



TÜRKİYE BİLİMLER AKADEMİSİ



Tıp Fakültesi



Spor Bilimleri
Fakültesi

3 kök hücre ve hücresel tedaviler kongresi

Joint Meeting With ISSCA

12-14 Nisan 2019

Marmara Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi
Anadolu Hisarı Yerleşkesi

İstanbul

www.kokhucrekongresi.org

KONGRE KİTABI



İnsanlar embriyondan gelişiyor.
Yani embriyo hücrelerinde her organımızın KÖK'ü var.

1960 - Ord. Prof. Dr. Süreyya Tahsin AYGÜN

ORGANİZASYON

Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Derneği

Başkan

Dr. TUNÇ AKKOÇ

II. Başkan

Dr. SERDAR KABATAŞ

Genel Sekreter

Dr. İBRAHİM TUĞLU

Muhasip

Dr. GÖKHAN ADAŞ

Üyeler

Dr. ERCÜMENT OVALI

Dr. ERDAL KARAÖZ

Dr. FİKRETTİN ŞAHİN

Kongre Başkanı

Dr. ERCÜMENT OVALI

Kongre Sekreteri

Dr. SERDAR KABATAŞ

Dr. İBRAHİM TUĞLU

Dr. MEHMET BOZKURT

Dr. ERDİNÇ CİVELEK

MSc. RAİFE DİLEK TURAN

BİLİMSEL DANIŞMA KURULU

GÖKHAN ADAŞ
TUNÇ AKKOÇ
TOLGA AKKOÇ
MURAT AKSU
ERDEM AKTAŞ
ADİL ALLAHVERDİYEV
TUĞRUL ALTAN
ENDER ALTIÖK
MUTLU ARAT
UTKU ATEŞ
ELİF GANİME AYDENİZ
ERKAN BARAN
SERDAR BORA
BAYRAKTAROĞLU
SEVGİ BEŞİK
KALAYOĞLU
NUR BİRGEN
MEHMET BOZKURT
MURAT BOZKURT
ALP CAN
DURAN CANATAN
ERDİNÇ CİVELEK
ZEYNEP ZEHRA
COŞKUN
SİBEL ÇAĞLAR OKUR
HAKAN DARICI
AHMET DOĞAN

SERKAN DURDU
MURAT ELÇİN
FATİH ERBEY
GÜLİNNAZ ERCAN
ESRA ERDAL
FATMA EYÜBOĞLU
ÜNÜVAR
MUZAFFER GÖKALP
BURÇİN GÖNEN
GÜLŞEN GÜNEL
VASIF HASIRCI
KEMAL HEPGÜL
SERDAR KABATAŞ
RABİA KAHRAMAN
DERYA DİLEK KANCAĞI
EMİN KANSU
MURAT KANTARCIOĞLU
NECATİ KAPLAN
AYŞEGÜL KARAALTI
MEHMET VELİ
KARAALTIN
ÇİĞDEM KARADAĞ
SARI
PERÇİN KARAKOL
MUSA KARAKÜRKÇÜ
ERDAL KARAÖZ
ALPER KAYA

DAEYONG KIM (KOREA)
CENGİZ KIRMAZ
FATİH KOCABAŞ
YAVUZ KOCABEY
BARIŞ KOCAOĞLU
MERVE KONGUR
MUSTAPHA
NAJİMİ(BELGIUM)
DINH HOA NGUYEN
(VIETNAM)
AYHAN OLCAY
ERCÜMENT OVALI
ENDER ÖDEMİŞ
GÜLPERİ ÖKTEM
AYŞE ÖNER ÖZTÜRK
HACI MUSTAFA
ÖZDEMİR
MUSTAFA ÖZDOĞAN
AHMET ÖZEN
ÖZAY ÖZKAYA
YUSUF ÖZKUL
OLGA NEHİR ÖZTEL
MURAT ÖZTÜRK
GÜLYÜZ ÖZTÜRK
NİL BANU PELİT
FATMA SAVRAN OĞUZ
UĞUR SEZERMAN

GÖZDE SIR
JUNAID A. SYED (USA)
FİKRETTİN ŞAHİN
MURAT TANYILDIZ
ÖMER TAŞER
NESLİHAN TAŞLI
CİHAN TAŞTAN
GAYE TAYLAN
DİLEK TELCİ
YANG TENG(USA)
AYŞEN TEZCANER
ZAFER ORKUN TOKTAŞ
ZEKERİYA TOSUN
İBRAHİM TUĞLU
KEZBAN ULUBAYRAM
ALİ ÜNAL
RENGİM VURAL
KORAY YALÇIN
PINAR YALINAY DİKMEN
AZİZ YAZAR
HEMŞİNLİOĞLU
YEMENCİOĞLU
AKİF YEŞİLİPEK
MUHAMMET YILANCI
İREM YILMAZ
BULUT YURTSEVER
DENİZ YÜCEL
BÜLENT ZÜLFÜKAR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ

BİLİMSEL PROGRAM

SÖZLÜ SUNUM PROGRAM

KONUŞMACI ÖZETLERİ

SÖZLÜ BİLDİRİLER

POSTER BİLDİRİLER

ÖNSÖZ

Değerli Meslektaşlarımız,

3. Kök Hücre Kongresi 12-14 Nisan 2019 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi, Anadolu Hisarı Yerleşkesi'nde düzenlenecektir.

Uluslararası katılımıla Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Derneğimiz tarafından düzenlenecek olan kongremiz birçok farklı klinik ve prelinik alanlardan bilim insanlarının katılacağı önemli bir etkinlik olacaktır.

Son yıllarda yapılan laboratuvar ve klinik çalışmalar, kök hücrelerin rejeneratif ve reparatif tıp alanındaki önemini daha da belirgin hale getirmiştir. Hızlı akan bilimsel verilere ulaşmakta, bunları tartışmakta ve çalışma alanlarımızda uygulamada saniyelerle yarışır hale gelmiş durumdayız. Bizler Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Derneği olarak sizlerle bu önemli kongrede buluşmaya, paylaşmaya ve üretmeye davet ediyoruz.

Sevgili öğrencilerimizi önderleri ile buluşacağı, değerli verilerini sözlü ve poster olarak paylaşma imkanı bulacağı, akademik yürüyüşlerinde yeni imkanlar ile karşılaşacağı bir buluşmaya davet ediyoruz.

Pipetten enjektöre kök hücre yolcuğunda neler yaşandığını, hangi klinik uygulamalara yeşil ışık yakıldığını, doğrusunu ve yanlısını alanda olan bilim insanları ile paylaşmayı hedeflediğimiz kongremizde sizleri görmekten mutluluk duyacağız.

O gün buluşana dek esenlikler dileriz.

Prof. Dr. TUNÇ AKKOÇ
Dernek Başkanı

Prof. Dr. Ercüment OVALI
Kongre Başkanı

3. kök hücre ve hücresel tedaviler kongresi

Joint Meeting With ISSCA

TUBA

TÜRKİYE BİLİMLER AKADEMİSİ



ISSCA



Tıp Fakültesi



Spor Bilimleri Fakültesi

12-14 Nisan 2019

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Ameliyathane Hastane Kompleksi

İstanbul

SALON A HALL A

KURS I

TEMEL KÖK HÜCRE OKULU SCHOOL OF BASIC STEM CELL

KURS SORUMLUSU / COURSE INSTRUCTOR: ERDAL KARAOĞUZ, TUNÇ AKKOÇ

- 09:00 - 09:30 KÖK HÜCRE LABORATUVARININ TEKNİK ÖZELLİKLERİ VE ASEPTİK KOŞULLAR
TECHNICAL PROPERTIES OF STEM CELL LABORATORY AND ASEPTIC CONDITIONS
ERDAL KARAOĞUZ
- 09:30 - 10:00 TEMEL KÖK HÜCRE VE TEKNİKLERİ- PRİMER SUSPANSİYON, TEK TABAKALI VE ÜÇ BOYUTLU KÜLTÜR
BASIC STEM CELL TECHNIQUES- PRIMER SUSPENSION, ONE LAYER AND THREE DIMENSION CULTURE
HAKAN DAPICI
- 10:00 - 10:30 SUB KÜLTÜR, HÜCRE SAYIMI YÖNTEMLERİ, DONDURMA- ÇÖZME
SUBCULTURE, CELL COUNTING TECHNIQUES, FREEZE-THAW
TOLGA AKKOÇ
- 10:30 - 11:00 KAHVE ARASI / COFFEE BREAK
- 11:00 - 11:30 HÜCRE ÇOĞALIM İNDEKSİ VE CANLILIK TESTLERİ, IN VITRO FARKLI LAŞTIRMA
CELL REPRODUCTION INDEX AND VIABILITY TESTS, IN VITRO DIFFERENTIATION
RABIA KAYIRHAN
- 11:30 - 12:00 KÖK HÜCRELERİN İMMUNOFENOTİPİK KARAKTERİZASYONU
Flow Sitometri - İmmünohistokimya
IMMUNOPHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF THE STEM CELLS
Flow Cytometry - Immunohistochemistry
MLAZZEZ GÖKALP
- 12:00 - 12:30 KURS SONU SINAVI / COURSE EXAM

SALON B HALL B

KURS II

HÜCRESEL İMMÜNÖTERAPİ OKULU SCHOOL OF CELLULAR IMMUNOTHERAPY

KURS SORUMLUSU / COURSE INSTRUCTOR: ERCÜMENT ÖVALI

- KURS BAŞKANI / COURSE DIRECTOR: ÖRSPÖR DİLEK KANCAĞI
- 09:00 - 09:30 DENOTRİK CELL VACCİNE ÜRETİMİ / DENOTRİK CELL VACCINE PRODUCTION
RENEM YURUL
- 09:30 - 10:00 ÇIK ÜRETİMİ / ÇIK PRODUCTION
BULUT YURTISEVER
- 10:00 - 10:30 TIL ÜRETİMİ / TIL PRODUCTION
MUHAMMET YILANCI
- 10:30 - 11:00 KAHVE ARASI / COFFEE BREAK
- 11:00 - 11:30 VIRUS SPESİFİK T CELL ÜRETİMİ / VIRUS SPECIFIC T-CELLS PRODUCTION
GÖZDE ŞİR
- 11:30 - 12:00 CAR T CELL ÜRETİMİ / CAR T-CELLS PRODUCTION
DERYA DİLEK KANCAĞI
- 12:00 - 12:30 KURS SONU SINAVI / COURSE EXAM

SALON C HALL C

KURS III

KÖK HÜCREDE STANDARTLAR OKULU SCHOOL OF STANDARDS IN THE STEM CELL

KURS SORUMLUSU / COURSE INSTRUCTOR: ERDAL KARAOĞUZ, ERCÜMENT ÖVALI

KURS BAŞKANI / COURSE DIRECTOR: TALEK SÜRÜR

- 09:00 - 09:20 İLERİ TIBBİ TEDAVİ ÖRNEKLERİNDE SINIFLAMA / CLASSIFICATION IN ADVANCED MEDICAL TREATMENT
CANSU HEMŞİNLİĞÜ YEMENÇİOĞLU
- 09:20 - 09:50 GÜNCEL GMP YE GİRİŞ / INTRODUCTION TO UPDATE GMP
FATMA EYÜBOĞLU ÜNÜVAR
- 09:50 - 10:10 DOKÜMANTASYON VE ETİKETLEME / DOCUMENTATION AND LABELLING
İREM YELMAZ
- 10:10 - 10:30 DEĞİŞİKLİK KONTROL VE DENETİMLER / CONTROL OF ALTERATION AND SUPERVISION
FATMA EYÜBOĞLU ÜNÜVAR
- 10:30 - 10:40 KAHVE ARASI / COFFEE BREAK
- 10:40 - 11:00 KALİTE KONTROL / QUALITY CONTROL
OLGA NEHRİ ÖZTEL
- 11:00 - 11:20 VALIDASYON / VALIDATION
OLGA NEHRİ ÖZTEL
- 11:20 - 11:40 RİSK ANALİZİ / RISK ANALYSIS
GÜLŞEN GÖNEL
- 11:40 - 12:00 PROCESS KONTROL / PROCESS CONTROL
FATMA EYÜBOĞLU ÜNÜVAR
- 12:00 - 12:30 KURS SONU SINAVI / COURSE EXAM

12 Nisan 2019 / 12 April 2019

SALON A / HALL A

PANEL I HÜCRESEL TEDAVİLER / CELLULAR THERAPIES

Ölçüm Başkanları / Session Chairmans: ERCÜMENT ÖVALI, TUNÇ AKKOÇ

13:30 - 14:00 Hücresel Tedaviler ve Uluslararası Regülasyonlar / Cellular Therapies and International Regulations

EMİN KANSU

14:00 - 14:30 The Mission of ISSCA and Stem Cell Therapy for Disease

DAEYONG KIM (Korea)

14:30 - 15:00 Bir Gül Bahçesi: Hücresel Tedaviler / A Rose Garden: Cellular Therapies

NUR BİRGEN

15:00 - 15:15 KAHVE ARASI / COFFEE BREAK

TARTIŞMALI OTURUM I / DEBATE SESSION I

Ölçüm Başkanları / Session Chairmans: GÜLİNVAZ ERCAN, PINAR YALINAY DİKMEN

15:15 - 15:45 MS Otoolog Transplant ile Tedavi Edilmeli midir? / Should MS be treated by Autologous Transplant?

SEVGİ BEŞİŞİK KALAYOĞLU

15:45 - 16:15 MS Hastalığında Kök Hücre Tedavisinin Yeri / MS can't be treated by Autologous Transplant

GÜLŞEN AKMAN DEMİR

16:15 - 16:30 KAHVE ARASI / COFFEE BREAK

16:30 - 16:50 MKH Retinis Pigmentaosum için Tedavi Seçeneği midir? / Are MSCs an option for treatment of Retinitis Pigmentosa?

TUĞRUL ALTAN

16:50 - 17:10 Retinis Pigmentaosum da MKH ile Tedavi Önemli Bir Seçenektir / MKH treatment is an important option in Retinitis Pigmentosa treatment

AYŞE ÖNER

17:10 - 17:30 KAHVE ARASI / COFFEE BREAK

PANEL II AZ BİLİLEN HÜCRESEL TEDAVİLER

UNDERRECOGNISED CELLULAR THERAPIES

Ölçüm Başkanları / Session Chairmans: ADİL ALLAHVERDİYEV, M. İBRAHİM TUĞLU

17:30 - 17:50 Genel Cerrahide Kök Hücre Uygulamaları / Stem Cell Applications in the General Surgery

GÖKHAN ADAŞ

17:50 - 18:10 Hepalocyte Transplantation: Current and Future Developments

MUSTAFA NAJIMI

18:10 - 18:30 Meme Kanserinin İmmünoterapisinde Çeşitli Yaklaşımlar / The Different Approaches in Immunotherapy Against Breast Cancer

ADİL ALLAHVERDİYEV

13 Nisan 2019 / 13 April 2019

SALON A / HALL A

PANEL III - DOKU MÜHENDİSLİĞİ / TISSUE ENGINEERING

Ötürüm Başkanları / Session Chairmen: FIKRETTİN SAHİN, VASİF HASIRCI

- 09:00 - 09:20 **Doku Mühendisliği ve Gelişme Açılan / Tissue Engineering and Development Aspects**
VASİF HASIRCI
- 09:20 - 09:40 **Mezenkimal Kök Hücrelerin Kardiyak Doku Mühendisliğinde Kullanım Potansiyelleri**
Application Potentials of Mesenchymal Stem Cells in Cardiac Tissue Engineering
KESKİN ULUBAYRAM
- 09:40 - 10:00 **Erişkin Kök Hücreler ve Doku Mühendisliği / Mature Stem Cells and Tissue Engineering**
AYŞEN TEZCANER
- 10:00 - 10:20 **Yenili Doku Mühendisliği Yaklaşımlarında Kök Hücre Uygulamalar**
Stem Cell Applications in the Aspect of Versatile Tissue Engineering
DENİZ YÜCEL

10:20 - 10:40 **KAHVE ARASI / COFFEE BREAK**

PANEL V - HEMATOPOYETİK KÖK HÜCRE NAKİLLERİNDE HÜCRESEL MANİPOLASYONLAR

CELLULAR MANIPULATIONS IN HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTS

Ötürüm Başkanları / Session Chairmen: ALI ÜNAL, ERCÜMENT ÖZAL

- 10:40 - 11:00 **Kök Hücre Nakilinde Engraftment Yeterliliğinin Nedenleri**
The Reasons of Engraftment Deficiency in Stem Cell Transplant
MUTLU AKAT
- 11:00 - 11:20 **Kök Hücre Nakillerinde Deplasyon veya Seleksiyon İşlemlerinin Önemi**
The Importance of Depletion and Selection Applications in Stem Cell Transplants
GÜLYÜZ ÖZTÜRK
- 11:20 - 11:40 **GVHD Kontrolünde MKH**
MKH in the Control of GVHD
DİDEM ATAY
- 11:40 - 12:00 **Transplantasyonda Virus Spesifik T Lenfositlerin Rolü / The Role of Virus Specific T Lymphocytes in Transplantation**
MUSA KARAKÜÇÜ
- 12:00 - 12:20 **TARTIŞMA / DISCUSSION**

12:20 - 13:10 YEMİKLİ SATELİTLE SEMPOZYUMU / SATELLITE SYMPOSIUM WITH LUNCH /

BioTrend & RAKH Healthcom

Ötürüm Başkanları / Session Chairmen: VASİF HASIRCI

Konuşmacı / Speaker: JEEHEE KIM

13:10 - 13:30 POSTER SUNUMLARI / POSTER PRESENTATIONS

PANEL VII - KARDİYOYASKÜLER HASTALIKLARDA HÜCRESEL TEDAVİLER

CELLULAR APPLICATIONS IN CARDIOVASCULAR DISEASES

Ötürüm Başkanları / Session Chairmen: RYHAN ÖLÇAY, ENDER ÖDEMEŞ

- 13:30 - 13:50 **Dilatekardiyomegaliye İskemik Kalp Hastalıkları ve Kardiyomyopatlere Hücresel Tedavi**
Ischemic Heart Diseases in Dilated Cardiomyopathy and Cellular Therapy in Cardiomyopathies
ENDER ÖDEMEŞ
- 13:50 - 14:10 **Mi Sıvazı İskemik Kardiyomyopati Tedavisinde MKH'nin Taahhüt ve Deplasyon Koşullarının Belirlenmesi**
Determining the Storage and Transfer Conditions of MSCs for the Treatment of Ischemic Cardiomyopathy Post MI
ALP CAN
- 14:10 - 14:30 **Kritik Limb İskemilerinde Hücresel Tedavi Uygulamaları / Cellular Therapy Applications in Critical Limb Ischemia**
SERKAN DÜRDÜ
- 14:30 - 14:50 **Kök Hücreler Kullanılarak 3D Biyobaskı Yöntemiyle Damar Yapımı**
Designing a 3D Bioprinted Blood Vessel with Stem Cells
HAKAN DARICI
- 14:50 - 15:00 **KAHVE ARASI / COFFEE BREAK**
- 15:00 - 15:40 **SATELLİTLE SEMPOZYUMU II / SATELLITE SYMPOSIUM, II: YAGAN BİLİMLERİ**
Hücre Tedavisi Üretimindeki Zorluklarla Nasıl Başa Çıkılır? / How to address challenges in cell therapy manufacturing?
GÖNCALO REGALO

Single Use (tek kullanımlık) Tabanlı Biyoreaktör ile NK (Natural Killer) Hücre Kültürü Tecrübesi

NK cell expansion experience with Single Use based Bioreactor

CHAH TAŞTAN

PANEL IX - GEN TEDAVİLERİ / GEN THERAPIES

Ötürüm Başkanları / Session Chairmen: DURAN CANATAN, DİLEK TELCI

- 15:50 - 16:10 **Gen Tedavileri Ne? Nasıl? / Gene Therapies. What? How?**
CİHAH TAŞTAN
- 16:10 - 16:30 **Beta Talasemi ve Sickle Cell de Gen Tedavileri / Beta Thalassemia and Sickle Cell Gene Therapies**
ARJU AKÇAY
- 16:30 - 16:50 **Metabolik Hastalıklarda Gen Tedavileri / Gene Therapies in Metabolic Diseases**
YUSUF GÖKUL
- 16:50 - 17:10 **Hemofilde Gen Tedavileri / Gene Therapies in Hemophilia**
BULENT ZULFUKAR
- 17:10 - 17:20 **TARTIŞMA / DISCUSSION**
- 17:20 - 17:40 **KAHVE ARASI / COFFEE BREAK**

