical medicine*, *9*(4), 1102. https://doi.org/10.3390/jcm9041102

Subramanian, A., Fong, C. Y., Biswas, A., & Bongso, A. (2015). Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows that the Wharton's Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells. *PloS one*, *10*(6), e0127992. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127992

Sun, E., & Karaoz, E. (2020). Can Wharton jelly derived or adipose tissue derived mesenchymal stem cell can be a treatment option for duchenne muscular dystrophy? Answers as transcriptomic aspect. *American journal of stem cells*, *9*(4), 57–67.

Takechi, K., Kuwabara, Y., & Mizuno, M. (1993). Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells. *Placenta*, *14*(2), 235–245. https://doi.org/10.1016/s0143-4004(05)80264-4

Thirumala, S., Goebel, W. S., & Woods, E. J. (2013). Manufacturing and banking of mesenchymal stem cells. *Expert opinion on biological therapy*, *13*(5), 673–691. https://doi.org/10.1517/14712598.2013.763925

Torre, M. L., Lucarelli, E., Guidi, S., Ferrari, M., Alessandri, G., De Girolamo, L., Pessina, A., Ferrero, I., & Gruppo Italiano Staminali Mesenchimali (GISM) (2015). Ex vivo expanded mesenchymal stromal cell minimal quality requirements for clinical application. *Stem cells and development*, *24*(6), 677–685. https://doi.org/10.1089/scd.2014.0299

Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, *8*(9), 726–736. https://doi.org/10.1038/nri2395

Ullah, M., Liu, D. D., & Thakor, A. S. (2019). Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. *iScience*, *15*, 421–438. https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.05.004

Urbani, S., Caporale, R., Lombardini, L., Bosi, A., & Saccardi, R. (2006). Use of CFDA-SE for evaluating the in vitro proliferation pattern of human

mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, *8*(3), 243–253. https://doi.org/10.1080/14653240600735834

van Geffen, C., Deißler, A., Quante, M., Renz, H., Hartl, D., & Kolahian, S. (2021). Regulatory Immune Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Friends or Foes?. *Frontiers in immunology*, *12*, 663203. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.663203

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, *36*(3), 131–149. https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x

Vieira Paladino, F., de Moraes Rodrigues, J., da Silva, A., & Goldberg, A. C. (2019). The Immunomodulatory Potential of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Stem cells international*, *2019*, 3548917. https://doi.org/10.1155/2019/3548917

Viganò, M., Budelli, S., Lavazza, C., Montemurro, T., Montelatici, E., de Cesare, S., Lazzari, L., Orlandi, A. R., Lunghi, G., & Giordano, R. (2018). Tips and Tricks for Validation of Quality Control Analytical Methods in Good Manufacturing Practice Mesenchymal Stromal Cell Production. *Stem cells international*, *2018*, 3038565. https://doi.org/10.1155/2018/3038565

Wagner, W., Bork, S., Lepperdinger, G., Joussen, S., Ma, N., Strunk, D., & Koch, C. (2010). How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells?. *Aging*, *2*(4), 224–230. https://doi.org/10.18632/aging.100136

Wang, H. S., Hung, S. C., Peng, S. T., Huang, C. C., Wei, H. M., Guo, Y. J., Fu, Y. S., Lai, M. C., & Chen, C. C. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem cells (Da*yton, Ohio)*, *22*(7), 1330–1337. https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0013

Wang, M., Yuan, Q., & Xie, L. (2018). Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem cells international*, *2018*, 3057624. https://doi.org/10.1155/2018/3057624

Wang, Y., Huang, J., Gong, L., Yu, D., An, C., Bunpetch, V., Dai, J., Huang, H., Zou, X., Ouyang, H., & Liu, H. (2019). The Plasticity of Mesenchymal Stem Cells in Regulating Surface HLA-I. *iScience*, *15*, 66–78. https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.04.011

Wani, A. K., Akhtar, N., Mir, T. U. G., Singh, R., Jha, P. K., Mallik, S. K., Sinha, S., Tripathi, S. K., Jain, A., Jha, A., Devkota, H. P., & Prakash, A. (2023). Targeting Apoptotic Pathway of Cancer Cells with Phytochemicals and Plant-Based Nanomaterials. *Biomolecules*, *13*(2), 194. https://doi.org/10.3390/biom13020194