SALON B / HALL B

PANEL IV - PLASTİK CERRAHI VE DERMATOLOJİDE HÜCRESEL TEDAVİLER

CELLULAR THERAPIES IN PLASTIC SURGERY AND DERMATOLOGY

Ötürüm Başkanları / Session Chairmen: CEMAL KARADAG SAĞ, MEHMET BOZKURT

- 09:00 - 09:20 **Plastic Surgery Applications**
MEHMET VELLİ KARALIN
- 09:20 - 09:40 **Aktive Edilmiş Mezenkimal Kök Hücre, İmmün Modülasyon Tedavilerinin**
Tendon ve Ligaman Hasarının Rejeneratif Tedavisinde Etkinliği
Primed Mesenchymal Stem Cells, Efficacy of Immune Modulation
in the Regenerative Treatment of Tendon and Ligament Injury
ERDEM AKTAŞ
- 09:40 - 10:00 **Stem Cell Therapy for Fallen Hair**
JUNA'D A. SYED (USA)
- 10:00 - 10:20 **Biyomühendislik Uygulamaları ve Kök Hücre / Bioengineering Applications and Stem Cell**
ERKAM TİRKER BAĞIN
- 10:20 - 10:40 **KAHVE ARASI / COFFEE BREAK**

PANEL VI - PLASTİK CERRAHI UYGULAMALARI

APPLICATIONS OF PLASTIC SURGERY

Ötürüm Başkanları / Session Chairmen: GAYE TAYLAN, ÖZAY ÖZKAYA

- 10:40 - 11:00 **Rekonstrüktif Cerrahide Farklı Kaynaklı Stromal Vasküler Fraksiyon ve Ekstrasellüler Matris Kullanımı**
The Application of Different Source of Stromal Vascular Fraction and Extracellular Matrix in Reconstructive Surgery
MEHMET BOZKURT
- 11:00 - 11:20 **Yapay ve Doğal Polimerlerle Hücre Kombinasyonu ve Anti-Aging Etkisi**
Cell Combination with Natural and Artificial Polymers and Anti-Aging Effect
PERÇİN KARAKOL
- 11:20 - 11:40 **Yüz Gençleştirme Hücresel Tedaviler / Cellular Therapies for Facial Rejuvenation**
EBRU YÖRÜK
- 11:40 - 12:00 **PRP-ADSC Destekli Anti Aging Uygulamaları / PRP-ADSC Supported Anti Aging Applications**
ZEKERİYA TOSUN
- 12:00 - 12:20 **Sporlî Yaralanmalarda SVF Uygulamaları / SVF Applications in Sports Injuries**
DNAT ÖZÜMCÜOĞLU

PANEL VIII - ORGAN SPESİFİK HÜCRESEL TEDAVİ UYGULAMALARI

ORGAN SPECIFIC CELLULAR THERAPY APPLICATIONS

Ötürüm Başkanları / Session Chairmen: BİLEÇEN GÖNEN, YE. BAKUR FELİT

- 13:30 - 13:50 **Alerjik Astımda Kök Hücre Uygulamaları / Stem Cell Applications in Allergic Asthma**
TUNÇ AKKOÇ
- 13:50 - 14:10 **Aktif Hücre Hipoplazisi ve Diafragma Herminde Hücresel Tedavi / Cellular Therapy in Lung Hypoplasia and Diaphragma Hernia**
MURAT TÜVYİLDİZ
- 14:10 - 14:30 **Kronik Hepatit ve Siroz da Hücresel Tedaviler / Cellular Therapies in Chronic Hepatitis and Cirrhosis**
MURAT KANTARCIOĞLU
- 14:30 - 14:50 **Maksillo Fasial Cerrahide Hücresel Tedavi Seçenekleri / Cellular Therapy Options in Maxillofacial Surgeries**
BURÇİN GÖNEN
- 14:50 - 15:00 **KAHVE ARASI / COFFEE BREAK**

PANEL X - FİZİK TEDAVİ VE ORTOPEDİDE HÜCRESEL TEDAVİLER

CELLULAR THERAPIES IN PHYSICAL THERAPY AND ORTHOPEDICS

Ötürüm Başkanları / Session Chairmen: ÖNER TAŞER, SİBEL ÇAĞLAR OKUR

- 15:50 - 16:10 **Ortopedi Hücresel Tedavilerin Genel Bir Bakış / An Overview to Cellular Therapies in Orthopedics**
ÖNER TAŞER
- 16:10 - 16:30 **Ortopedi PRP Uygulamaları (HOPE OR HIPE) / PRP Applications in Orthopedics (HOPE OR HIPE)**
KEREM ULKU
- 16:30 - 16:50 **Ortopedi SVF'nin Yeri (HOPE OR HIPE) / SVF in Orthopedics (HOPE OR HIPE)**
ALPER KAYA
- 16:50 - 17:10 **Fizik Tedavide Hücresel Tedavi Uygulamaları / Cellular Therapy Applications in Physical Therapy**
SİBEL ÇAĞLAR OKUR
- 17:10 - 17:20 **Otojen Kondrosit İmplantları / Autologous Chondrocyte Implants**
MURAT BOZKURT
- 17:20 - 17:40 **KAHVE ARASI / COFFEE BREAK**

14 Nisan 2019 / 14 April 2019

SALON A / HALL A

- PANEL XI HEMATO-ONKOLOJİ DE İMMÜNÖTERAPİ / IMMUNOTHERAPY IN HEMATO-ONCOLOGY**
Ötürüm Başkanları / Session Chairmans: ERKAN ÇAVUŞKAN, SEVGI DEŞİŞK KALAYÇIĞLI
- 09:00 - 09:40 **Adaptif İmmünoaterapi Uygulamaları ve Başarılı İmmünoaterapinin Sırları / Adaptive Immunotherapy Applications and The Secrets of a Successful Immunotherapy**
ERCUMENT OVALI
- 09:40 - 10:00 **Hemato-Onkolojide CAR Tedavileri / CAR Therapies in Hemato-Oncology**
KORAY YALÇIN
- 10:00 - 10:20 **Onkolojide CRK ve TL deneyimi / CRK and TL Experience in Oncology**
MUSTAFA ÖZDOĞAN
- 10:20 - 10:40 **Kanser Aşılardan / Cancer Vaccines**
ALJ UNAL
- 10:40 - 11:00 **KAHVE ARASI / COFFEE BREAK**
- PANEL XIII İSKELEM VE NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARDA HÜCRESEL TEDAVİLER / CELLULAR THERAPIES IN ISCHEMIC AND NEURODEGENERATIVE DISEASES**
Ötürüm Başkanları / Session Chairmans: KEMAL HEPDİL, HECARİ KAPLAN
- 10:40 - 11:10 **ATAKİSİ İleride Kök Hücre Uygulama Deneyimleri / The Experience of Stem Cell Applications in ATAKİSİ**
ERDAL KARACİZİ
- 11:10 - 11:30 **CP de Kök Hücre / Stem Cell in CP**
SİBEL ÇAĞLAR OKUR
- 11:30 - 11:50 **Hipoksis Beyin Sendromlarında Hücresel Tedaviler Bir Seçenektir / Cellular Therapy is an Option for Hypoxic Brain Syndromes**
ŞERHUR KARATAŞ
- 11:50 - 12:20 **Hipoksis Beyin Sendromlarında Hücresel Tedaviler Bir Seçenek midir? / Are Cellular Therapies the Option for Hypoxic Brain Syndromes?**
MURAT AKSU
- 12:20 - 13:30 **ÖĞLE YEMEĞİ / LUNCH**
- PANEL XV VERTEBRA VE SPİNAL KORD HASTALIKLARINDA HÜCRESEL TEDAVİLER / CELLULAR THERAPIES IN VERTEBRAE AND SPINAL CORD DISEASES**
Ötürüm Başkanları / Session Chairmans: YANG TENG, ZAFER ÖRİKAN TORUN
- 13:30 - 13:50 **Reactive Astroglial Intermediate Filaments and Efficacy of Neural Stem Cells: Insight Gained from Experimental Spinal Cord Injury**
YANG TENG
- 13:50 - 14:10 **Stem Cell Transplantation for Acute Spinal Injury**
DINH HOA NGUYEN
- 14:10 - 14:30 **Omurga Cerrahisi Uygulamaları / Applications of Spinal Surgery**
HACİ MUSTAFA ÇİDEMİR
- 14:30 - 14:50 **Spinal Kord Yaralanmasında Kök Hücre Uygulamaları / Stem Cell Applications in Spinal Cord Injuries**
ERDİNÇ ÖZVEKİL
- 14:50 - 15:00 **KAHVE ARASI / COFFEE BREAK**
- 15:00 - 15:40 **SATELLİTE SEMPOZYUMU III: Nükleer A.S. - Mikrobiyal Biotek. / CAR-T Cell Üretimi / CAR-T Cell Manufacturing**
CAR-T Cell Üretimi / CAR-T Cell Manufacturing
CAR-T Cell Manufacturing
Ötürüm Başkanları / Session Chairmans: SİREK RAYP
- Dünya da CAR-T Cell Üretim Metodları ve Sorunları / CAR-T Cell Manufacturing Methods and Challenges in the World
ERCUMENT OVALI
- Ötüm ve Kapalı Bir Sistemle CAR-T Cell Üretimi / Enabling CAR-T Cell Therapy Through A Closed System Manufacturing
MATTHIAS ENGEL
- 15:40 - 15:50 **KAHVE ARASI / COFFEE BREAK**
- TARTIŞMALI OTURUM II / DEBATE SESSION II**
Ötürüm Başkanları / Session Chairmans: PINAR YALINAY DİKMEN, UĞUR SEZERMAN
- 15:50 - 16:10 **Musküler Distrofilerde Kök Hücre Önemli Bir Seçenektir / Stem Cell is an Important Option in Muscular Dystrophy**
ERCUMENT OVALI
- 16:10 - 16:30 **Musküler Distrofilerde Hücresel Tedavilerin Bir Yeri Yoktur / There is no place in cellular therapies for Muscular Dystrophy**
KAHVE ARASI / COFFEE BREAK
- 16:30 - 16:50 **KAHVE ARASI / COFFEE BREAK**
- 16:50 - 17:10 **KONFERANS / CONFERENCE**
Hücresel Tedavilerde İdari Düzenleme: Sağlık Bakanlığının Bakış Açısı / Administrative Regulations in Cellular Therapies: The Perspective of Ministry of Health
ÖZLEM YEĞİN YAKUT
- ÖDÜL TÖRENİ & KAPANIŞ / PRIZE-GIVING CEREMONY & CLOSING CEREMONY**
- 17:10 - 17:30 **GAZİ NASHİP TUĞLU ÖZEL ÖĞRENCİ PROJE ÖDÜL TÖRENİ / GAZİ NASHİP TUĞLU SPECIAL STUDENT PROJECT AWARD CEREMONY**
- 17:30 - 18:00 **ÖRD. PROF. SÜREYYA TAHSİN AYDIN, ARAŞTIRMA ÖDÜL TÖRENİ VE EN İYİ BİLDİRİ SUNUMU / ÖRD. PROF. SÜREYYA TAHSİN AYDIN RESEARCH AWARD CEREMONY AND THE BEST ABSTRACT PRESENTATION**
- 18:00 **KAPANIŞ TÖRENİ / CLOSING CEREMONY**

SALON B / HALL B

- PANEL XII DOKU VE HÜCRE BANKACILIĞI / TISSUE AND CELL BANKING**
Ötürüm Başkanları / Session Chairmans: M. İBRAHİM TUĞLU, YAVUZ KOCABEY
- 09:00 - 09:20 **HLA Tipendirme ve Hücre Tedavide Önemi / HLA Typology and the Importance in Cellular Therapies**
FATMA SAUVAN OĞUZ
- 09:25 - 09:50 **TÜRKÖK Projesi / TÜRKÖK Project**
MURAT ÖZTÜRK
- 09:50 - 10:15 **Kordon ve Kordon Kanı Bankacılığı / Cord and Cord Blood Banking**
NİL BANLI PELİT
- 10:15 - 10:40 **Doku Bankacılığı / Tissue Banking**
UTKU ATEŞ
- 10:40 - 11:00 **KAHVE ARASI / COFFEE BREAK**
- PANEL XIV TEMEL BİLİMLER / BASIC SCIENCES**
Ötürüm Başkanları / Session Chairmans: HARETİN SAHİN, ADIL ALLANERDİYEV
- 10:40 - 11:00 **KaHVerde Kalsiyum Zamanlı Modülasyon Kök Hücre Döngüsünü Etkilemekte midir? / Temporal modulation of calcium sensing in HSCs is crucial for proper HSC cell cycle re-entry**
FATİH KOCABAŞ
- 11:00 - 11:20 **Yapay Trakea / Artificial Trachea**
AYŞEGÜL KARAAALIN
- 11:20 - 11:40 **Organoid Tabii / Organoid Medicine**
ESRA ERDAL
- 11:40 - 12:00 **İzolasyondan Applikasyona Eksozomlar / Exosomes: Isolation to Application**
NESLİHAN TAŞLI
- 12:00 - 12:20 **Zigot İndücelen Progesteron Hücresi (ZİP-H)**
ELİF GANİME AYDIN
- 12:20 - 13:30 **ÖĞLE YEMEĞİ / LUNCH**
- PANEL XVI İMMÜNOLOJİ VE HÜCRESEL TEDAVİLER / IMMUNOLOGY AND CELLULAR THERAPIES**
Ötürüm Başkanları / Session Chairmans: GÖKHAN ADAŞ, YUSUF ÖZKUL
- 13:30 - 13:50 **İnsan Genetik Araştırmalarının İmmün Sistem Hastalıklarının Çözümünde rolü: CHAPLE ÖRNEĞİ / The Role of Human Genetic Researches in the Solution of Immune System Diseases: CHAPLE EXAMPLE**
AHMET ÖZEN
- 13:50 - 14:10 **Solid Organ Nakillerinin Hücresel Tedavilerinde MKM'nin Rolü / The Role of MSCs Cellular Therapies of Solid Organ Transplantation**
ERDAL KARACİZİ
- 14:10 - 14:30 **Ötümün Ürteri ve MHK Tedavisi / Autoimmune Urticaria and MSC Therapy**
RABİA BİLGİ ÖZÜL ÖZDEMİR
- 14:30 - 14:50 **Ötüm Hastalıklarında Hücresel Tedaviler / Cellular Therapies in Autoimmune Diseases**
TUNÇ AKKOÇ
- 14:50 - 15:00 **KAHVE ARASI / COFFEE BREAK**

BİLDİRİ PROGRAMI 12 Nisan 2019

SUNUM DETAYI	BİLDİRİ NUMARASI	SUNAN YAZAR	BİLDİRİ BAŞLIĞI
SÖZLÜ SUNUMLAR 12 NİSAN 2019 - Cuma 18:30 - 19:30 SALON A Ötürüm Başkanları: ERDAL KARAÖZ TUNÇ AKKOÇ	SS001	Gamze Tümentemur	Ex-vivo whole uterine tissue culture
	SS002	Özen Önal	Şıçanlarda kemoterapi sonrası yağ dokudan elde edilen mezenkimal kök hücre tedavisinin primordiyal foliküllerdeki pten/akt/foxo3a yolağına etkisi
	SS003	Ayşe Öner	Optik nöropatili olgularda suprakoroidal mezenkimal kök hücre implantasyonu
	SS004	Ayşe Öner	İleri evre retinitis pigmentozalı iki olgunun subretinal mezenkimal kök hücre implantasyonu sonrasında 4 yıllık takip sonuçları
SÖZLÜ SUNUMLAR 12 NİSAN 2019 - Cuma 18:30 - 19:30 SALON B Ötürüm Başkanları: BURÇİN GÖNEN ELİF GANİME AYDENİZ	SS005	Fatma Eyyüboğlu Ünüvar	Kullanıma Hazır Rejeneratif Tıp Ürünü: Ünsersal İnsan Plateletten Zengin Plazması
	SS006	Ekın Şimşek	İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler için bitkisel mülisil kaynaklı 3-boyutlu doku mühendisliğı iskelelerinin üretimi
	SS007	Tuncay Taş	Metabolik sendromlu erektil disfonksiyona sahip hastalarda otolog adipoz türevli rejeneratif hücre ve plateletten zengin plazmanın tek doz intrakavermöz enjeksiyonun tolere edilebilirliğı, güvenliğı ve potansiyel etkinliğı
	SS008	Mutlu Yaka	Deneysel olarak asherman sendromu oluşturulan şıçanlarda adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre tedavisi
SÖZLÜ SUNUMLAR 12 NİSAN 2019 - Cuma 18:30 - 19:30 SALON C Ötürüm Başkanları: ALP CAN NUR BİRGEN	SS009	Özlem Sezer	Kültüre edilmiş amniotik hücrelerde mezenkimal kök hücre özelliklerinin tayini: morfolojik tiplendirme, yüzey antijen ekspresyonu (immüfenotipleme) ve osteojenik, adipojenik, kondrojenik farklılaşma
	SS010	Ezgi Çokaklı	Unique stem cell profile of amniotic fluid cells determined by expression status of pluripotency markers.
	SS011	Ayşegül Hanife Mendi	Dental pulpa ve kemik iliğı mezenkimal kök hücrelerinin <i>Hypericum perforatum</i> (sarı kantaron) etanol ekstresi ile prekonüksiyonunda osteojenik farklılaşmanın takip edilmesi ve adrenerjik reseptör ekspresyonu ile ilişkininin araştırılması
	SS012	Esra Aydemir	The effect of cumulus cell conditional media on osteogenic differentiation
TEMATİK SUNUMLAR 12 NİSAN 2019 - Cuma 18:30 - 19:30 SALON D Ötürüm Başkanları: GÖKHAN ADAŞ İBRAHİM TUĞLU	TS001	Duygu Yaşar Şirin	Radyolojik görüntüleme ve nörolojik hasarın önlenmesinde kullanılan ilaçların intervertebral disk dokusunun rejenerasyonu üzerine etkisi
	TS002	Taha Baru Hayal	The potential role of Apelin receptor signaling in skin regeneration: A fibroblast perspective
	TS004	Ahmet Özyazgan	kök hücre ile tedavi edilen gonartrozlu vakalarda klinik sonuçlarımız
	TS005	Cenk Eray Yıldız	Successful treatment of a 20-year nonhealing venous leg ulcer in a patient with systemic lupus erythematosus
	TS006	Ahmet Eken	Characterization of Treg cells generated in the presence of group 3 innate lymphoid cells
	TS007	Sema Aygar	Uyanılmış pluripotent kök hücre bankacliğında kullanıma yönelik, besiyeri tabanlı karşılaştırma çalışması
	TS008	Aynura Mammadova	Hematopoetik kök hücre (HKH) regülasyonunda Nöropeptid Y (NPY)' in rolünün incelenmesi
	TS023	Yazgöl Duran	Dental Folikül Mezenkimal Kök Hücrelerin Pemphigus Vulgarisli Hastaların Dendritik Hücre Ve Lenfositleri Üzerindeki İmmünregülatör Etkilerinin Araştırılması
TEMATİK SUNUMLAR 12 NİSAN 2019 - Cuma 18:30 - 19:30 SALON E Ötürüm Başkanları: FİKRETTİN ŞAHİN MEHMET BOZKURT	TS009	Havva Tezcan	MicroRNA-let-7a functions as a tumor suppressor and inhibits cancer stem cell growth in triple negative breast cancer by targeting PIK3CA .
	TS010	Hüsamettin Vatansev	hsa-miR-128-1-5p Regulates Expression of NR3C2 mRNA Expression in Human Adrenal Gland Carcinoma
	TS011	Esra Eroğlu Köksal	Doğal biyoaktif timokinon, kafeik asit fenetil ester ve fukoidan bileşenleri anti-meme kanseri aktiviteilerinin triple-negatif MDA-MB-231 hücrelerinde araştırılması
	TS012	Gülşen Buğday	Multipl Miyelom Hücrelerine Karşı Otolog Kök Hücre ve Mononükleer Hücrelerinden Dendritik Hücre Üretimi (Tümör Aşısı Üretimi)
	TS013	Gökçen Dinç	Nötropenik farelerde karbapeneme dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i> sepsis modelinde mezenkimal kök hücre tedavisinin etkinliğı
	TS015	Buket Banu Özkan	Diş Pulpası, Yağ ve Umbilikal Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Hücreyel Özellikler Açısından Karşılaştırılması
	TS016	Nur Seda Şahin	Dondurulmuş mezenkimal kök hücrelerin enflamatuvar sitokin ekspresyon seviyelerine etkisinin değerlendirilmesi
TS017	Raife Dilek Turan	İmmünoterapi Ürünü Sitokin İle İndüklenmiş Öldürücü Hücrelerin Karakterizasyonundaki Farklılıkların Sebepleri	

BİLDİRİ PROGRAMI 13 Nisan 2019

SUNUM DETAYI	BİLDİRİ NUMARASI	SUNAN YAZAR	BİLDİRİ BAŞLIĞI
SÖZLÜ SUNUMLAR 13 NİSAN 2019 - Cumartesi 17:40 - 18:40 SALON A Oturum Başkanları: DİLEK TELCİ YUSUF ÖZKUL	SS013	Aynura Mammadova	D-Ala2,D-Leu5,Enkefalin hematopoetik kök hücreleri in vitro oksidatif stres ve endoplasmik retikulum streslen korumaktadır.
	SS014	Burcu Pervin	RAG2-/- ağır kombine immün yetmezliği hematopoetik kök hücre nakli ve gen tedavi optimizasyonu
	SS015	Ghan Taştan	CD19 pozitif kanser türlerine spesifik transgenik CAR-T hücre (ISIKOK 19) in vitro etkinlik sonuçları
	SS016	Derya Dilek Kaçağı	CD19 Spesifik CAR T Hücreler (ISIKOK 19) – Acıbadem Labcell Preklinik in vivo Çalışma Verileri
SÖZLÜ SUNUMLAR 13 NİSAN 2019 - Cumartesi 17:40 - 18:40 SALON B Oturum Başkanları: NİL BANU PELİT ADİL ALLAHVERDİYEV	SS017	Gülen Güney Esken	Griselli Tip 2 Mezenkimal Kök Hücrelerden uyarılmış pluripotent kök hücre geliştirilmesi ve in vitro hematopoetik farklılaşması
	SS018	Gökhan Polat	Allojenik Segmental Menisküs Transplantasyonu; Histolojik İyileşme Sonuçlarının Poliüretan SkafoId Uygulaması ile Karşılaştırılması
	SS019	Emine Tural	Glioblastom sferoidleri ve organoidleri
	SS020	Nevin Ersoy	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Kaynaklı Kornea Organoidleri
SÖZLÜ SUNUMLAR 13 NİSAN 2019 - Cumartesi 17:40 - 18:55 SALON C Oturum Başkanları: DENİZ YÜCEL DURAN CANATAN	SS021	Alper Tunga Özdemir	Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre ve Makrofaq Etkileşimleri
	SS022	Erzi Avşar Abdik	A new perspective for treatment of castration resistant prostate cancer: combination of Erufosine and ABT-737
	SS023	Neslihan Sinim Kahrman	Can Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Be Used In Retinal Diseases: A Case Presentation of Leber Congenital Amaurosis
	SS024	İbrahim Halil Gürnar	Primer ve Metastatik Kolon ve Meme Kanseri Hücre Hatlarında Hipoksik Koşullarda Exosom İçeriği
	SS025	Necati Kaplan	Spinal Kord Yaralanmasında Klinik Kök Hücre Uygulamaları (Deneyim)
TEMATİK SUNUMLAR 13 NİSAN 2019 - Cumartesi 17:40 - 18:40 SALON D Oturum Başkanları: İBRAHİM TUĞLU TOLGA AKKOÇ	TS018	Burcu Denizlioğlu	ADİPOZ DOKU KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN (AD-SCs) KÜLTÜRASYONUNDA VE ADİPOZİTLERE FARKLIŞTIRILMASINDA TROMBOSİTEN ZENGİN PLAZMANIN (PRP) ETKİNLİĞİ
	TS019	Mehmet Oktar Güloğlu	3-Deazaneplanocin A (DZNep) kills proliferating cells and increases expression of midbrain dopaminergic genes in hESC-derived neural progenitors
	TS020	Nezaket Türkel Sesli	Sodium pentaborate pentahydrate in combination with F68 pluronic block polymer represses adipogenic differentiation from human adipocyte stem cells and thereby restricts fat accumulation.
	TS021	Yasemin Oyacı	Kök hücre bağıçlılığı farklılıklarının değerlendirilmesi
	TS022	Sema Aygar	Donör kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin çevresel stres altında gösterdikleri hücresel yanıtın fonksiyonel analizi
TEMATİK SUNUMLAR 13 NİSAN 2019 - Cumartesi 17:40 - 18:40 SALON E Oturum Başkanları: KORAY YALÇIN UTKU ATEŞ	TS024	Erek Öztürk	Evaluation of Superoxide Dismutase Enzyme Levels in Patients with Degenerative Lumbar Spine
	TS025	Hüseyin Abdik	Using extracellular vesicles isolated from grapefruit as a wound healing agent
	TS026	Derya Sağraç	The effect of exosomes isolated from human foreskin stem cells on wound healing
	TS003	Seçkin Karataş	Pomegranate ile desteklenen yağ doku mezenkimal Kök Hücre tedavisinin deneysel testis iskemik hasarında etkileri
	TS014	Sude Tuğlu	Kültürde mezenkimal kök hücreden farklı osteoblastlar ile oluşturulan diyabetik osteoporoz kırık taklidinde kök hücre ve nar ekstraktının iyileşme üzerine etkileri

BİLDİRİ PROGRAMI 13 Nisan 2019

<p>POSTER SUNUMLARI ASIM TARİHİ: 12 NİSAN 2019 POSTERLER KONGRE BOYUNCA ASILI KALACAKTIR</p> <p>POSTER ZİRAYETLERİ 13 NİSAN 2019 - Cumartesi 13:10 - 13:30</p>	PS001	Dijle Kıpman Korgun	Kronik Böbrek Yetmezliğinin Progresyonunda Adiponektin Üzerine Plasenta Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Etkisi
	PS002	Dilek Bahar	Farklı Yöntemlerle İzole Edilmiş Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Ekzozomlarının Protein Konsantrasyonu ve Ekzozom Miktarı Açısından Karşılaştırılması
	PS003	Furkan İlker Özbalcı	Pankreatik Duktal Adenokarsinoma Kök Hücre Belirteci Olarak CD44
	PS004	Sevgi Erdem	Glioblastoma Multiforme Kök Hücreleriyle Hazırlanan Dendritik Hücre Aşısı Optimizasyonu
	PS005	Gülin Kavakalan	Aşı Amaçlı Kanser Kök Hücreleri ve Dendritik Hücre Ko-Kültürü
	PS006	Polen Kocak	The comparison of Adipose Derived Stem Cell Exosomes and Wheat-Derived Exosomes on Wound Healing Activity
	PS007	Emin Türkay Korgun	Effects of Human Placental Amnion Derived Mesenchymal Stem Cells on Proliferation and Apoptosis Mechanisms in Chronic Kidney Disease in the Rat.
	PS008	Melek Yuce	Development of Gene Editing Strategies for Human β -Globin (HBB) Gene Mutations
	PS009	İmren Tatlı	Böbrek transplantasyonlarında MIC-A (MHC sınıf I ilişkili A zinciri) ve Sitokin gen polimorfizmlerinin incelenmesi
	PS010	Bahadır Öztürk	MCF-7 Hücre Hattında Twist1 Transfeksiyonunun Radyasyon Duyarlılığına Etkisi
	PS011	İlkay Sak	MDA-MB 231 hücre hattında Twist1 antisens gen transfeksiyonunun radyasyon duyarlılığına etkisi
	PS012	Merve Yıldırım	Effect of Tomato Derived Exosomes on Human Toothgerm Stem Cells
	PS013	İrem Özkan	Effects of Pineapple Derived Exosomes on Human Adipose Stem Cells
	PS014	Muazzez Gökalp	Hashimoto Hastalığında Dental Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Hücresel Tedavide İmmünomodülatör Etkisinin In-Vitro Ortamda Araştırılması

3 kök hücre
ve hücresel tedaviler
kongresi
Joint Meeting With ISSCA

TUBA



TURKISH BIOMEDICAL ASSOCIATION



ISSCA



Tıp Fakültesi



Spor Bilimleri
Fakültesi

12-14 Nisan 2019

Marmara Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi
Arastirma Merkezi Konferans Salonu

Istanbul

KONUŞMACI ÖZETLERİ

Meme Kanserinin İmmünoterapisinde Çeşitli Yaklaşımlar

Adil M. Allahverdiyev

*Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü,
Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı*

Meme kanseri, kadınlarda görülen kanser vakaları arasında ilk sırada olup, dünya genelinde kanserlerin %24,2'sini oluşturmaktadır (DSÖ, 2018). Her yıl ise meme kanserinden ölenlerin sayısı yaklaşık 600.000 bilinmektedir. Bu oran kadınlarda rastlanan kanser kaynaklı ölümlerin %15'ini oluşturmaktadır. Meme kanserinin tedavisinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi klasik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu klasik tedavi yöntemleri hastanın tam olarak iyileşmesini sağlamamakla birlikte gelişen metastazları da engelleyememektedir. Mevcut tedavi yöntemlerinin dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacıyla son yıllarda geliştirilen yeni nesil tedavi yöntemlerinden biri olan immünoterapi bu alanda yeni umutlara yol açmaktadır. Kanser ile mücadelede immünoterapinin amacı immün sistem hücrelerinin daha etkili ve spesifik bir şekilde tümör antijenlerini tanımasını sağlayarak kanser hücrelerine saldırmasını ve yok etmesini sağlamaktır. Farklı kanser türlerine özellikle prostat kanserine karşı son yıllarda geliştirilen hücrel temelli immünoterapötik yaklaşımlarda dendritik hücelere daha çok önem verilmektedir. Ancak bu yönde çeşitli çalışmalar yapılmasına rağmen henüz etkin bir tedavi yöntemi elde edilmesi mümkün olmamıştır. Bunun başlıca nedenlerinden birisi kanser hücrelerinin yüzey antijen moleküllerinin zayıf immünojen özelliğe sahip olması ve aynı zamanda uygun bir adjuvanla kullanılmamış olmasıdır. Ayrıca şimdiye kadar geliştirilen çeşitli formülasyonlarda farklı adjuvanlar kullanmış olsa da, bu adjuvanların kıyaslanarak etkinliğinin incelenmesine yönelik herhangi bir çalışmaya rastlamadık.

Çalışmamızda ilk kez olarak meme kanserine karşı dendritik hücre temelli antijen sunan hücrelerin ve çeşitli adjuvanların (kimyasal, bitkisel ve polimer kaynaklı) immünoterapötik etkinliğinin kıyaslamalı olarak incelenmesi ve efektör hale getirilen T lenfositlerinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda öncelikle gönüllü donörlerin periferik kanından elde edilen mononükleer hücreler dendritik hücelere farklılaştırıldı. Daha sonra ise insan meme kanseri hücrelerinden (MCF-7) antijenin elde edilmesinde dondurup çözme, sonikasyon ve vorteksleme yöntemlerinin kombinasyonu kullanıldı. Ardından hazırlanan antijenler farklılaşan dendritik hücelere Saponin, Freund, CpG-ODN adjuvanlarıyla birlikte yüklendi. Farklılaşmış (CD45+/CD15-) ve indüklenmiş (CD40+, CD80+, CD83+ ve CD86+) dendritik hücrelerinin markerleri flow sitometrik olarak belirlendi. Çeşitli antijen ve adjuvan kombinasyonları ile indüklenmiş dendritik hücreler ile izole edilen T lenfositlerinin kokültürü gerçekleştirildi. Üç günlük kokültürün ardından kültür süpernatantı toplandı ve indüklenmiş dendritik hücrelerin immünoterapötik etkileri ELİSA yöntemiyle sitokin salımının incelenmesiyle, sitotoksik etkileri ise MCF-7 hücrelerinin LDH aktivitesinin belirlenmesi aracılığıyla tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, indüklenmiş dendritik hücrelerin T lenfositleri ile kokültürü sonucunda efektör hale gelen T lenfositlerinin yüksek düzeyde IL-12p70 ve IFN-gamma salgıladıkları ve aynı zamanda MCF-7 meme kanser hücreleri üzerinde anlamlı düzeyde sitotoksik etkinlik gösterdikleri tarafımızca tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarımız meme kanseri hücre antijenleri ile çeşitli polimerik ve bitkisel temelli adjuvanların bir arada kullanılmasıyla yüksek düzeyde immünoterapötik ve sitotoksik etkinlik gösterme potansiyeline sahip dendritik hücre temelli yeni nesil aşı adaylarının geliştirilebileceğini ortaya koymaktadır.

Ortopedide Stromal Vasküler Fraksiyonun Yeri

Alper Kaya

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

Yaralanmış veya aşınmış dokularda kök hücrelerin rejeneratif etkiyle iyileşmeye katkıda bulunması nedeniyle günümüzde bu hücreleri içeren tedaviler kas iskelet sistemi hastalıklarında kullanılmaktadır. In vitro ve hayvan çalışmalarında kök hücrelerin kırıkta, kemik ve tendon gibi dokularda rejenerasyon sağlama potansiyeli olduğu ve kırıkta ve kemik dokusuna dönüşebildiği gösterilmiştir. Yağ dokusu kökenli stromal vasküler fraksiyon (SVF) hücrel tedaviler içinde, kolay elde edilebilir olmaları nedeniyle gerek enjeksiyon gerekse cerrahi sırasında uygulamalarla yer almaktadır. SVF tedavisi osteoartrit, tendon yaralanmaları, osteonekroz, kırık iyileşmesi ve kaynamayan kırıklarda denenmektedir. SVF'nin osteoartritte kondrositler üzerinde sitokinler, antiinflamatuvar mediatörler ve immünregülatör mediatörler üretimi ile parakrin etkisi de gösterilmiştir. Liposuction yöntemiyle otolog yağ dokusunun kollajenaz ile ayrıştırılması ve santrifüj-dilüsyon işlemleriyle elde edilen SVF içeriğinde mezenkimal kök hücreler, perisitler, vasküler adventisyal hücreler, preadipositler, fibroblastlar, monositler, makrofajlar, eritrositler, fibröz doku ve ekstraselüler matriks yer almaktadır. SVF ile teorik olarak 100 gram yağ dokusundan 0.5-20 milyon kadar yağ kökenli kök hücre elde edilebilmektedir. Elde edilen kök hücreler eklem içine veya hasarlı dokuya enjekte edilerek ya da sentetik matriksler içine yerleştirilerek kullanılmaktadır. SVF'nin günümüzde ortopedide en fazla kullanım alanı bulunduğu hastalık osteoartrittir. Diz gibi büyük eklemlerin osteoartritte inflamasyonu azaltması ve kırıkta rejenerasyonu sağlama potansiyeli nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Olgu serileri ve kohort çalışmalarda SVF ile veya SVF ile birlikte trombositten zengin plazma (PRP) ve/veya hyaluronik asit ile tedavi edilen hastalarda ağrıda azalma, klinik skorlarda düzelme ve hastaların günlük aktivitelerinde artış bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve artroskopik gözlem ile kırıkta yenilenme olduğu da belirtilmiştir. Karşılaştırmalı, prospektif çift kör bir çalışmada bir dizine hyaluronik asit, diğer dizine SVF enjeksiyonu yapılan hastalarda klinik ve radyolojik olarak SVF uygulanan dizde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir. SVF tedavisi ağrı ve şişlik gibi yan etkilerin hastaların ortalama ancak %5'inde görüldüğü, güvenli, uygulanması kolay ve umut vaat eden bir tedavi seçeneği olarak görülmektedir. Ancak bu yöntemle iyi sonuç bildirilen yayınlarda yöntemin endikasyon sınırları, uygulanması, hasta seçimi, süresi, tekrarlanabilirliği gibi konularda standardizasyon olmaması çalışmaların kanıt düzeyinin yetersiz olmasına ve henüz standart tedavi protokolleri arasında yer almamasına neden olmaktadır. Kanıt düzeyinin artması için yeterli sayıda randomize, ileriye dönük kontrollü çalışmalara gereksinim vardır.

Kaynaklar:

Ha, CW, Park YB, Kim SH, et al. Intraarticular mesenchymal stem cells in osteoarthritis of the knee: A systemic review of clinical outcomes and evidence of cartilage repair. Arthroscopy; 2018

Pak J, Lee JH, Park KS, et al. Current use of autologous adipose derived stromal vascular fraction cells for orthopaedic applications. J Biomedical Science 2017

Hurley ET, Yasui Y, Gianakos AL, et al. Limited evidence for adipose-derived stem cell therapy on the treatment of osteoarthritis. Knee Surg Sports Traumatolog Arthrosc 2018

Beta Talasemi ve Sickle Cell de Gen Tedavileri

Arzu Akçay

*Acıbadem Üniversitesi, Acıbadem Atakent Hastanesi,
Çocuk Hematoloji-Onkoloji ve Çocuk Kök Hücre Nakli Ünitesi*

Beta talasemi ve orak hücreli anemi (OHA) beta-globin protein üretiminde kalitatif ve kantitatif defektle sonuçlanan otozomal resesif hastalıklardır. Dünya nüfusunun yaklaşık %7'si hemoglobin geni varyantlarının taşıyıcısıdır ve her yıl 330.000'den fazla OHA'li bebek doğmaktadır. Hematopoietik kök hücre nakli (HKHN) küratif tek tedavi şeklidir ve HLA tam uyumlu kardeş donörlerde hastalısız sağ kalım %80'in üzerindedir. Ancak yüksek riskli hastalarda uygun akraba dışı donörlerden (MUD) yapılan nakillerde genel sağkalım oranı %65'ler düzeyindedir. Ayrıca hazırlama rejimi, graft versus host hastalığı (GvHH) ve graft yetmezliğine bağlı görülen %5-10 oranındaki mortalite de yeni tedavi seçenekleri arayışına neden olmuştur. Gen tedavileri, hemoglobinopatili hastalardan toplanan defektif kök hücrelere, vektör aracılı gen transferi sonrası yapılan olog HKHN ile normal beta globin üretebilen hücrelerin engraftmanının sağlanması yoluyla tedavi etmeyi hedeflemektedir (Şekil 1). Gen tedavilerinde biyomühendislik tekniği kullanılarak murin Moloney lösemi virüsü (retrovirus vektörler; RV), HIV-1 (lentivirus vektörler; LV) ve foamy virus gibi farklı retrovirüslerden elde edilen vektörler kullanılmıştır. Öncelikle virüslerin patojenite ve virülansından sorumlu genetik elementleri uzaklaştırılır ve ardından beta-globin geni ve lokus kontrol bölgesi (LCR) elementleri eklenir. İlk çalışmalar RV ile yapılmış olmakla birlikte hemoglobinopatili hayvan modellerinde en başarılı sonuçlar LV'ler ile alınmıştır. Klinik öncesi çalışmalarda LV'lerin güvenli ve etkili olduklarının gösterilmesiyle çok sayıda klinik çalışma yapılmaya başlanmıştır.

Hemoglobinopatiler için gen tedavisi günümüzde yapılabilen ve olup; β^0/β^E 'li hastalarda kür sağlanabilmiş veya β^0/β^0 'lı hastalarda ve OHA'li bir hastada önemli oranda iyileşme elde edilmiş, diğerlerinde de orta düzeyde transgene ifadesi sağlanmıştır. Sonuçlar cesaret verici olup, tedavi cevabının -engrafmanı sağlanan- dönüştürülmüş hücreye LV'in integrasyon düzeyi ile ve altta yatan hastalığın genotipi ile yakından ilişkili olduğu görülmüştür. Ancak gen tedavisinin küratif kapasitesi altta yatan hastalığın ağırlığı nedeniyle sınırlıdır. Çünkü β^0/β^0 'lı hastalarda hemoglobinin 8-9 gr/dl'nin yükselmesi inefektif eritropoezi engellememektedir. Bu nedenle hastalar aralıklı olarak transfüzyona ihtiyaç duymaktadır. Bu popülasyonda genel transfüzyon yükü dramatik olarak azalmıştır. Hemoglobinopatilerdeki gen tedavisinin klinikte tam etkili olmasının önündeki zorluklar: Engraftman yapması için nakledilen hematopoietik kök hücre dozu, transplantasyon hazırlama rejiminin yoğunluğu, nakledilen genin ekspresyonudur. Eğer engraftmanı sağlanabilen genetik olarak modifiye edilmiş HKH'ler az sayıda ise bunlar, in vivo seleksiyon stratejileri ile miktarları artırılabilir. Ayrıca vektörün gücünün artırılması ile gene ekspresyonu çoğaltılabilir. Engraftman yapabilen HKH'lerin üretimi için, indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPKH) teknolojisinin ilerlemesi ile HKH kaynağı genişletebilir. Gen düzenleme teknolojisi ile de yüksek transgene ifade eden LV gereksinimi ve dolayısıyla LV'nin genotoksisite potansiyel -düşük de olsa- riski ortadan kalkabilir.

Sonuç olarak günümüzde gen tedavilerinde hızla ilerlemeler kaydedilmekte olup, hemoglobinopatili hastalarda HKHN'ne alternatif olarak yakın gelecekte daha çok hastada uygulanacaktır. Ayrıca prenatal tanı alan hemoglobinopatili bebeklerdeki intrauterin gen tedavi uygulamalarını da yakın gelecekte tartışıyor olacağız.

Adult Stem Cells in Tissue Engineering

Ayşen Tezcaner

*Middle East Technical University Department of Engineering Sciences,
BIOMATEN Center of Excellence in Biomaterials and Tissue Engineering, Ankara*

There is no need for emphasizing the urgent medical need for tissue engineering (TE) and regenerative medicine today for those people awaiting in the donor list and for those that can't be treated with conventional methods. Main goal of TE is the construction of functional tissues and organs that closely mimic the native tissue and survive upon implantation. Such constructs mostly consist of cells, signaling molecules and scaffolds with biochemical and biophysical cues that regulate cell behavior. Advances in scaffolding technology has significantly contributed to TE by enabling scientists to mimic extracellular environment which is critical for cells. Stem cells are the integral component of tissue engineered constructs. Adult stem cells isolated from bone marrow, adipose tissue, urine, tooth are widely used in TE due to continuing ethical concerns for use of embryonic stem cells.