Watson, N., Divers, R., Kedar, R., Mehindru, A., Mehindru, A., Borlongan, M. C., & Borlongan, C. V. (2015). Discarded Wharton jelly of the human umbilical cord: a viable source for mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, *17*(1), 18–24. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.08.009

Weiss, M. L., Anderson, C., Medicetty, S., Seshareddy, K. B., Weiss, R. J., VanderWerff, I., Troyer, D., & McIntosh, K. R. (2008). Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *26*(11), 2865–2874. https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1028

Wetzig, A., Alaiya, A., Al-Alwan, M., Pradez, C. B., Pulicat, M. S., Al-Mazrou, A., Shinwari, Z., Sleiman, G. M., Ghebeh, H., Al-Humaidan, H., Gaafar, A., Kanaan, I., & Adra, C. (2013). Differential marker expression by cultures rich in mesenchymal stem cells. *BMC cell biology*, *14*, 54. https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-54

Whyte, W. (2010). Cleanroom technology: Fundamentals of design, testing and operation. Wiley, Hoboken. ISBN: 978-0-470-74806-0

Xu, M., Zhang, B., Liu, Y., Zhang, J., Sheng, H., Shi, R., Liao, L., Liu, N., Hu, J., Wang, J., Ning, H., Liu, T., Zhang, Y., & Chen, H. (2014). The immunologic and hematopoietic profiles of mesenchymal stem cells derived from different sections of human umbilical cord. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, *46*(12), 1056–1065. https://doi.org/10.1093/abbs/gmu100

Xu, R., Feng, Z., & Wang, F. S. (2022). Mesenchymal stem cell treatment for COVID-19. *EBioMedicine*, *77*, 103920. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103920

Yang, Q. H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M. L., & Du, C. (2003). Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes & development*, *17*(12), 1487–1496. https://doi.org/10.1101/gad.1097903

Yilmaz, R., Adas, G., Cukurova, Z., Kart Yasar, K., Isiksacan, N., Oztel, O. N., & Karaoz, E. (2020). Mesenchymal stem cells treatment in COVID-19 patient with multi-organ involvement. *Bratislavske lekarske listy*, *121*(12), 847–852. https://doi.org/10.4149/BLL_2020_139

Yong, K. W., Choi, J. R., & Wan Safwani, W. K. (2016). Biobanking of Human Mesenchymal Stem Cells: Future Strategy to Facilitate Clinical Applications. *Advances in experimental medicine and biology*, *951*, 99–110. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3_8

Yui, J., Chiu, C. P., & Lansdorp, P. M. (1998). Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow. *Blood*, *91*(9), 3255–3262.

Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*, *10*(1), 68. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5

Zayed, M., & Iohara, K. (2020). Immunomodulation and Regeneration Properties of Dental Pulp Stem Cells: A Potential Therapy to Treat Coronavirus Disease 2019. *Cell transplantation*, *29*, 963689720952089. https://doi.org/10.1177/0963689720952089

Zhang, Y., Ding, J., Ren, S., Wang, W., Yang, Y., Li, S., Meng, M., Wu, T., Liu, D., Tian, S., Tian, H., Chen, S., & Zhou, C. (2020). Intravenous infusion of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells as a potential treatment for patients with COVID-19 pneumonia. *Stem cell research & therapy*, *11*(1), 207. https://doi.org/10.1186/s13287-020-01725-4

Zhou, C., Yang, B., Tian, Y., Jiao, H., Zheng, W., Wang, J., & Guan, F. (2011). Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes. *Cellular immunology*, *272*(1), 33–38. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.09.010

Zhao, K., Lou, R., Huang, F., Peng, Y., Jiang, Z., Huang, K., Wu, X., Zhang, Y., Fan, Z., Zhou, H., Liu, C., Xiao, Y., Sun, J., Li, Y., Xiang, P., & Liu, Q. (2015). Immunomodulation effects of mesenchymal stromal cells on acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, *21*(1), 97–104. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.09.030

10. YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/programın tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Eskişehir Osmangazi Üniversitesine (ESOGÜ) verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinleri yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / ESOGÜ Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. (1)
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ….. ay ertelenmiştir. (2)
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. (3)

11/06/2024

İrem YILMAZ BAŞARAN

"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü tezle ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.