Adipose derived stem cells (ADSCs) are among the most widely used cell source for engineering of different tissues like bone, cardiac and smooth muscle tissues. In reconstructive surgery, soft tissue augmentation by adipose tissue is needed for soft tissue losses due to burn, trauma, tumor resection. The success of engineered tissues relies on promotion of vascularization and angiogenesis within these structures. To this end, we developed hydrogels of decellularized adipose tissue and fibroin containing human ADSCs pre-differentiated towards endothelial and adipose lineage. In vivo studies showed that patient-specific vascularized adipose tissue hold promise for clinical use.

Among tooth derived stem cells dental pulp stem cells (DPSCs) are widely used as cell source. Barrier membranes are used for guided bone and periodontal tissue engineering. Periodontal tissue engineering for successful neo-bone tissue formation and prevention of bacterial colonization needs a lot of attention. We recently developed asymmetric bilayered membranes composed of one nonporous layer of cellulose acetate and one porous fibrous layer of cellulose acetate/gelatin containing B modified BG nanoparticles with a concentration gradient. We used DPSCs as cell source. Compositional and structural asymmetry in membranes led to favorable properties like osteoinductivity and bioactivity. Cell culture studies with hDPSCs confirmed positive effects of B modified BG incorporation and asymmetric design of the membranes on stem cell attachment, migration, and osteogenic differentiation. In our group, DPSCs are used for engineering of cartilage tissue. In this study, silk fibroin and PEGDMA were used for the preparation of hydrogels as a microenvironment for chondrogenic differentiation in the presence of bFGF and TGF- β 1 releasing nanoparticles with tunable mechanical, swelling and degradation properties. Synergistic effect of bFGF and TGF- β 1 loaded NPs in hydrogels suggested the potential of injectable hydrogel system for cartilage tissue engineering.

Another stem cell source for engineering tissues is urine derived stem cells (USCs). USCs hold promise for future clinical applications. It is noninvasively isolated from voided patient urine and has high proliferative activity and multilineage differentiation capacity. In our lab USCs were isolated and characterized. Their osteogenic differentiation capacity was also shown.

Overall, adult stem cells serve as the main cell source for tissue engineering applications. However, there is still need for further studies to understand the mechanisms how these cells take role in tissue regeneration in vivo and also on scaffolds.

Maksillofasial Cerrahide Hücresel Tedavi Seçenekleri

Burçin Gönen

Çene-yüz bölgesinde kaybedilen dokuların yerine konulması amacıyla uygulanan güncel terapötik yaklaşımların ilk hedefi ağrının azaltılmasını ve mekanik fonksiyonun restorasyonudur. Sentetik materyaller orijinal dokunun fizyolojik özelliklerini yeterince taklit edememektedir. Bu nedenle güncel araştırmalar doku mühendisliği, kök hücre kültürü, gelişimsel biyoloji gibi tekniklerle doku replasmanı için yeni rejenerasyon yöntemlerine odaklanmaktadır. Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu gibi kondüktif teknikler varolan dokunun büyümesi veya rejenerasyonunu sağlamak için biyomateryallerin pasif olarak kullanımıdır. İndüktif teknikler ise, canlı hücreleri aktive etmek ve rejenerasyonu indüklemek için kemik morfogenetik proteinleri ve trombositten derive büyüme faktörü gibi faktörlerin lokal salınımı esasına dayanır. Hücre transplantasyonu ise in vitro olarak önceden elde edilmiş hücrelerin doku içine direkt uygulanması veya ulaştırılmasıdır. Hücresel tedaviler içinde, kök hücre transplantasyonu doku rejenerasyonu için etkili bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Geleneksel doku transplantasyonu yetersiz verici bölge, greft kaybı gibi faktörlerle sınırlanmaktadır. Kök hücreler bunların aksine dokuyu rejenere edebilme ve fonksiyonu yeniden kazandırabilme yeteneğine sahiptirler. Literatürde günümüze kadar gerçekleştirilen maksillofasial cerrahi raporları incelendiğinde en sıklıkla kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanım amacı ile tercih edildiğini görmekteyiz (1). Diğer hücresel tedavi seçenekleri ise kemik iliği aspiratındaki mononükleer hücrelerin uygulanmasıdır (1). Ayrıca çene-yüz bölgesi kendi stromasında özel kök hücrelerini ihtiva eder. Nazal polipler, tonsil dokusu, sinoviyal sıvı bölgenin tanımlanmış kök hücre kaynaklarıdır. Özellikle çekim sonrası bir atık olan dişlerden izole edilmiş populasyonlar: diş pulpası kök hücreleri (DPSC), sürmüş süt dişlerinden elde edilen kök hücreler (SHED), periodontal ligament kök hücreleri (PDLSC), apikal papilladan elde edilen kök hücreler (SCAP) ve dental folikül kök hücreleri (DFSC) üzerine yoğun araştırmalar mevcuttur. İlgili bölgede kondrosit, fibroblast gibi somatik hücreler, başarılı sonuçları bildirilen hücresel tedavi ürünleridir. Hücresel tedaviler, maksillofasial bölgede sinüs ögumentasyonu, alveolar yarık onarımı gibi kemik defektlerinde, pre-implant cerrahi de içeren birçok endikasyonda kullanılmaktadır. Fonksiyon ve estetiğin yeniden kazandırılması amacıyla büyük miktarlarda otojen dokunun transplantasyonu her zaman mümkün değildir ve donör bölgede morbidite riski vardır. Mezenkimal kök hücreler, gelecekte maksillofasial bölgede birçok uygulama yeri bulma potansiyeline sahiptir. Güvenilir kanıtların oluşması için daha fazla prelinik ve klinik çalışmaya ihtiyaç vardır.

1. Gonen ZB, Soylu E, Akbulut N. [Maksillofasial Cerrahide Kök Hücre Uygulamaları](#). Türkiye Klinikleri J Oral Maxillofac Surg-Special Topics 2016;2(2):36-41

Tıbbın Geleceği: Gen Tedavileri Nedir? Nasıl Çalışır?

Cihan Taştan

Acıbadem Labcell Laboratuvarı

Gen tedavisi, genetik hastalıklardan muzdarip bir kişinin genomundaki bozuk bir geni tamir etmek veya fonksiyonel özelliğini sağlamak için kişinin genetiğinin bir bölümünü değiştiren bir tekniktir. 2000'li yılların başında sağlıklı insan genom şifresinin ortaya konulmasıyla birçok hastalığın altında yatan genetik bozukluklar gün yüzüne çıkmış ve bu hasarlı DNA dizilerini tamir etmek veya işlevsel bir formuyla telafi etmek üzere gen tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi hız kazanmıştır. 'Mutasyona uğramış genlerin yerini alacak ve doğal işlevini yerine getirecek sentetik gen kopyalarının viral veya viral-olmayan transfer metotlarıyla hastanın hedef hücrelerine nakledilebilmesi' olarak tanımlanabilecek gen tedavi metodu, ilaçlara veya tıp tedavilerine kıyasla tek seferde iyileşmenin (single-shot therapy) başarılması noktasında çok önemli bir avantaja sahiptir. Gen tedavisi yaklaşımları sadece genetik bozuklukla ilişkili hastalıklar için değil; kanser ve bulaşıcı hastalıkların da önlenmesi ve tedavi edilmesi için üzerinde sıkça çalışılan bir terapötik yöntemdir. Genetik tedaviler kapsamında, lösemi gibi çeşitli kanser türlerini tanıyabilen antijen spesifik transgenik CAR-T ve CAR-NK92 hücresele ve gen tedavi denemeleri, ülkemizde Acıbadem Labcell Laboratuvarında pre-klinik hayvan modellerinde başarıyla tamamlanmıştır. Gen tedavilerinde en önemli husus, genetik materyallerde yer alan tüm bileşenlerin hedef hücrelerde işlevsel olabilmesi için DNA, mRNA veya protein biçiminde hücre içerisine ulaşması gerektiğidir. Bu sebeple, gen tedavisinde kullanılan çeşitli genetik materyalleri hücre içerisine transfer metotları geliştirilmiştir: bakteriyel plazmid DNA'sı, viral vektörler, sentetik polimerler ve fiziksel genetik materyal aktarım (elektroporasyon vs.) metotları.

Genetik hastalıklara sebep olan hasarlı DNA bölgelerinin hedeflenerek onarabilmek için gen tamir teknolojileri geliştirilmiştir: Çinko parmak nükleazları (ZFN, Zinc-finger nuclease), TALEN ve CRISPR. Bu nükleaz tabanlı teknolojiler, DNA'da çift sarmal kırılmalarını (DSB'ler) sağlayabilmektedir. CRISPR/Cas genom düzenleme teknolojisi, bu teknikler içerisinde geliştirilen en hızlı, ucuz ve kolay yöntem olarak geniş bir uygulama alanında kullanılmaktadır. CRISPR/Cas sistemi, çift sarmallı DNA kırılmalarını başarmak için hedef diziyeye özgü kılavuz RNA'lar aracılığıyla genom çapında verimli ve ölçeklenebilir tarama yapabilen bir araçtır. Oluşturulan kırılmalar, hücreyi iki farklı yolla genom tamirine zorlar: Homolog olmayan son katılım (NHEJ) ve homologe yöneltilmiş onarım (HDR). NHEJ, hedef genin işlevini kaybettirmek için genomun belirli bölgesinde kırılımlara yol açmaktadır. Diğer yandan, HDR metodu, mutasyona uğramış DNA dizisi yerine doğal fenotip işlevsel gen dizisinin değiştirilebilmesinde kullanılmaktadır. HDR ilişkili genetik tamir mekanizmasının uyarılması için hedef gen bölgesi, CRISPR ile DNA kırılımına uğratarak, yüksek oranda uyumlu donör DNA parçacığının eklenmesi ile başarılmaktadır. Bu sebeple, gen tedavilerinde HDR'ye dayalı genetik düzenleme yöntemi, genetik hastalıklardaki mutasyonları onarmak için sıklıkla kullanılmaktadır. CRISPR/Cas genom mühendisliği sistemlerinin kullanıldığı gen tedavileriyle, kansere, bağışıklık yetersizliklerine, otoimmün ve kronik inflamatuvar hastalıklara karşı büyük bir umut vaat etmektedir. Diğer bir genetik mühendislik ürünü ise, zarar görmüş dokuların onarımı için önemli olan genlerin aktarıldığı transgenik mezenkimal kök hücrelerdir (MKH). Genetik olarak değiştirilmiş MKH'lar ile kemik hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, otoimmün hastalıklar, merkezi sinir sistemi hastalıkları ve kanser dâhil olmak üzere farklı hastalıklarda istenilen proteinlerin üretildiği klinik denemeler başlatılmıştır.

Yönlü Doku Mühendisliği Yaklaşımlarında Kök Hücre Uygulamaları

Deniz Yücel

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji AD

Doku mühendisliği, hasar görmüş dokunun onarılması ve iyileştirilmesi için onun yerini alabilecek biyolojik bir doku eşleniği geliştirmeyi hedefleyen interdisipliner bir alandır. Bu yaklaşımla elde edilen yapıların temel hedefi transplantasyon olmakla beraber in vitro hastalık modelleri olarak ilaç taraması ve hastalık mekanizmalarının anlaşılması çalışmalarında da kullanıma potansiyeli bulunmaktadır. Doku mühendisliği ile tasarlanan yapılar temelde hücreler ve hücre dışı matriksi taklit eden doku iskelelerinden oluşmaktadır. Çeşitli hücre tipine farklılaşabilme özellikleri olan kök hücreler rejeneratif tıp ve doku mühendisliği yaklaşımlarında potansiyel hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır. Doku iskeleleri hedef dokunun yapı-işlev ilişkisini göz önünde bulundurularak doğal dokudaki hücre dışı matriksin mikro yapısını mümkün olduğunca taklit edecek şekilde tasarlanmaktadır. Son yıllarda kalp, sinir, tendon gibi anizotropik dokuların hasarına yönelik olarak yapılan doku mühendisliği çalışmaları, doğal doku benzeri organizasyonu sağlamak ve hücre davranışlarını kontrol edebilmek amacıyla yönlü platformlar içeren doku iskeleleri tasarlamak üzerinde yoğunlaşmıştır. Mikro ya da nano boyutta oluk veya kanal desenleri, yönlü lifsi yapılar ve organize 3B basımlı iskeleler şeklinde çeşitli yönlü doku iskeleleri üretilebilmektedir. Doku iskelelerinin topografyası integrin aracılı fokal adezyona dayalı doğrudan ve/veya dolaylı mekanik transdüksiyon yolları ile hücre davranışlarını etkileyebilmektedir. Yönlü topografiye sahip doku iskeleleri hücre tutunması, çoğalması, hücre iskeletinin organizasyonu ve yönlendirilmesi için uygun bir ortam sağlayabilmektedir. Ayrıca kullanılan kök hücre kaynağına ve yönlü yapıların boyutlarına bağlı olarak hücre farklılaşmasında da etkin oldukları görülmektedir. Kök hücre alanındaki gelişmelerin ve yönlü doku mühendisliği stratejilerinin birleştirilmesi özellikle anizotropik dokulara yönelik potansiyel bir rejeneratif tıp yaklaşımı olarak görülmektedir.

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na TÜBİTAK SBAG 113S870 ve TÜBİTAK BİDEB (BDP) destekleri için teşekkür ediyoruz. ODTÜ-BAP 0108 ve ODTÜ Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Mükemmeliyet Merkezi'ne (BIOMATEN) destekleri için teşekkür ediyoruz.

GVHH kontrolünde MKH

Didem Atay

Graft-versus-host hastalığı (GVHH) allojeneik hematopoetik kök hücre naklinin (HKHN) en önemli ve ciddi komplikasyonlarından biridir. Akut GVHH; verici T hücrelerinin alıcı dokuları üzerinde, antijen sunan hücrelerin aktivasyonu ve IL1, IL6 ve IFN-gamma gibi sitokinlerin indüklenmesi aracılığıyla gerçekleştirdiği, immünitinin aracılık ettiği bir saldırdır (34). Hastanın aldığı hazırlama rejimi, vericinin HLA uygunluğu, üründeki T lenfosit sayısı fazlalığı, hastanın immünsupresyon derecesinin ağırlığı ve aldığı immunsupresif profilaksinin yetersiz olması gibi nedenlere bağlı olarak sıklığı %20-70 arasında değişmektedir. GVHH' nın ilk tedavisi steroid olmakla beraber hastaların sadece %30-50'si bu ilk basamak tedaviden fayda görmekte, geri kalan ve ileri evre GVHH' na sahip hastalara ikinci ve üçüncü basamak tedaviler gerekmektedir (1-5).

İnsan mezenşimal kök hücreleri (MKH) yaygın immünmodülatuar özellikler sunan multipotent progenitor hücrelerdir. Direkt olarak alloantijenler tarafından tanıtılan T hücrelerin proliferasyonunu inhibe ederler. Mikst lenfosit kültürlerde lenfosit alloreaktivite baskılandıkları gösterilmiştir. İnflamatuvar durumlara göre immün baskılayıcı davranışları değişebilir. Makrofajlardan ve T hücrelerinden salınan sitokinler MKH' leri aktive edebilir ve immün supresif aktivite arttırabilir. Transforming growth faktör beta, hepatosit growth faktör, nitrik oksid, HLA-G ve indoleamine 2,3 dioksijenaz gibi soluble faktörlerin indüklenmesinin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Ya selüler temas bağımlı ya da bağımsız mekanizmalar CD4+ ve CD8+ T lenfositlerin azalmasını ve Treglerin üretimini düzenleyebilir (6-8). Ayrıca B hücre fonksiyonlarını, NK hücre proliferasyonunu ve dendritik hücre differansiasyonunu baskırlar. MKH' lerin kendini yenileme ve multipotent farklılaşma kapasiteleri vardır. Mezodermal ve kondrosit, osteosit, kardiomyosit, adiposit ve nöral hücreler gibi non-mezodermal hücrelere farklılaşabilirler. MKH' ler fibroblastlar, plasenta, amniyon sıvısı, adipoz doku, sinovial membran, dental pulpa ve göbek kordonundan izole edilebilirler. Uluslararası hücresele tedavi topluluğunun mezenkimal ve doku kök hücre komitesi MKH tanımı için 3 kriter tanımlamıştır: 1- plastiğe yapışma; 2- hücrelerin osteoblast, kondroblast ve adipositlere farklılaşma yeteneğinin olması; 3- CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a veya CD19 negatif ekspresyonu ve CD105, CD73, CD90 pozitif ekspresyonu (10).

MKH'lerin evre IV refrakter akut GVHH'da kullanımı ile ilgili ilk yayın 2004 yılında Le Blanc ve ark tarafından yayınlanmıştır (11). Daha sonra bu konuda erişkinlerde ve çocuklarda yapılan çok merkezli çalışmalarla da steroid dirençli akut GVHH' da MKH' lerin etkinliği gösterilmiştir. Akut GVHH tedavisinde MKH etkinliği çalışmalarda %15 ile 75 arasında değişmektedir (12-14). MKH infüzyonu akut toksisitesi olmayan etkin bir tedavi seçeneğidir. Enfeksiyonlara yatkınlığı arttırıp arttırmadığı, graft versus lösemi etkisini azaltıp azaltmadığı tartışmalıdır. MKH infüzyonu dozu, tedavi şeması, ne zaman hangi hastaya seçilmesi gerekliliği ve uzun dönem etkinliği ve yan etkileri çok merkezli prospektif randomize çalışmalarla araştırılmalıdır.

Zygote Induced Progenitor Cell

Elif Ganime Aydeniz

Aim: New technique in cloning and production induced pluripotent stem cell

Method: Zygote ordered from Janvier Labs, France for standardization the experiment. After zygote enucleation (17-18 hours after microinjection), mesenchymal stem cell were placed intrastoplasmic area. Then embryonic motion was observed in the cytoplasm at first day and histological and genetic analyzes were performed in the new stoplasmic cells. New intrastoplazmic cells showed that there was an embryonic character verified with genetic testing. Embryo culture medium was changed day by day and clone were stored in incubators with 37 degrees, 5% CO₂, 5% O₂ and 97% nitrogen. Zygote induced stem cell development may vary from 5 to 12 days. The incubation time of embryo culture should not exceed 15 days because of tissue exvivo life.

Results: In our study we observed mesenchymal cell activity after intrastoplasmic injection at second day and embryo grew up 5 or 12 days. Approximately after 7 days we made histopathologic Wright staining and saw cell nucleus easily in light microscope. On the other hand we did genetic test from cells and used embryonic genetic markers such as c-myc, nanog, klf, sox-2.

Conclusion: After mesenchymal embryonic activity it looked like morula stage and these cells obtained as such are induced pluripotent stem cells. In addition never need any gen transfer for proliferation. By using mesenchymal stem cell to produce induced pluripotent stem cells will shed light on person's own organ production.

Document:

Zygote means exactly what is called fertilized oocyte. A fertilized oocyte is transformed blastocyte in five days and it is ready for implantation. Embryo is the youngest organism of human and it also contains three germ sheets. In other words, the organism which is totipotent when it is zygote, becomes pluripotent by ICM (inner cell mass) when it is blastocyst. In clone models, we know that this clone is not a real copy because we put somatic cell into the enuclee oocyte perivitellin space and mitochondrial DNA is still in oocyte.

In 2006 Yamanaka et al showed that under embryonic stem cell culture 4 factor c-myc, oct3/4, klf, sox-2 (OSKM) were induce to induced pluripotent stem cells from mouse embryonic stem cell or mouse adult fibroblast. Nanog is also an indispensable factor in this process. Images and growth characteristics of these cells are similar to embryonic stem cells and express the same marker genes expressed by them. Yamanaka et al have been able to produce the pluripotent stem cells, from mouse embryonic stem cell and mouse adult fibroblast cultures. However, they tested pluripotency by injection induced pluripotent cells into the rat's back and creating teratoma. But it is an expensive method and needs genetic factors. Therefore, in cultures, clon embryo's ICM cells need proliferation gen factor for survive but these gen factors are very expensive and don't have the same effect on each cell colony. Our main goal is using zygote intrinsic energy after enucleation and producing IPS cells with using mesenchymal stem cell without any gen factor. Total cell transfer is done into the ooplasm and it is fast and efficient. No need electrical and chemical stimulation. Future targets should be the separate these cells into 3 germ leaves in embryo cell cultures and prove teratoma forming effect. The last step must be the delivery of the clone embryo.

Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücreleri Friedreich Ataksisi Hastalarında

Erdal Karaöz

İstinye Üniversitesi,

Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi, İstanbul

Friedreich Ataksisi (FRDA) mitokondriyal protein frataksinin eksikliğinden kaynaklanan resesif kalıtmı bir hastalıktır. Günümüzde hala FRDA için onaylanmış bir farmakolojik tedavi mevcut değildir. Hücre bazlı tedavi stratejileri, oksidatif stresin azaltılmasında, hücresel frataksinin artırılmasında, mitokondriyal fonksiyonun iyileştirilmesinde ve frataksin kontrollü metabolik yolların modüle edilmesinde büyük umut vaat etmektedir. Bu sunuda merkezimizde Sağlık Bakanlığı tarafından onaylanmış allojenik GK-MKH tedavisinin etkilerini araştırmak ve tedavi edilemeyen bu hastalıkta tedavi şekli olarak uygunluğunu ve güvenliğini tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen klinik çalışmanın sonuçları paylaşılacaktır. Sonuç olarak, bu çalışma, hücre transplantasyonunun yaşam kalitesini iyileştirebileceğini ve FRDA tedavisi için GK-MKH naklinin bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

Organ Transplantasyonunda Mezenkimal Kök Hücrelerin Bağışık Baskılayıcı Rollerini

Erdal Karaöz

İstinye Üniversitesi,

Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi, İstanbul

Mezenkimal kök hücreler (MKH), birçok doku ve organlarda bulunan ve buldukları doku rejenerasyonundan sorumlu hücrelerdir. Adiposit, osteoblast ve kondrositler gibi mezodermal kökenli hücrelere dönüşebilme yeteneklerinin yanında, MKH'ler immün düzenleyici özellikleriyle de dikkat çekmektedirler. MKH'ler aracılığıyla immün düzenleme genel olarak bu hücrelerin immün sistem hücreleriyle olan etkileşimi ile yürütülür. MKH'ler ile yapılan immün baskılama, hücresel etkileşimlere ek olarak çözünebilir moleküller ve sitokinlerin salgılanması ile düzenlenir. Son yıllarda MKH'lerin immün düzenleyici potansiyelleri çok sayıda hayvan modeli ve klinik denemeler ile araştırılmaktadır. Bu sunumda MKH aracılı immün baskılama ve MKH'lerin organ transplantasyonunda immün yanıt düzenleyicisi olarak kullanılma potansiyeli ile ilgili mevcut gelişmeler tartışılacaktır.

Aktive Edilmiş Mezenkimal Kök Hücre, Immün Modülasyon Tedavilerinin Tendon ve Ligaman Hasarının Rejeneratif Tedavisinde Etkinliği

Erdem Aktaş

Tendon ve ligamanlar kas iskelet sistemine entegre olan, eklem hareketi ve stabilitesi için hayati önemi olan hiposelüler, %90 oranında tip I kollajen, fibroblast, elastin, proteoglikan ve su ihtiva eden konnektif dokulardır. Spor yaralanmalarını %50 gibi yüksek bir oranda tendon–ligaman ve kırıkarak yaralanmaları oluşturmaktadır. Bu dokuların hipovasküler ve predominant olarak anaerobik enerji sistemini kullanmaları nedeniyle yaralanma sonrası tamir kapasiteleri çok sınırlı olup günümüzde uygulanmakta olan farklı tedavi modalitelerine rağmen sonuçlar tartışmalıdır. Akut tendon hasarını takiben birbiri ile kesişen ve 10 haftaya uzayan 5 tamir fazı izole edilmesine rağmen; makrofaj, T-lenfosit ve proinflatuar sitokin seviyelerinin en yüksek olduğu ilk 7 gün, iyileşme dokusunun kalitesini belirleyen kritik bir dönemdir. Bu dönemdeki akut enflamatuar ve immün cevabın aşırı ve kontrolsüz olarak gerçekleşmesi, tamir dokusunun biyomekanik ve histopatolojik (hücre tipi, dizilimi, ekstraselüler matriks içeriği) özelliklerinin orijinal dokudan uzak, çoğunlukla kalınlaşmış, fibrotik, tensil streslere dayanıksız bir doku ile sonuçlanmasına neden olmaktadır. Bu nedenlerle, günümüzde morbiditesi yüksek ileri seviyede tendon ve ligaman yaralanmalarının tedavisinde rejeneratif ve hücresel tedavi yöntemleri ön plana çıkmaktadır.

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) göç ettikleri hasarlı dokuda enflamasyon ve immün sistemi modifiye edebilme özellikleri sayesinde, yaralanma bölgesinde anabolik ve dengeli bir mikroçevre oluşturabilirler. Doğrudan hücre-hücre teması ve salgıdıkları antiinflatuar sitokinler ve büyüme faktörleri ile vaskülarizasyonu, hücre proliferasyonu ve differansiyasyonunu yönlendirerek iyileşmenin önemli bir safhası olan inflammatuar fazı modüle edebilirler. MKH'lerin bu immünmodulatuar özelliklerini eksprese edebilmeleri için kritik basamak; hasarlı dokuda bulunan immün hücreler (lenfosit, makrofaj) ve/veya bu hücreler tarafından salgılanan TNF- α , IFN- γ , IL-1b, IL-1 α gibi proinflatuar sitokinler ile etkileşime girmeleridir. Bu etkileşim sonucu aktive olan MKH'ler: a) salgılanan proinflatmatuar sitokinlerin baskılanması b) antiinflatmatuar sitokinlerin salgılanması c) makrofaj ve T-lenfosit polarizasyonu, çoğalması ve aktivasyonunu regüle ederler. Tendon ve ligaman yaralanmalarının tedavisinde, MKH'lerin hasarlı dokuya doğrudan veya bir skafolda ekilerek nakledilmelerinin doku iyileşmesi üzerinde olumlu etkisi bilinmekle beraber, invitro ortamda proinflatmatuar sitokinler (TNF- α , IFN- γ , IL-1b, IL-1 α , IL-6, polycytidylic acid) ile inkübe edilerek MKH'lerin aktive edilmesi ve immünomodulatuar özelliklerinin geliştirildikten sonra hasarlı dokuya nakledilmeleri yeni ve etkili bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Aktive edilen MKH'ler, makrofaj polarizasyonunu enflamatuar M1'den antiinflatmatuar özelliği olan M2 makrofaj yönünde değiştirerek, antiinflatmatuar IL-10 ve IL-4 düzeylerinde artış, proinflatmatuar IL-1b ve IL-12 düzeylerinde azalma, T helper 2 ve Regulatuar T hücre de artış, T helper 1 lenfositlerde azalma ve aktive olmuş sitotoksik T hücrelerin baskılanması üzerinden immün sistemi modüle ederek etki gösterirler. Yapılan invivo ve invitro çalışmalar tendon ve ligaman hasarı olan bölgeye aktive edilmiş MKH implantasyonunun, tamir dokusunda tip I kollajen konsantrasyonunu ve failure stress'i artırdığını göstermiştir. Tendon ve ligaman hasarında, invitro olarak aktive edilmiş ve immünomodulatuar özellikleri geliştirilen MKH ile yapılan hücresel tedavi, tamir sürecini biyomekanik ve histopatolojik olarak rejeneratif iyileşme yönünde etkilemektedir.

Bioengineering Applications and Stem Cell

Erkan Türker Baran

University of Health Sciences,

Institute of Health Sciences, Department of Tissue Engineering, Üsküdar, İstanbul

As a Bioengineering application, Tissue Engineering is an interdisciplinary area which is based on fundamental, medicinal and engineering sciences. The first clinical application of primary cell and stem cells with biomaterials was achieved by the application of tissue engineered gall bladder, which was successfully implanted to young patients in 2006. Afterwards, with the successful implantation of tissue engineered trachea, tissue engineering showed its true potential in artificial organ construction.

Especially, micro-and nanofabrication techniques have become a significant strategy in guiding cells into target tissues. Micro and nanofabrication methods enable cells to differentiate into target tissue guided by micro and nano topographies or biochemical cues introduced into biomaterials. Especially, soft lithography has been an efficient micro and nano technique as micro/ nano topographies and cell adhesion factors would be formed on biomaterials surface effectively. Recently, 3-dimensional bioprinting technologies has been a significant progress in tissue engineering as the technology enables the production of scaffolds with cells according to the tomography data of patients. This technology provided significant advantages respect to production of scaffolds with complex features, size-controlled open pore structures and perfusable micro-channels. At the same time, 3D bioprinting technique carries unsolved disadvantages as the process is limited to a short range of biomaterials, poor cell adhesion to printable materials and low cell loading capacity, and the limitation of the technique to X-Y plane. As the technique is still in maturation phase and suited to few types of biomaterial, 3D printing technology is expected to be a critical bioengineering technique in scaffold based-cell therapies.

Organoid Tıbbı

Esra Erdal

İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, İzmir, Türkiye

Organoid'ler, pluripotent ve/veya erişkin kök hücrelerin uygun mikroçevre koşullarında oluşturdukları 3 boyutlu (3B) organimsi yapılar olarak tanımlanabilir. Sağlıklı ya da kanserli dokulardan elde edilen organoidlerin uzun süreli kültürlerde dahi, kaynak aldıkları dokuların genetik ve fenotipik özelliklerini aynı şekilde korumaları, bu yapıların tıpta özellikle hastalık modellemeleri ve kişiye özel ilaç taramalarında kullanımlarını sağlamıştır. Son 10 yılın tıp alanında çığır açan teknolojilerinden kabul edilen bu teknolojinin, ileride organ transplantasyonuna alternatif olabileceği ve Crispr/Cas9 sistemi ile kombine şekilde gen tedavi yaklaşımlarında önemli rol alacağı düşünülmektedir. Grubumuzca yapılan çalışmalarda sağlıklı gönüllülerden elde edilen fibroblastların epizomal yeniden programlanması ile oluşturulan indüklenbilir pluripotent kök hücreler, uygun kültür koşullarında önce endoderme sonrasında 3B hepatik organoidlere dönüştürülmüştür. Histolojik olarak karaciğer epiteline özel yapılar gösteren organoidlerin, in vitro koşullarda Albumin sekresyonu, LDL- alımı, CYP450 aktivitesi, glikojen depolama ve yağ birikimi gibi karaciğere özel işlevsellik göstermelerinin yanısıra, in vivo koşullarda NGS fare karaciğerine tutunabildikleri tespit edilmiştir. Daha sonra eHEPO adını verdiğimiz endoderm kaynaklı hepatik organoidler, bir nadir hastalık olan üre döngüsü bozukluğu Sitrulinemi'nin modellenmesinde kullanılmıştır. Buna göre, 3 Sitrulinemi hastasından elde edilen eHEPO'lar, hastalığın fenotipini aynen taklit eder şekilde ortamdaki amonyağı elimine edememişlerdir. Bu model, ileride kişiye özel yüksek verimlilikte ilaç kütüphanelerin taranmasınınun yolunu açmıştır.

Sonuç olarak, organoid temelli teknolojilerin tıpta kullanımları, hastalıkları anlama, tanıma ve tedavi etme yolunda önemli ve hızlı yol katetmemizi sağlayacaktır.

Temporal Modulation Of Calcium Sensing In BM HSCS is Crucial for Proper HSC Expansion

Fatih Kocabaş

Yeditepe University, Faculty of Engineering

Regenerative Biology Research Laboratory, Department of Genetics and Bioengineering

Hematopoietic stem cells (HSCs) are known to reside in an endosteal niche, which is associated with relatively higher calcium content. HSCs sense and respond to calcium changes. Ca^{2+} acts as a second messenger to localize and maintain HSCs in their respective microenvironment. However, how calcium-sensing components modulate HSC self-renewal and ex vivo expansion is largely unknown. In this study, we have investigated the effect of small molecules targeting calcium sensing and related pathways in HSCs. We have utilized non-specific inhibitors of SOCE (store operated calcium entry) namely SKF and 2-APB. We investigated temporal modulation of calcium sensing and Ca^{2+} homeostasis during ex vivo HSC expansion. We have analyzed their effect in STIM1, TRPC channels, and voltage-gated Ca^{2+} channels. Murine bone marrow HSCs, human bone marrow and umbilical cord blood (UCB) mononuclear cells (MNCs) were isolated and treated with SKF, 2-APB, and DMSO as a control. We have also used an unrelated small molecule TEA (inhibitor of K^+ channel) for comparison. After 7 days of ex vivo culture, HSC content was analyzed by flow cytometry. Inhibition of SOCE by SKF induced ex vivo mouse and human BM HSC expansion but not UCB HSC expansion. SOCE inhibitors broadly but differentially alter niche related gene expression profile in vitro and in vivo. Intriguingly, SKF and 2-APB treatments also boosted the mouse BM mesenchymal cells (MSCs) proliferation, while they did not affect the human adipose derived MSCs proliferation kinetics or endothelial cell proliferation. Modulation of SOCE by SKF in the mouse bone marrow induced HSC content in vivo. Furthermore, SKF induced HSCs successfully differentiated into blood lineages in recipient animals with higher repopulation capabilities. These findings suggest that temporal modulation of calcium sensing pathways by treatment of SKF could be utilized to expand and maintain murine HSCs, human HSCs and mouse BM-MSCs ex vivo.

Designing a 3D Bioprinted Blood Vessel with Stem Cells

Hakan Darıcı

Istinye University, Stem Cell and Tissue Engineering AUM

3D printers have revolutionized the manufacturing technology since the invention to the present. As their technology become open access during the last decade, printing of simple plastic models or prototypes advanced to printing of cars, bridges, buildings to complex jet engines. Meanwhile 3D printers found medical use as patient-specific prosthesis or metal implants. Now it is possible to print simple tissues with 3D bioprinters, which are 3D printers modified to print live cells. Small, simpler versions of cartilage, bone and skin tissues as well as skin substitutes is now possible to print using differentiated cells or undifferentiated stem cells. We were able to print and form artificial cartilage tissue in our laboratories. Printing material of bioprinters, which is called bioink becomes more important with the use of live cells. Bioinks should stay in gel state during printing and form solid 3D structures upon printing meanwhile protecting cell viability.

One giant obstacle to print bigger tissues is the lack of a circulatory system, consisting of changing types of blood vessels. Scientists experimenting different approaches to print both micro and macro sized blood vessels. On the other hand, patients are already in need of macro sized blood vessels as replacements of their damaged or obstructed blood vessels.

One of the underestimated issues of 3D printing is considering solid mechanical properties of 3D constructs a priority were while biological resemblance ignored. We developed an approach to print macro sized blood vessels, using natural histological structure as model; including three layers of human blood vessels; tunica intima, t. media and t. adventitia, considering characteristics of each layer separately. Natural blood vessels contain endothelial cells at the innermost surface, followed by a thin layer of connective tissue which includes fibroblasts. T. media layer consist of smooth muscle cells while the outer, t. adventitia layer consist of fibroblasts again. Small amounts of stem cells present in all these layers. We aimed to mimic nature's design, meanwhile using the plasticity of stem cells to support missing components of original blood vessels.

We are using Axolotl Bioprint 3D bioprinter to print our self 3D modelled tissue constructs. For vascular structures, Human vascular endothelial cells (HUVECs), Mesenchymal stem cells, (MSCs) and fibroblasts were appropriate as live cell sources. Soft tissue bioinks by HD Bioink were used as support material for printing. Bioinks prepared form sterile powders by mixing with supplemented culture media. Various amounts of MSCs and fibroblasts added to bioinks for each layer of constructs of the blood vessels. HUVECs were added only the t. intima part. Bioprinting were performed under 521 psi pressure and usually completed within 15 minutes. Bioprinted vessels were crosslinked and taken into 6 well culture plates, filled with culture media to totally cover the construct. Blood vessels were cultured for various periods and thin cross sections were taken to observe cell distribution under fluorescent microscope with specific stains to demonstrate cell types.

Our observations showed that the cells can sense the environmental factors as well as the niche made by the neighboring cells, therefore, act accordingly to form desired structures, only if these factors were pre-organized and compatible to the cells own programming. We suggest researchers to use and mimic human or animal models in microscopic level to create more natural 3D bioprinted materials for future tissue engineering and regenerative medicine applications.

Kronik Hepatit ve Sirozda Hücresel Değişiklikler

Murat Kantarcıoğlu

Karaciğerin rejenerasyon yeteneği kendi dokusunda yer alan progenitor/kök hücrelerce sağlanmaktadır. Deneysel çalışmalar tek bir tip yerine birçok tipe farklılaşabilen, yani fleksibl bir rejeneratif sistemi oluşturan kök hücrelerin varlığını göstermiştir. İnsanda allojenik terapötik kemik iliği transplantasyonu yapılmış hastaların karaciğer biyopsilerinde farklı cinsiyet kromozomu taşıyan hepatositler gösterildikten sonra karaciğer sirozunda kemik iliğinde yer alan kök hücrelerden yararlanmaya yönelik ilk insan çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bir çok çalışmayla MKH'lerin immünosupresif ve aynı zamanda immünmodülatuar etkilerinin olduğu anlaşılmıştır. İnsanlarda kemik iliği ile nakledilen kök hücreler kemoterapi nedeniyle hasarlanan intestinal kanal mukozasında onarıcı bir işlev gerçekleştirebildikleri ve mikromimarinin yeniden oluşturulmasında önemli bir rol oynayabildikleri gösterilmiştir. Crohn hastalarında, allojenik uygulamadan çok, otolog uygulamanın daha etkin ve güvenli olduğu görülmüş olup primer endikasyonla otolog uygulama araştırmaları halen devam etmektedir.

Son zamanlarda, tedaviye dirençli Crohn Hst olgularında, MKH nakliyle ilgili araştırmalar ön plana geçmiştir. İn vivo ve invitro deneysel çalışmalarda, MKH'nin hasarlı dokuların rejenerasyonunu sağlaması yanında, ciddi anlamda immün modülatuar etkilerinin olduğu anlaşılmıştır: sitotoksik T hücre proliferasyonu ve IFN- γ üretimini inhibe ederken, supressor T hücre yapımını tetiklediği ve IL-10 sekresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, infliximab'a dirençli fistülü olan Crohn olgularında lokal MKH uygulamasının da anlamlı oranda iyileşmeye yol açtığı gösterilmiştir. Oldukça güncel ve fistülizan crohn hastalığında lokal MKH uygulamasının ön planda olduğu bir çalışmada elde edilen bulgular, implante edilen MKHlerin sistemik dolaşıma ve lenfatik system içine karışabileceklerini, lenf nodlarında germinal merkezlere ulaşabileceklerini ve bu yolla T hücre farklılaşmasını tolerojenik yolla etkileyerek mukozal iyileşmeye yol açabileceğini düşündürmektedir.

Gastroenterolojide umut vaat eden bir diğer potansiyel uygulama alanı da kas hücrelerine diferansiye olma potansiyeli yüksek progenitor hücrelerin, gastrointestinal kanal sfinkterlerine impante edilme uygulamalarıdır. Yapılan hayvan çalışmaları bu yöntemin özefagus alt sfinkteri üzerine uygulanması ile insanlarda gastro-özofajial reflü hastalığı için umut vaat eden yeni ve doğal bir tedavi modalitesi oluşturulabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde zaman zaman klinisyenlerin çaresiz kalabildiği bir diğer durum olan anal inkontinans durumları da kök hücre tedavileri için aday hastalıklardır.

Olagelen bütün gelişmelere rağmen halen rejeneratif klinik uygulama seçenekleri rutin uygulamalardan uzak görünmektedir. Klinik anlamda kök hücrelerden, daha çok salgıladıkları bileşenlerin etkileri aracılığıyla yararlanılmaktadır. Yakın dönem bu moleküllerin keşifleri ve bu biyo-aktif kök hücre kökenli yeni ilaçların kullanıma girmelerine gebecektir.

Exosomes - From isolation to application

P. Neslihan Taşlı

*Yeditepe University, Faculty of Engineering and Architecture,
Department of Genetics and Bioengineering*

Exosomes are lipid bilayer nanovesicular messengers secreted by virtually all cell types, adapting to and conveying the physiological conditions of the cell. Exosomes carry out essential roles in cellular communications and transfer of biological material -such as proteins, RNA and DNA- from one cell to another. They carry membrane proteins characteristic to their cell-of-origin which are capable of eliciting responses to cells they interact with -such as antigen presenting exosomes from dendritic cells-, meaning that exosomes are capable of acting as mini-cells. Their diverse range of biological functions and the rich biomolecular content has attracted considerable interest over the last decade, and researchers from many different fields of biology are now contributing to our understanding of exosomes.

Exosomes prove useful in a wide range of applications. They are capable drug carriers, able to pass through the blood brain barrier and last for longer periods of time than most other conventional drug vehicles, and circulating exosomes are being investigated for diagnostic purposes against many diseases including cancer. Furthermore, as our understanding with exosomes grow, so does our understanding of their importance for the physiology of our cells and pathophysiology of diseases.

Unfortunately, the influx of new papers must be scrutinized closely - the mutable nature of extracellular vesicle (EV) content and the difficulty in purifying exosomes (especially true with specific populations of EVs, such as exosomes or smallEVs) means that great care must be taken while preparing samples for exosome studies. Experimental results of exosome studies may be easily skewed due to small details in experimental procedure affecting exosomes content, while using isolation methods unsuitable for a given study may result in co-isolation of biologically active soluble factors, reduced integrity of exosomes, and insufficient exosome concentrations. Furthermore, many of the biological mechanisms behind EV secretion, uptake, and determination of EV cargo are still unknown.

Most commonly used exosomes isolation methods are currently incapable of producing exosomes with the quantity and quality necessary for exosomes research. Recent years has seen the development of modern exosomes isolation methods that address both issues of traditional EV isolation - however, these methods are yet to see widespread use in the exosomes field. Efficient isolation of exosomes remains to be a great obstacle for both exosome research and their potential applications. Discoveries in exosome and EV research will surely continue, and lead to more discoveries in both their roles in biology and clinical applications as we learn more about these tiny, but essential elements of life.

KORDON VE KORDON KANI BANKACILIĞI

Nil Banu Pelit

Kordon/Kordon Kanı Bankacılığı (KKKB) konusunda gerek hasta gerekse sağlık çalışanı olarak bir inceleme yaptığımızda karşımıza birbirinden iki kutup kadar uzak görüşler çıkıyor (“çok yararlı, sakın ziyan etmeyin” ile “kandırılmayın, hastanın kendine bile yaramıyor”). Yararlı olduğunu iddia edenler bu işin ticaretini yapan şirketlerin başındakilerken, kandırılıyorsunuz diyenler bilimsel derneklerin temsilcileri. Bu durumda hekimlerin çoğunun inanmadığı, ebeveynin “ya işe yararsa” inancıyla para ödedikleri bir üründen bahsetmek durumunda kalınıyor. Biliyoruz ki kordon, intrauterin dönemde anne ile bebek arasındaki alışverişi sağlayan, iki arter bir venden oluşan çok önemli bir bağ. Kordon kanı ise bu bağın veninden doğumdan hemen sonra alınan kan. Pluripotent kök hücre zenginliği sebebiyle kordon ve/veya kordon kanının saklanması öneriliyor. İki tip kök hücre kaynağı var: hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler. Hematopoetik kök hücreler kordon kanında yoğunken, mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu kordondan daha kolay. Bu genel bilgileri hatırladıktan sonra görüşler üzerinden giderek konuyu tartışacağım.

“Kordon kanı, her derde deva bir hayat sigortası değil!”: Kök hücre tedavilerinde standart ve deneme tedavileri uygulanmaktadır. Kordon kanı hematopoetik kök hücreleri, 1988 yılından beri standart tedavilerde yerini almıştır. Lösemi, lenfoma, hemoglobinopatiler, aplastik anemi, immün yetmezlik sendromları, myelodisplaziler, kemik iliği yetmezlikleri gibi 80’in üzerinde hastalığın standart tedavisinde kordon kanı hematopoetik kök hücreleri kullanılmaktadır. Diğer taraftan serebral palsi, neonatal, hipoksik iskemik ensefalopati, bronkoalveolar displazi, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, diyabet, otizm, sistemik lupus eritematosus gibi pek çok hastalığın tedavisinde kordon ve kordon kanı ile denemeler devam etmektedir. New York Blood Center, 1996 yılından beri FDA izni ile kordon kanını IND (investigational new drug) kapsamında toplamaktadır. Sonuç: Özellikle tedavisi olmayan dejeneratif hastalıklarda ümit vadeden deneme tedavileri sürmesine rağmen standart tedavi seçenekleri sınırlıdır.

“Kordon kanının bebeğin kendisine bile faydası yok!”: Dünya genelinde yaklaşık 900.000 ürünün devlet KKB’nda, 5 000 000 ürünün ise özel sektör KKB’nda saklandığı belirtilmektedir. Özel bankalarda saklanan ürün miktarı 6 kat fazla iken kullanım, devlet bankalarında 30 kat fazladır. Bugüne kadar 35 000 kadar ürünün kullanıldığı bildirilmiştir. Bunun temel nedeni, ürünlerin özel bankalarda otolog, devlet bankalarında allojenik kullanım için saklanmasıdır. Çünkü kordon kanının otolog kullanma ihtimali, en iyimser tahminle 1:20 000’dir. (1) Genç ve yüksek potansiyeli olan bir ürün olmasına rağmen hematolojik malignitelerde kullanımı sınırlıdır. Aplastik anemiler, standart tedaviler arasında önemli yer almaktadır. Ancak hematopoetik kök hücre transplantasyonlarında genellikle allojeneik ürünler tercih edilmektedir. Diğer taraftan kordon kanı içerisindeki kök hücre miktarı transplantasyonlarda yetersiz kalmaktadır; tek yerine double doz kordon kanı kullanımı üzerinde çalışılmış; transplantasyondaki yetersizlik riskini double dozun ortadan kaldırmadığını, ek olarak alloreaktivitenin daha fazla görülme riskinin de olduğunu ortaya çıkarmıştır. (2) Sonuç: Hematopoetik nakil amacıyla saklanacak kordon kanının otolog değil allojenik kullanım amaçlı büyük bankalarda saklanması uygundur.

“Kordon kanının başarısı ispatlandı!” : New York Blood Center, 2011 yılında, intravenöz kullanım için enjekteable solüsyon halinde, HEMACORD adı ile kordon kanını, allojenik kullanım için ticari preparat halinde piyasaya sürmüştür. Ürün, 5x10⁸ total çekirdekli hücre ve 1,25x10⁶ CD34 pozitif hücre içermektedir. (3) Diğer yandan Pubmed’te kordon/kordon kanı olarak klinik çalışmalar tarandığında 1:4’ü son 5 yılda olmak üzere 5000 üzerinde makalenin yayınlanmış olduğunun görülmesi, kordon/kordon kanının iyi bir mezenkimal kök hücre kaynağı olmasındandır. Sonuç: Bugüne kadar hematopoetik kök hücreler üzerinden negatif yorumlar yapılmış; mezenkimal kök hücreler göz ardı edilmiştir. Oysa rejeneratif tıpta, dejeneratif ve otoimmün hastalıklarda yapılan çalışmaların sonuçları dikkat çekicidir.

“Kordon kanını saklatın, ileride hayat kurtarır!”: Oldukça iddialı bir slogan olmasına rağmen ilgili sektördeki hareketlilik: dejeneratif eklem hastalıkları, akciğer hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılan, onaylı allojenik kök hücre ilaçlarının satışa sunulmasıyla artmıştır. Kaynak, kordon/kordon kanı mezenkimal kök hücreleridir. Kozmetik sanayiinde kordon/kordon kanı, kök hücreleri ve büyüme faktörleriyle (GF: growth factor) beraber kullanılmaktadır. (5)

Sonuç: Gelecekte kendisine, bugün dejeneratif hastalıkları başlamış yakınlarına, doku grubu uyumlu pluripotent kök hücrelerden üretilmiş kırıkdamak, kemik, kas, sinir hücrelerinin kullanımı artık gündemdedir.

“Ülkemizde kordon kanı bankacılığı hangi aşamada?”: Temmuz 2005’de Resmi Gazete’de yayınlanan kordon kanı bankacılığı yönetmeliği ile bu alanda çalışacak kurum/kuruluşların faaliyetlerinin yasal durumu tanımlanmıştır. Yönetmelik, bir kordon kanı bankasının hangi özelliklere sahip olması gerektiğini, personelini, donanımını, kalite kontrol testlerini, son ürün özelliklerini belirlemiştir.

Ülkemizde ruhsatlı 7 özel, 2 devlet kordon kanı bankası bulunmaktadır. (6) Acıbadem Labcell Kordon Kanı Bankası’nda 10 000 kadar ürün saklanmakta olup çoğunluğu otologdur. Bugüne kadar 11 ürün (çoğu yönlendirilmiş) transplant amaçlı kullanılmış, allojenik ürünlerden GVHD tedavisi için 200 kadar, DMD ve hipoksik beyin sendromunda deneme tedavisi için 500’ün üzerinde uygulama yapılmıştır.

Sonuç: Kök hücrelerin kendisi ve/veya ortama saldığı faktörler, gelecekte rejenerasyon ve transplantasyonda daha fazla sayıda hastalığın tedavisi için etkin kullanım alanı bulacaktır. Atık bir ürün olan kordon/kordon kanının gerek devlet gerekse özel sektör desteğiyle saklanması teşvik edilmelidir.

Otoimmün Ürtiker ve MKH Tedavisi

Rabia Bilge Özgül Özdemir

Kronik idiyopatik ürtiker, 6 haftadan uzun süren kaşıntı ve şişlik ile karakterizedir. Etyopatogenezi tam olarak açıklanamamıştır ve tedaviye dirençli vakalarda çoğunlukla diğer otoimmün hastalıklar eşlik etmektedir. Ne yazık ki, dirençli hasta grubu mevcut tedavi yöntemlerinden faydalanmamaktadır ve tedavi için alternatif yaklaşımlar denenmektedir. Mezenkimal kök hücreler steroidlere dirençli “graft versus host disease” başta olmak üzere birçok otoimmün hastalığın tedavisinde kullanılan hücrelerdir. Otoimmün altyapısı olan ve mevcut tedavilere dirençli kronik ürtiker hastalarının tedavisinde mezenkimal kök hücre uygulaması alternatif bir yaklaşım olabilir. Bu sunumda kronik ürtiker hastalığı tanımlanacak ve ürtiker tedavisinde mezenkimal kök hücre uygulaması yaptığımız hastalarımıza ait sonuçlarımız aktarılacaktır.

Serdar Kabataş

SBÜ GOP-Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği

Hipoksik iskemik ensefalopati (HİE), beyine yeterli kan ve oksijen gönderilememesi sonucu ortaya çıkan santral sinir sistemi hasarı ve buna bağlı gelişen klinik tablodur. HİE'nin güncel tedavisinde birçok tedavi yöntemi (örn., teröpatik hipotermi, vs.) kullanılmakla beraber son yıllarda kök hücrelerin kullanımıyla ilgili deneysel ve klinik çalışmalar halen devam etmektedir (örn., mezenkimal kök hücreler (MKH), vs.). Bizde bir hastada Wharton's Jelly kaynaklı MKH uyguladığımız ve başarılı sonuç aldığımız pilot çalışmadan sonra T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Kan, Organ, Doku Nakli Hizmetleri Dairesi Başkanlığı Bilimsel Etik Kurulu onaylı hastalarımıza WJ-MKH'ler uyguladık. Uzun dönem ve devam eden klinik sonuçlarımızı güncel literatür eşliğinde tartışmak istedik. HİE patofizyolojisinin karmaşıklığını ve tedavisini kök hücre nakli, gen tedavisi gibi çok çeşitli tedavi yöntemlerle elde edilebilecek bilimsel verilerle aydınlatılabileceği düşüncesindeyiz.

MKH Retinitis Pigmentosa İçin Tedavi Seçeneği midir?

Tuğrul Altan

İstinye Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları AD.

Retinitis pigmentosa (RP) yaklaşık 5000 kişide 1 görülen kalıtsal, ilerleyici, basil ağırlıklı fotoreseptör distrofidir. Yüzden fazla genetik formu identifiye edilmiştir.

Birlikte retina pigment epiteli dejeneransı ve inflamasyon görülür. Üçüncü-beşinci dekatta körlükle sonuçlanır. RP'de fonksiyonel iyileşme sağlayabilmek amacıyla kök hücre çalışmaları yürütülmektedir. Başlangıçta kök hücrelerin veya iPSC'nin hedef doku bölgesindeki dejenere retina pigment epiteli ve fotoreseptör hücrelerinin yerine geçerek normal retinal fonksiyonu sağlaması hedeflenmekteydi. Fakat hayvan deneylerinde bunun ancak yenidoğan farelerde ve embriyonik kök hücre kullanımıyla sınırlı olduğu görüldü. Bu nedenle bugün mezenkimal kök hücrelerin parakrin, immünmodülatör özellikleri üzerinde durulmaktadır. Mezenkimal kök hücreler (MKH) dokuya stromal destek sağlayarak ilgili bölgede yeni hücrelerin gelişimine ve fonksiyonuna, çözünebilir faktörler salgılayarak katkı sağlarlar. MKH'ler hasralı alana göç edebilir ve oraya yerleşebilir. BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), b-NDF (b-Neural differentiation factor), glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) gibi büyüme faktörleri salgılayarak fonksiyonel iyileşmeye katkı yapabilmektedir. Apoptotik ve inflamatuvar hücre ölümünü baskırlar. Salgıladıkları bazı anti-inflamatuvar sitokinler vasıtasıyla kronik enflamasyonu baskıladıkları bilinmektedir. Kemoatraktan etki mekanizmalarıyla mevcut kök hücre havuzunu da uyararak etki gösterdiğini bildiren raporlar mevcuttur. Ayrıca, MKH'in ekzosom ya da multiveziküler cisimcikler vasıtasıyla gen aktarımında buldukları gösterilmiştir.

Fakat çeşitli nörotrofik faktörlerin varlığında nöral markerları eksprese eden MKH'lerin in-vivo olarak glial hücrelere dediferansiye oldukları düşünülmektedir. Adipöz doku kaynaklı kök hücrelerin vitreus boşluğunda 90 gün yaşayabilmekle birlikte retina dokusu içine entegre olamadıkları gösterilmiştir. Göze kök hücre uygulaması perioküler, suprakoroidal, intravitreal veya subretinal yollardan yapılabilir. RP'de kök hücre uygulaması sonucunda beklenen fonksiyonel değişim ERG cevabında iyileşme ve görme keskinliğinde artış olarak gösterilmeli, bu fark istatistiksel olarak anlamlı olmalıdır. Bugüne kadar yapılan intravitreal ve subretinal uygulamalarda anlamlı bir fonksiyonel kazanç sağlanmadığı gibi epiretinal membran oluşumu, traksiyonel retina dekolmanı ve fitizis bulbi gibi ciddi komplikasyonlarla karşılaşmıştır. Bizim subretinal umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulamamızda subretinal alana enjekte edilen hücrelerin preretinal alana regürjitasyonunun önlenemediği, bunun da retina yüzeyinde membran proliferasyonuna neden olduğu görüldü. Subretinal alana enjekte edilen hücrelerin de belirli alanlarda fibrotik görünümlü plaklar olarak sebat ettiği fonksiyonel bir kazanç sağlamadığı gözlemlendi. Bu nedenlerle süspansiyon halinde mezenkimal kök hücrelerin subretinal uygulamasının bu hastadaki gibi fotoreseptör tabakasının tamamen atrofiye olduğu olgularda yararlı olmadığı kanaatine varılmıştır.

Sonuç: Günümüzde ileri evrelerdeki RP hastalarında kök hücre çalışmaları yapılmaktadır. Bu olgular nöral proteksiyon ve fonksiyonel iyileşmenin takibi için uygun adaylar değildir. Kök hücrenin kaynağı, uygulama yolu, miktarı ve başka faktörler konusunda bir görüş birliği yoktur. Embriyonik kök hücre ile çalışmalarda ciddi sınırlamalar bulunmaktadır. Az sayıda ve bilimsel kanıt değeri düşük klinik çalışmalar ile etkinliği gösterilmemiş olan bu yöntemin, bu koşullar altında RP'ye bağlı körlükte tedavi edici değeri olmadığı düşünülmektedir.

Doku Mühendisliği ve Gelişme Açıları

Vasıf Hasırcı

*Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Tıp Mühendisliği Bölümü, İstanbul, ve
BIOMATEN, ODTÜ Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Merkezi, Ankara*

Doku mühendisliği, alanın öncülerinden Dr. Langer ve Dr. Vacanti tarafından "mühendislik ve yaşam bilimleri prensiplerini kullanarak organların ya da dokuların yerini almak ya da işlevlerini üstlenmek üzere ürünlerin geliştirilmesi hedefleyen disiplinlerarası bir alandır" diye tanımlanmıştır. Alandaki bazı çalışmalar doku mühendisliği adı konulmadan çok önceleri de yapılmaktaysa da alan özellikle 1990'lardan itibaren hız, yaygınlık ve tanınırlık kazanmıştır. Doku mühendisliğinin 3 ana bileşeni vardır: bunlardan ikisi hastanın hücreleri ya da kök hücreleri ve bunları vücutta doku kayıp bölgesine konulacak, üzerinde adı geçen hücreleri taşıyan biyobozunur hücre iskeleleri (hücre taşıyıcısı) malzemelerdir. Üçüncü bileşen ise hücre büyüme, gelişme, farklılaşma ya da yönlendirme işlevleri gören biyoaktif ajanlardır. Bu üçlü yapı üzerinde yükselen doku mühendisliğine çok çeşitli alanlardan araştırmacılar kendi disiplinlerine ya da uzmanlıklarına göre katkı yapmaktadırlar ve bu çalışmalar birçok kez çok disiplinli araştırma grupları tarafından yürütülmektedir.

Doku mühendisliği çalışmaları öncelikle sert doku kayıp ve zararları için kemik ve kırık dokularını ve sonra yumuşak dokulardan yapay deri ve sinir yönlendiricisi (kılıfı) gibi ürünleri klinik uygulamalara sokmayı başarmıştır. Yapay dokuların üretiminde hastaya özel üretilenlere de yönelinmiş ve 3 boyutlu basım yöntemi burada önemli bir farklılık yaratmıştır. Önceleri sert polimerlerin kullanıldığı bilgisayar ve görüntü işleme yöntemlerinin desteğiyle basılan sert doku iskeleleri zamanla hidrojel kullanımı yoluyla yapısına yüklü hücreleri de içeren yumuşak doku taklitlerinin yapımına yol açmıştır.

Zaman içinde doku mühendisliği ürünlerinin tedavi değil tarama ve kişiye özel implant ve ilaçların araştırılmasında doku modeli olarak, in vivo (pre-klinik) testlerde ise hayvanlar yerine kullanılması aşamasına geçilmiştir. Mikrofluidik sistemlerin desteğiyle bu alan da önemli bir gelişme potansiyeli göstermektedir. Böylelikle hızlı tanı sistemleri kanser modellerinden hastaya özel ilaç ve dozların seçiminde rol oynamaya başlamıştır. Son eğilimler ise yalnızca hasta iyileştirmeye yetinmeyip hastalık oluşum ve tedavi mekanizmalarının moleküler biyolojik yöntemlerle incelenmesini de içermektedir.

Bu gelişmeler daha 40 yıl önce basit kompozisyonlu, biyolojik hiç bir katkı içermeyen yapay plastik, metal ve seramiklerden oluşan biyomalzeme alanının doku mühendisliği yoluyla sağlık sorunlarının çözümüne yaptığı çok önemli katkıyı göstermektedir.

3 kök hücre
ve hücresel tedaviler
kongresi
Joint Meeting With ISSCA

TUBA



TÜRKİYE BİLDİRİLER AKADEMİSİ



ISSCA



Tıp Fakültesi



Spor Bilimleri
Fakültesi

12-14 Nisan 2019

Marmara Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi
Arastırma Merkezi Konferans Salonu

İstanbul

SÖZLÜ BİLDİRİ SUNUMLARI

SS001 - Ex-vivo Whole Uterine Tissue Culture

Elif Ganime Aydeniz¹, Gamze Tümentemur², Bulut Yurtsever³, Ercüment Ovalı³

¹Acıbadem Mehmet Aydınlar University Atakent Hospital, İstanbul

²Acıbadem Mehmet Aydınlar University İstanbul

³Acıbadem Mehmet Aydınlar University Labcell İstanbul

In vitro models are important to study the failures of embryonic implantation so apposition, attachment and invasion can be better understood. The main purpose of all endometrial cultures is to strengthen the communication between embryo and endometrium. To establish a good connection with the embryo, firstly we need to be sure of the viability of the endometrium. Long term survival of in vitro endometrial tissue will also be guiding in terms of ex vivo embryogenesis. In vitro models provide potentially area to investigate embryo development beyond the pre-implantation stage. Culture models will be guide the development of human embryo after 6 days. In this way, implantation failure will be solved and contraception methods will be improved. Also glucose metabolism is important for the preparation of the epithelium and stroma for embryo implantation during early pregnancy, and for the appropriate differentiation of the functionalis layer into the decidua of promoting the developing conceptus. The first model is ex vivo mammalian implantation reported by Glenister to the 50 years ago. This is the first study for artificial uterus in our model. Detection of endometrium viability by histopathology and glucose parameters is also helpful in terms of receptivity. Variety of approaches and contents have been employed in an effort to mimic in vivo endometrial tissue and a basic model for implantation. Both of fibrin matrix and Ishikawa endometrial cell line provide a good basis for the survival of the endometrium in our model. As in all in vitro endometrium culture studies, finding the answer to the above-mentioned questions like in our study will increase the success rate of infertility treatment.

SS002 - Sıçanlarda Kemoterapi Sonrası Yağ Dokudan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücre Tedavisinin Primordiyal Foliküllerdeki PTEN/AKT/FOXO3A Yolağına Etkisi

Özen Önal¹, Gülçin Mete², Nazlı Çil², Semih Tan²

¹S.B.Ü.Kanuni Sultan Süleyman Eğitim Araştırma Hastanesi İstanbul

²Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Denizli

GİRİŞ: Günümüzde birçok kanserin tedavisinde kemoterapi ve radyoterapinin yaygın olarak kullanılmaya başlanması ile kanser hastalarının 5 yıllık yaşam süresi artmıştır. Ancak uygulanan bu tedavilerin toksik etkileri yüzünden hastalar tedavi sonrasında bazı tıbbi sorunlar ile karşı karşıya kalmakta ve yaşam kaliteleri düşmektedir. Önemli bir konu da bu tedavilerin uygulandığı genç hastalarda üremeyi korumaya yönelik işlemlerdir. Alkilleyici grubu kemoterapotiklerden olan Siklofosfamid pekçok kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta ve genital organlar üzerine olan toksik etkileri yüzünden infertiliteye neden olmaktadır. Siklofosfamid (CTX) kullanımı ile ovaryum rezervini temsil eden primordiyal foliküllerin kitlesel kaybı olur ve böylece prematür ovaryan yetmezlik gelişir. Daha önce yapılan çalışmalarda PTEN/AKT/FOXO3a yolağına primordiyal foliküllerin gelişimi ve hayatta kalımı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Siklofosfamidin bu sinyal yolağı üzerinden primordiyal foliküllerin aktiflenmesine yol açarak ovaryum rezervinin yok olmasına neden olduğu bilinmektedir. Biz bu çalışmada siklofosfamidin ovaryuma olan toksik etkisine karşı mezenkimal kök hücrelerin tedavi edici etkisini ve PTEN/AKT/FOXO3a yolağı üzerine olan rolünü araştırmayı amaçladık.

GEREÇ-YÖNTEM: Bu çalışmada, toplam 18 adet, 8 haftalık, 150±15 gram ağırlığında Wistar Albino cinsi dişi sıçan üzerinde çalışıldı. Sıçanlar rastgele seçilerek 3 gruba ayrıldı. Grup1:Kontrol grubu (CTX,n=6), Grup 2: Siklofosfamid grubu (CTX, n=6) Grup 3: Siklofosfamid+Mezenkimal kök hücre grubu (K, n=6) olarak 3 grup oluşturuldu. Grup 2 ve Grup 3' e ilk gün 50 mg/kg siklofosfamid intraperitoneal (ip.) yoldan enjekte edildi ve aynı gruplara takip eden 13 gün boyunca günlük 8mg/kg ip. yoldan siklofosfamid enjekte edildi. Daha sonra sadece Grup 3'e siklofosfamid enjeksiyonunun son gününden 2 gün sonra yağ dokudan elde ettiğimiz mezenkimal kök hücreleri (Herbir overe 50.000 mezenkimal kök hücreyi 0.05ml FBS içerisinde) cerrahi yöntemle direk sıçanların her iki ovaryumuna enjekte edildi.

Kök hücre enjeksiyonundan 8 hafta sonra tüm sıçanların ovaryumlarını çıkarılarak rutin ışık mikroskop takibi yapıldı. Parafin bloklardan 3 µm luk kesitler alınarak Hematoksilen&Eozin ile boyandı. PTEN, pPTEN, AKT, pAKT, FOXO3a ve pFOXO3a ekspresyonları İmmnohistokimya yöntemiyle incelendi.-

BULGULAR: Siklofosfamidin ovaryum dokusunu hasara uğrattığı ve normal yapılı follikül sayısını azalttığı gözlemlenmiştir. Siklofosfamid+Mesenkimal kök hücre grubunda, overde dejeneratif foliküllerin sayısının azaldığı ve primordial foliküllerde granülosa hücrelerinin yapısının normal görünümüne yakın olarak korunduğu gözlemlendi. Aynı zamanda CTX+kök hücre grubunda PTEN/Akt/Foxo3a yolağında ekspresyonların pozitif olduğunu belirlendi. Follikül sayımı sonucunda primordial foliküller en az grup 2 (CTX) ve grup3' de (CTX+KH grubu) ($p=0,936$) bulunurken sekonder ve tersiyer foliküller grup 2' e (CTX grubu) karşın grup 3' de (CTX+KH grubu) oldukça fazla sayıda olduğu belirlendi ($p=0,007$, $p=0,002$).

TARTIŞMA ve SONUÇ: Siklofosfomid ovaryum dokusunda ciddi hasara neden olmaktadır. Kök hücre uygulaması ise bu doku hasarını onarmakta aynı zamanda PTEN/Akt/Foxo3a yolağını aktifleyerek primordial foliküllerin primer foliküle farklanmasına neden olmaktadır. Siklofosfamidin PTEN/Akt/Foxo3a yolağına etkisi ilk uygulandığında akut olarak gerçekleşmektedir ancak primordiyal foliküller yenilenemediği için etkisi kalıcı olmaktadır. Kök hücre uygulaması da primordial folikülleri aktiflemekle birlikte ovulasyona giden sağlıklı antral follikül sayısını arttırmaktadır.

SS003 - Optik Nöropatili Olgularda Suprakoroidal Mezenkimal Kök Hücre Implantasyonu

Ayşe Öner¹, Neslihan Sinim Kahraman², Zeynep Burçin Gönen¹

¹Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları AD, Kayseri

²Kayseri Acıbadem Hastanesi Göz Kliniği, Kayseri

Amaç: Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) nöroprotektif etkisinin olduğu ve optik nöropatilerde görsel fonksiyonlarda iyileşme sağladığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Bu olgu serisinde optik nöropatili olgularda suprakoroidal MKH implantasyonunun sonuçları sunulmuştur.

Hastalar ve Metod: Bu prospektif tek merkezli faz ½ çalışma kapsamında optik nöropatili 5 olguya suprakoroidal umbilikal kord kaynaklı MKH implantasyonu uygulanmıştır. Olgularda en iyi düzeltilmiş görme keskinliği (EİDGK) 1 metreden parmak sayma (1 mps) düzeyi ile 0.4 arasında değişmektedir. Olguların tek gözüne Limoli Retinal Restorasyon tekniği kullanılarak suprakoroidal MKH implantasyonu uygulanmıştır. Olgular tedavi sonrası 1. gün, 1. ay 3. ve 6. aylarda takip edilmiştir. Takiplerde EİDGK, ön segment ve fundus muayenesi, optic kohorens tomografi (OKT) ve periferik görme alanı (PGA) yapılmıştır. Tedavi öncesinde ve 6 aylık takiplerin sonunda fundus floresein anjiyografi (FFA) ve multifokal elektoretinografi (mf ERG) testleri uygulanmıştır.

Bulgular: 5 olgunun da 6 aylık takipleri tamamlanmıştır. Hiç birinde sistemik ve okuler komplikasyon görülmemiştir. Olguların tümünde EİDGK ve PGA testlerinde iyileşme saptanmıştır. Hiçbir olguda FFA testinde patolojiye rastlanmamıştır. Olguların tümünde 6. ayda yapılan Mf ERG yanıtlarında iyileşme saptanmıştır.

Sonuç: Optik nöropatili olgularda suprakoroidal MKH uygulaması güvenli ve etkin bir tedavi seçeneği olabilir. Bu konuda daha çok sayıda olgu içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

SS004 - İleri Evre Retinitis Pigmentozalı İki Olgunun Subretinal Mezenkimal Kök Hücre İmplantasyonu Sonrasında 4 Yıllık Takip Sonuçları

Ayşe Öner¹, Neslihan Sinim Kahraman², Zeynep Burçin Gönen³

¹Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları AD, Kayseri

²Kayseri Acıbadem Hastanesi Göz Kliniği, Kayseri

³Erciyes Üniversitesi GENKÖK Genom ve Kök Hücre merkezi, Kayseri

Amaç: İleri evre retinitis pigmentozalı (RP) iki olgunun subretinal mezenkimal kök hücre (MKH) implantasyonu sonrasında 4 yıllık takip sonuçlarını sunmak amaçlanmıştır.

Hastalar ve Metod: Bu bildiri tek merkezli faz ½ çalışma kapsamında opere edilen RP'li 2 olgunun 4 yıllık takip sonuçlarını içermektedir. Olgulara vitrektomi sonrasında subretinal olarak adipoz doku kaynaklı 2 milyon MKH implantasyonu uygulanmıştır. Her iki olguda da cerrahi öncesi en iyi düzeltilmiş görme keskinliği (EİDGK) 1 metreden parmak sayma (1 mps) düzeyindedir. Olgular tedavi sonrası 1. gün, 1. ay 3. ay ve sonrasında 6 aylık aralarla takip edilmiştir. Takiplerde EİDGK, ön segment ve fundus muayenesi, optik kohorens tomografi (OKT) ve periferik görme alanı (PGA) yapılmıştır. Tedavi öncesinde ve her 6 aylık takipte fundus floresein anjiyografi (FFA) ve multifokal elektoretinografi (mf ERG) testleri uygulanmıştır.

Bulgular: 2 olgunun da 4 yıllık takipleri tamamlanmıştır. Hiç birinde sistemik ve okuler komplikasyon görülmemiştir. Olguların tümünde EİDGK ve PGA testlerinde iyileşme saptanmıştır. Bir olguda EİDGK 0.05'e diğer olguda ise 2 mps düzeyine yükselmiştir. Hiçbir olguda FFA testlerinde patolojiye rastlanmamıştır. Olguların tümünde 6. ayda yapılan Mf ERG yanıtlarında iyileşme saptanmıştır ve bu iyileşmenin 4. yılda da korunduğu görülmüştür. Takiplerde olguların tedavi edilmeyen gözünde tüm testlerde kötüleşme saptanmıştır.

Sonuç: Retinitis pigmentosalı olgularda subretinal MKH uygulaması hastalığın ilerlemesini önlemede etkili bir tedavi seçeneği olabilir. Bu konuda daha çok sayıda olgu içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

SS005 - Kullanıma Hazır Rejeneratif Tıp Ürünü: Ünlversal İnsan Plateletten Zengin Plazması

Fatma Eyüboğlu Ünüvar¹, Rengim Vural¹, İrem Peker Eyübođlu², Arife Kaymaz³, Nil Banu Pelit¹, Ercüment Ovalı¹

¹Acıbadem Labcell, Hücre Laboratuvarı, Hücrel Tedavi Ürünleri Üretim Tesisi

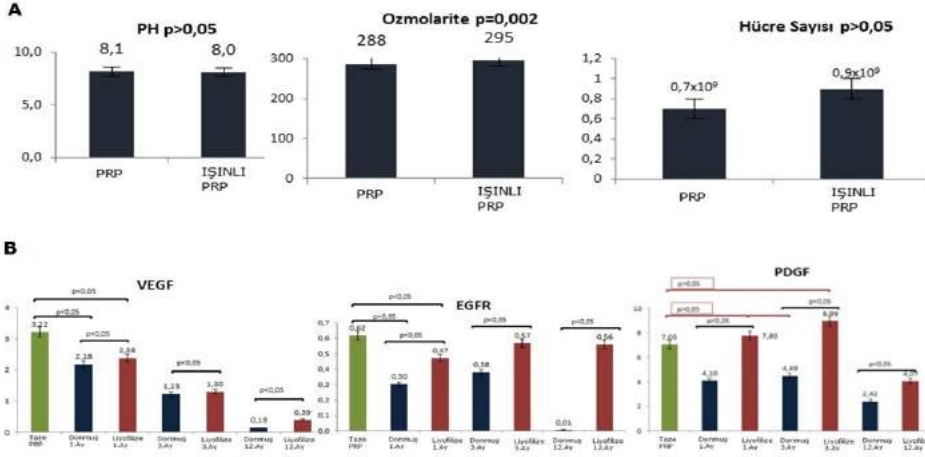
²Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

³Acıbadem Labmed Klinik Laboratuvarları

GİRİŞ: Plateletten Zengin Plazma (PRP) trombositlerin plazma içerisinde konsantre edilmiş şeklidir. Büyüme faktörleri, kemokin ve sitokinler açısından zengin içeriği ile hücre kemotaksisini, çoğalmasını, farklılaşmasını, anjiyogenezi ve hücre dışı matrisin üretimini uyarabilmektedir. Bu özellikler sayesinde birçok farklı klinik alanda doku rejenerasyonunu desteklemek üzere kullanılmaktadır [1-3]. Günümüzde bu amaçla kullanılan PRP sadece otolog olarak uygulama öncesi üretilmektedir. Bu nedenle ürün kalitesi, içeriği ve etkinliği üreticiye, vericinin o andaki kan değerlerine veya kullanılan metoda göre değişiklik göstermektedir. Çalışmamız ile uygulamaya hazır, standart, steril, güvenli, konsantre ve zengin içeriğe sahip universal PRP ürünü için en uygun metodun araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: 21, 27 ve 28 yaşlarında 3 farklı erkek gönüllü vericiye trombosit aferezi yapıldı. Elde edilen trombosit süspansiyonu (PRP) ışlandıktan sonra bir kısmı direkt dondurularak, bir kısmı ise liyofilize edildikten sonra -20°C'de saklandı. Taze örnekler ve saklama sonrası 1, 3 ve 12. aylarda çözölen örneklerden hücre sayısı, pH, ozmolarite, eliza ile büyüme faktör içerik (EGF, VEGF, PDGF) ölçümleri ve etkinlik analizi (MSC Proliferasyon Testi) yapıldı. Değerlendirmeler 3 farklı vericiye ait sonuçların ortalaması alınarak yapıldı.

BULGULAR: Taze PRP ile karşılaştırıldığında ışılama işleminin hücre sayısı, ozmolarite, pH (Şekil-1-A) ve büyüme faktör salınımı üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı saptandı. Liyofilize edilmiş grupta hücre sayısının belirgin şekilde düştüğü göröldü. Liyofilize halde saklanan grupların büyüme faktör konsantrasyonunu dondurularak saklanan gruplara göre daha iyi muhafaza ettiği göröldü (Şekil-1-B). 12. ayda yapılan pH ölçümlerinde değişiklik görölmezken ozmolaritenin daha düşük olduğu göröldü. MKH proliferasyon testinde taze PRP ile karşılaştırıldığında dondurularak saklanan grupların proliferasyonu olumsuz yönde etkilediği görölürken, liyofilize halde saklanan gruplarda anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.



Şekil 1: A. Taze PRP ve ışınlanmış PRP ozmolarite, pH ve hücre sayım sonuçları
B. Taze PRP, liyofilize PRP ve dondurulmuş PRP büyüme faktör konsantrasyonları

TARTIŞMA: Elde edilen veriler trombosit aferezi ile toplanan PRP'nin ışınlama ve liyofilizasyon sonrası 3 ay süreye kadar etkinliğini koruduğunu, bu şekilde kullanıma hazır güvenli ve etkin olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Çözülen liyofilize PRP'deki ozmolarite düşüklüğü eklenen sıvı miktarının düşürülmesi ile optimize edilmiştir. MKH ile yapılan kültür çalışması farklı dozlarda tekrar edilmelidir. Çalışma bir ileri seviyede, örnek sayısı artırılarak, farklı büyüme faktörleri ve sitokinler eklenerek ve tanı bazlı in vivo çalışmalar ile desteklenerek geliştirilecektir.

REFERANSLAR:

- [1] Marmotti A. et al. BioMed Res. Int. 2015, 542502,
- [2] M. D. Lynch & S. Bashir J Dermatolog Treat, 2016; 27(3): 285–289
- [3] Yuan T. et al. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2012, 13, 1173-1184

SS006 - İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler İçin Bitkisel Müsilaj Kaynaklı 3-Boyutlu Doku Mühendisliği İskelelerinin Üretimi

Ekin ŞİMŞEK^a, Yavuz Emre ARSLAN^a

^a Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, ÇANAKKALE, 17100

Genel Bilgi ve Amaç

Doğal polisakkaritler, biyouyumlu ve biyobozunur olmaları ve düşük toksisiteye sahip olmaları sebebiyle doku mühendisliğinde sıklıkla biyomalzeme olarak kullanılmaktadır. Ketan, fesleğen, çiya, sarı hardal ve ayva çekirdeği müsilajları, doğal polisakkaritlerin keşfedilmemiş bir kaynağı olan bitki müsilajlarının bazılarındandır [1]. Ayva çekirdeği müsilajı, geleneksel tıpta çeşitli hastalıkları iyileştirmede ve yara tedavisinde kullanılmaktadır [2]. Ancak, literatürde doku mühendisliğinde biyomalzeme olarak kullanımına dair herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bundan yola çıkılarak, bu çalışmada ayva çekirdeği müsilajının biyomalzeme olarak doku mühendisliğinde kullanımını araştırmak hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Müsilajın Ekstraksiyonu

Çalışma boyunca kullanılan ayva çekirdekleri Çanakkale ilinden mevsiminde toplanmıştır ve +4 °C'de saklanmıştır. Müsilaj ekstraksiyonu, ultra saf su (Direct-Q 3 UV, Merck-Millipore, Massachusetts, ABD) ile Rotary (Rotavapor R-200, Buchi, İsviçre) cihazında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen müsilaj katı partiküllerden kurtulmak için süzülmüştür. Daha sonra verimi hesaplanmıştır.

İskele Üretimi

Müsilaj iskele formu alabilmesi için kalıplanmış ve liyofilize (LyoQuest -55, Telstar, İspanya) edilmiştir. Daha sonra iskeleye, yapısının korunması ve rijitlik kazanması için çapraz bağlama işlemi uygulanmıştır. Çapraz bağlama işleminde, etil alkol (EtOH) (Merck, Darmstadt, Almanya), 2- (N-morfolino) etansülfonik asit (MES, Merck), N-hidroksi süksinimit/1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimide (NHS/EDC, Merck) kullanılmıştır. Çapraz bağlanan iskeleler, çapraz bağlayıcı kalıntıların uzaklaştırılması amaçlı dinamik olarak Incu-Shaker Mini (Benchmark, Sayreville, New Jersey, ABD) cihazında saf suyla (Merck-Millipore) yıkanmıştır ve tekrar kuru formuna getirmek amaçlı liyofilize edilmiştir.

İskelenin Karakterizasyonu

Çapraz bağlı ve çapraz bağırsız iskelelerin morfolojileri 10 kV alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM, JSM-7100F, Jeol, Japonya) cihazı ile incelenmiş ve yüzey alanları Brunauere-Emmette-Teller (BET) analizi ve fonksiyonel grupları ise Nicolet IS50 Flex Gold Infrared Spektrometre (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, ABD) cihazıyla belirlenmiştir. SEM öncesi iskeleler, Altın-Paladyum ile kaplama cihazında (SC7620, Mini Sputter Coater, Quorum, Laughton, East Sussex, İngiltere) kaplanmıştır. BET analizi için Quadrasorb SI (Quantachrome Instruments, Florida, ABD) cihazı kullanılmıştır. Gözeneklilik testi, iskelenin ne kadar gözenekliliğe sahip olduğunu belirlemek amacıyla sıvı yer değiştirme tekniği kullanılarak uygulanmıştır. Sıvı olarak n-hekzan (Merck) kullanılmıştır. Şişme testi ve sıvı tutma testleri, iskelenin yapısında ne kadar sıvı tutabildiğini belirlemek için uygulanmıştır. Testler NaCl içeren fosfat tamponu (PBS, pH=7.4) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Hücre Kültürü

İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (Merck-Millipore, İnsan Adipoz Mezenkimal Kök Hücre Kiti) iskeleler üzerine ekilmiştir. Hücrelerin 3., 7. ve 10. günlerde canlılıkları MTT testi (Hücre Büyüme Belirleme Kiti, MTT tabanlı, Merck) ile belirlenmiştir. SEM ile hücrelerin iskele üzerindeki davranışları gözlemlenmiştir.

Bulgular

Müsilaj verimi $6,28 \pm 0,40$ (n=3) olarak bulunmuştur. SEM mikrografileriyle çapraz bağlı ve çapraz bağımsız iskelelerin gözenek çapları sırasıyla ortalama $64,64 \pm 18,49 \mu\text{m}$ (n=8) ve $161,67 \pm 42,71 \mu\text{m}$ (n=6) olarak hesaplanmıştır. İskelelerin şişme oranları $12677,50 \pm 388,82$ (n=3) ve gözeneklilik oranları $83,43 \pm 2,84$ (n=3) olarak bulunmuştur. Sıvı tutma kapasitesi ise $0,7345 \pm 0,0411$ (n=3) olarak hesaplanmıştır. BET analizinde çapraz bağımsız ve çapraz bağlı iskelelerin yüzey alanları sırasıyla $9,416 \text{ m}^2/\text{g}$ ve $27,195 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. Hücre canlılıkları 3., 7. ve 10. günler için sırasıyla $83,89 \pm 7,94$, $100 \pm 7,55$ ve $95,06 \pm 10,22$ olarak hesaplanmıştır.

Tartışma

SEM mikrografileri, çapraz bağlı ve çapraz bağımsız iskelelerin birbirleriyle bağlantılı gözenekli yapıda olduklarını, çapraz bağlı iskelelerin gözenek yapılarının homojen olduğunu ve hücrelerin iskeleye tutunarak çoğaldıklarını ve küre formda büyüdüklerini göstermiştir. Şişme, gözeneklilik ve sıvı tutma testleriyle iskelenin oldukça gözenekli yapıda olduğu belirlenmiştir. BET analizinde, gözeneklerin makro yapıda olduğu ve çapraz bağlamanın yüzey alanını artırdığı gözlemlenmiştir. FT-IR analizi, çapraz bağlama işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini doğrulamıştır. Hücre canlılık değerleri, iskelelerin sitotoksik etkisinin olmadığını göstermiştir.

Sonuç

Sonuç olarak, ayva çekirdeği müsilajından üretilen iskeleler, hücrelere tutunabilecekleri, çoğalabilecekleri ve büyüebilecekleri bir ortam sağlamaktadır. Bu bağlamda, iskelelerin doku mühendisliğinde potansiyel kullanıma sahip olduğu düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Urena-Saborio H., Alfaro-Viquez E., Esquivel-Alvarado D., Madrigal-Carballo, S., Gunasekaran S. 2018. Electrospun plant mucilage nanofibers as biocompatible scaffolds for cell proliferation. International Journal of Biological Macromolecules, 115, 1218–1224.
- Ghafourian M., Tamri P., Hemmati A. 2015. Enhancement of Skin Fibroblasts Proliferation as a Result of Treating With Quince Seed Mucilage. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 10(1), 10-13.

SS007 - Metabolik Sendromlu Eretil Disfonksiyona Sahip Hastalarda Otolog Adipoz Türevli Rejeneratif Hücre Ve Plateletten Zengin Plazmanın Tek Doz İntrakavernöz Enjeksiyonun Tolere Edilebilirliği, Güvenliği Ve Potansiyel Etkinliği

Tuncay Tas¹, Basri Çakıroğlu²

¹İstanbul Esenyurt Üniversitesi Sağlık Bilimleri, İstanbul Cerrahi Hastanesi Üroloji İstanbul, Türkiye

²Hisar İntercontinental Hastanesi Üroloji, İstanbul

Amaç: Metabolik sendrom (MS) endotel disfonksiyon ve nitrik oksit (NO) kaybına yol açarak erektil disfonksiyona (ED'a) sebep olur. Pre-klinik çalışmalar ED tedavinde adipoz türevli rejeneratif hücre (ADRC'ler) kullanılmasının umut verici terapötik etkisini göstermiştir. Çalışmamızda, MS ile ilişkili ED'si olan 3 hastanın intrakavernöz otolog ADRC ve PRP kombine uygulaması sonrası tolere edilebilirliği, güvenliği ve etkinliğinin erken klinik sonuçlarını rapor etmeyi amaçladık.

Gereç Yöntem: MS'li PDE-5 inhibitörlerine ve diğer konvansiyonel tedavilere yanıt alınamayan en az 6 aydır ED şikayeti olan 3 erkek hastaya (H1,H2,H3) tek doz intrakavernöz otolog ADRC ve PRP uygulandı. İşlem ameliyathanede lokal anestezi altında gerçekleştirildi. Enjeksiyon sırasında penis dorsal arter ve süperfisial/derin dorsal veni kapatmadan sadece kavernoza kaçışı engelleyecek klempleme (30-45dk) tekniği kullanıldı.

Tolere edilebilirlik ve 24 saatte güvenlik değerlendirildi. Ameliyat sonrası görsel ağrı skalası (VAS) yardımıyla hastaların ağrı durumları incelendi. Etkinlik, Uluslararası Eretil Fonksiyon İndeksi-5 (IIEF-5) ve Ereksiyon Sertlik Skoru (EHS) kullanılarak 1. ve 3. ayda değerlendirildi. Hastalar erken-geç dönem komplikasyonlar açısından değerlendirildi.

Bulgular: Liposuction ve enjeksiyon sonrası ve geç dönemde 3 hastada da hiçbir yan etki görülmedi. Hastaların IIEF'leri işlem öncesi ve 1 ay. 3 ay kontrollerinde sırasıyla H1:5-14-17, H2: 7-15-16 ve H3: 8-9-11 olarak izlendi. EHS ise sırasıyla H1:1-3-3, H2:2-3-3 ve H3:1-2-2 olarak izlendi. H1'in PDE-5 inhibitörü kullanmaksızın H2 kullanarak ilişkiye girebildiğini ve sürdürebildiğini bildirdi. H3 PDE-5 inhibitörleri ile bile penetrasyon için yeterli sertliği sağlayamadı.

Sonuç: Otolog ADRC ve PRP'nin kombine tek doz intrakavernöz enjeksiyonu güvenli bir prosedürdür. IIEF-5 ve EHS'de artma ve erektil fonksiyonunda iyileşme nedeniyle umut verici bir tedavi seçeneğidir.

Anahtar Kelimeler: adipoz doku kaynaklı kök hücre, erektil disfonksiyon, metabolik sendrom, plateletten zengin plazma

SS008 – Deneysel Olarak Asherman Sendromu Oluşturulan Sıçanlarda Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Tedavisi

Nazlı Çil¹, Mutlu Yaka¹, Murat Serkant Ünal¹, Yavuz Dodurga², Hakan Akça³, Semih Tan¹, Mücahit Seçme², Gülçin Abban Mete¹

1Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Denizli

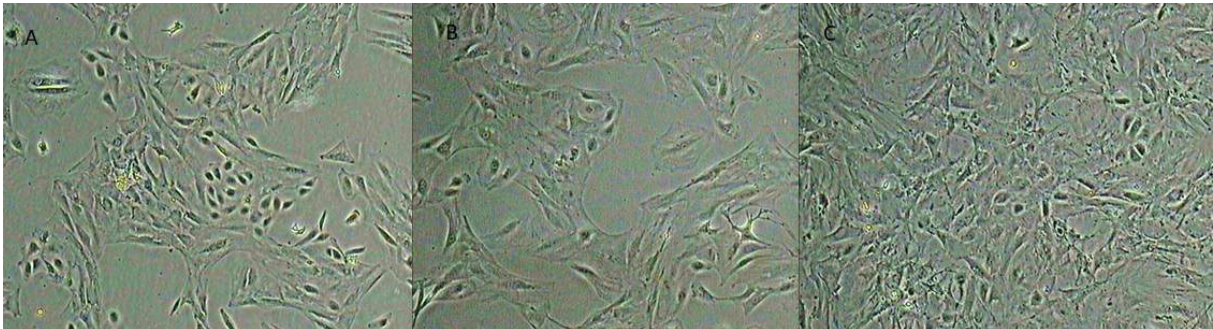
2Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Denizli

3Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı, Denizli

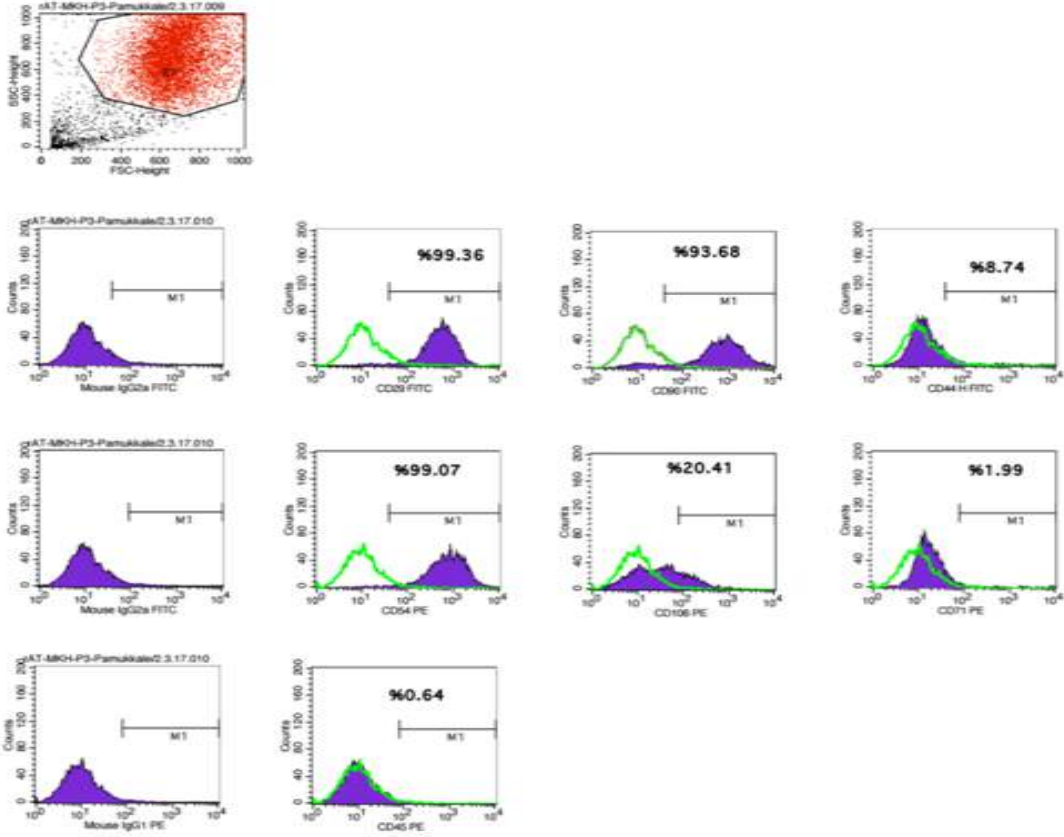
Giriş: Asherman sendromu (uterin sineşi, uterin yapışıklık) endometrium bazal tabakasındaki hasarın bir sonucu olarak oluşan fibrozis ya da uterinal yapışıklıklar nedeniyle oluşur(1). Önceki çalışmalarda Kemik iliği-Mezenkimal kök hücrelerin (BM- MKH) endometrial stromal fibroblastlara kaynaklık eden progenitor hücrelere dönüştükleri gösterilmiştir(2). Amacımız Asherman Sendromu oluşturulan sıçanlarda adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulamasının endometrium dokusundaki VEGF,IGF-1,miRNA198,miRNA199ekspresyonlarına etkisini araştırmaktır.

Gereç-Yöntem: Wistar albino,sağlıklı dişi sıçanlar kullanılmıştır:Kontrol grubu(K)(n=7),Asherman(0,1ml triklorasetik asit sağ uterinhorn,tek doz)grubu(AS)(n=7),Asherman+oral östrojen(günlük 0,1mg/kg,2hafta)grubu(ASO)(n=7),Asherman+kök hücre(1×10^6 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre,tek doz,lokal)grubu(ASKH)(n=7),Asherman+oralöstrojen+kök hücre grubu(ASKHO)(n=7).Sıçan adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücreler deney gruplarına uygulanmadan önce karakterize edildi ve farklılaşma deneyleri yapıldı.Asherman sendromu oluşturulduktan iki hafta sonra kök hücre tedavisi uygulandı.Dokulardaki MKH varlığını göstermek için BrDU(5-bromo -2'-deoxyuridine)işaretleme yapıldı.Gruplar oluşturulduktan 8 hafta sonra sıçanlar sakrifiye edildi ve bilateral uterin horn rezeksiyonu yapıldı.Alınan dokular formaldehitte tespit edildi.Rutin doku takibinin ardından kesitler alınıp hematoksilin eozin boyamayla değerlendirildi.Endometriumda immünohistokimyasal boyama ve western blot analiziyle VEGF, IGF-1 ekspresyonu değerlendirildi.Alınan uterus dokularından tespit işlemi yapılmadan önce bir kısmı ayrılarak trizol içinde -80°C'e kaldırıldı.Bu kısımlar reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanılarak miRNA-98 ve miRNA-199a ekspresyonuna bakıldı.

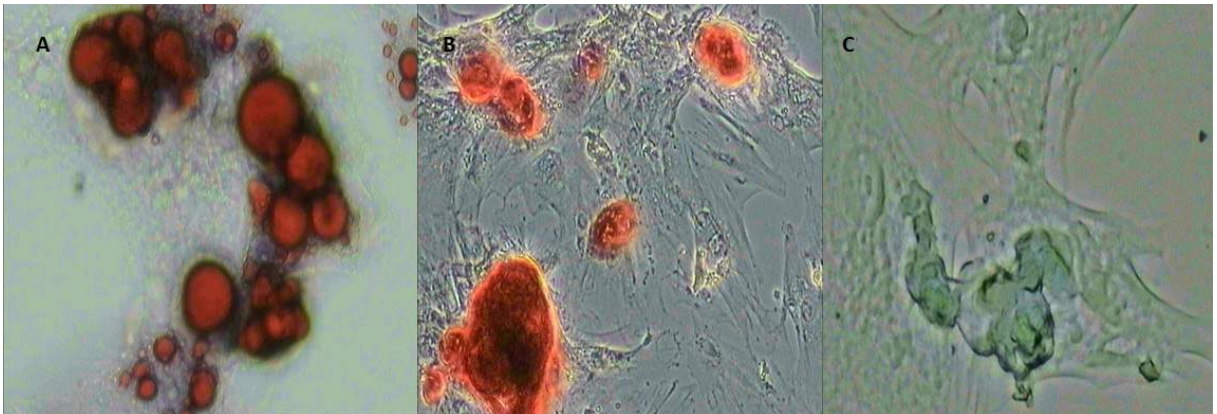
Bulgular



Resim 1: Primer hücre kültürü yapılarak sıçan adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin pasaj görüntüleri A: 1. Pasaj, B:2. Pasaj, C:3. Pasaj.

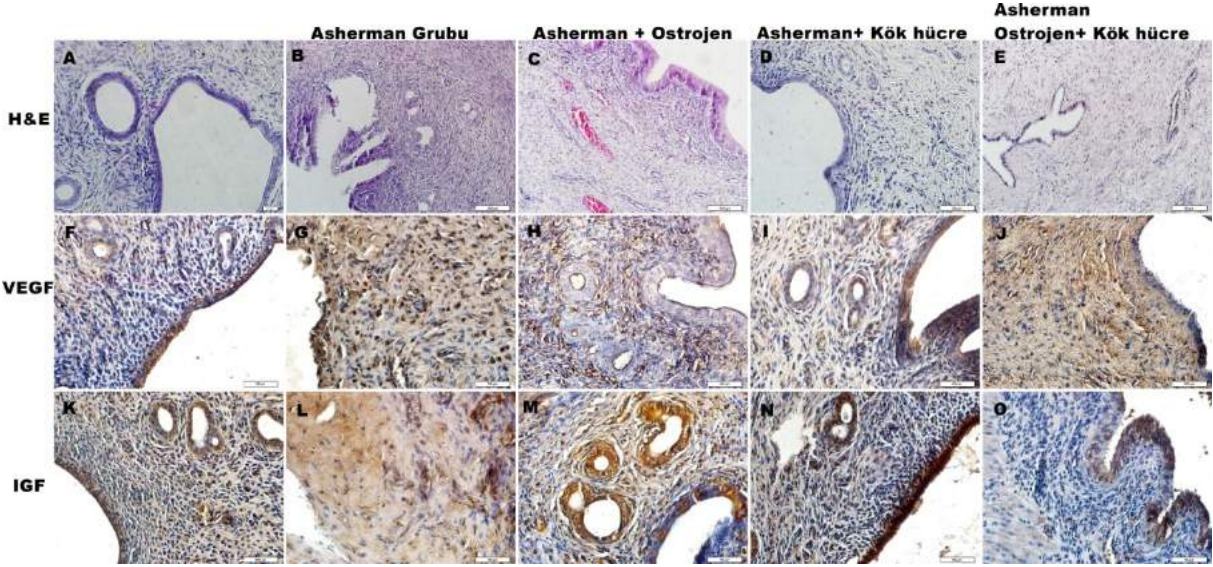


Şekil 2: Mezenkimal Kök Hücrelerimizimizin Flow Sitometri Sonuçları: CD29, CD90, CD54 sırası ile %99.36, %93.68, %99.07 pozitif, CD45 ve CD71 ise %0.64 ve %1.99 pozitif.



Şekil 3: Mezenkimal Kök Hücrelerimizimizin Adipojenik, Osteojenik ve Kondrojenik Dokuya Farklılaşması

Hematoksilen eozin boyalı kesitlerde AS grubunda yüzey epiteli bütünlüğünü kaybetmişti ve bol miktarda lökosit infiltrasyonu izlendi. Endometriyumda piknotik çekirdekli stromal hücreler dikkati çekti. Tedavi gruplarında genel olarak epitel bütünlüğü korunmuş ve lökosit infiltrasyonu azalmıştı. VEGF ekspresyonu bütün gruplarda bez epiteline stromada pozitif idi. Diğer gruplarda yüzey epiteli pozitifliği görülmesine rağmen AS grubunda yüzey epiteli döküldüğü için değerlendirme yapılamadı.



Şekil 4: Grupların Hematoksilen Eozin ve İmmünohistokimya sonuçları: Kontrol grubu (A,F,K), Asherman sendromu grubu (B,G,K), Asherman + Östrojen grubu (C,H,M), Asherman + Kök hücre grubu (D,I,N), Asherman + Östrojen + Kök hücre grubu (E,J,O)

Western blot analizindeki VEGF sonuçları ASKH ve ASKHO gruplarında anlamlı olarak yüksek bulundu. IGF AS grubunda yüzey epiteli döküldüğü için değerlendirilemezken ASKH ve ASKHO gruplarında K grubuna göre belirgin ekspresyon artışı gözlenmiştir. Western blot sonuçlarında da ASKH ve ASKHO gruplarında diğer gruplara göre belirgin IGF ekspresyon artışı izlendi. K grubuna göre AS grubunun miRNA-98 ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında AS grubuna anlamlı ($p < 0,05$) azalma bulunmuştur. K grubuna göre ASKHO grubu karşılaştırıldığında miRNA-98 ekspresyonu anlamlı ($p < 0,05$) şekilde azalmıştır. miRNA-98 ekspresyonu yönünden diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. K grubuna AS grubu ile karşılaştırıldığında miRNA-199a ekspresyonu AS grubunda anlamlı şekilde azalmıştır. miRNA-199a ekspresyonu yönünden diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Position	Symbol	Up-Down Regulation (comparing to control group)							
		Group 1 (AS)		Group 2 (AS+KH)		Group 3 (AS+OO)		Group 4 (AS+KH+OO)	
		Fold Regulation	p value	Fold Regulation	p value	Fold Regulation	p value	Fold Regulation	p value
1	U6	1		1		1		1	
2	miRNA-98	-6,3847	0,041448	-13,8819	0,17549	-5,717	0,17741	-4,8766	0,041994
3	miRNA-199a	-6,9888	0,010079	-7,4307	0,19527	-12,5862	0,19322	-13,6546	0,122867

Tablo 1: Uterusta kontrol grubuna göre diğer grupların miRNA-98, miRNA-199a ekspresyonunun Real Time PCR sonuçları

Tartışma: IGF'lerin uterin hücreler üzerindeki proliferatif ve farklılaştırıcı etkilerinin, menstrüasyon sonrası kadınlarda uterus dokusunun menstrüal siklus boyunca ve ayrıca rejeneratif süreçlerde büyümesini ve regresyonunu desteklediği düşünülmektedir.(3,4)VEGF,vasküler endotel hücreleri ve düz kas hücreleri dahil olmak üzere çok sayıda hücre tipinin proliferasyonu için güçlü mitojendir.(5-7)VEGF,anjyogenez ve endometriumun yeniden epitelizasyonu için kritiktir.(2)Yapılan bir çalışmada transplante edilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin rejeneratif endometrium bazalisine lokalize olduğunu ve VEGF,FGF,IGF-1,TGFβ-1 gibi büyüme faktörlerinin salgılandığı gösterilmiştir.Yeni uterin kavitenin rejenerasyonu için anjiogenezisi sağlarken stromal hücrelerin,epitel hücrelerinin ve kas hücrelerinin migrasyonunu ve proliferasyonunu indüklediği sonucuna varmışlardır.(2)Bizim çalışmamızda adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre tedavisi verilen gruplarda VEGF ve IGF ekspresyonunun arttırmış olması önceki çalışmaları desteklemektedir.

Let-7 ailesine ait olan miRNA98'in yüksek gradeli over kanserinde, akciğer kanserinde, melanomda ve diğer solid tümörlerde ekspresyonunun azalmış olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.(8-11)miRNA-98 aşırı salınımı hücre proliferasyonunu inhibe eder ve endometrial stromal hücrelerde hücre apoptozisine neden olur.(12)Gebe olmayan overiektomize yapılan sıçan uterusunda 17β östrojen yada östrojen+progesteron uygulaması miRna-98 ekspresyonu anlamlı şekilde düşürmüştür.(12)Bizim çalışmamızda AS grubunda K göre anlamlı şekilde azalmıştır(p<0,05).Östrojen ve kök hücre verilen gruplarda miRNA-98'in daha da azalması diğer çalışmalarla paraleldir.miRNA-199a sentezinin bir çok malign süreçte rol oynadığı bilinmektedir.(13,14)miRNA-199a inhibisyonun,Ets-1/MMP-1 yolağını düzenleyerek yara anjiyogenezini teşvik ettiği,miR-199a aşırı ekspresyonu,VEGF ekspresyonunu azaltarak tümör kaynaklı anjiyogenezini inhibe ettiği gösterilmiştir.(14,15)Yapılan çalışmalar miR-199a'nın endometrial stromal hücre invazyonunu inhibe ettiğini göstermektedir.(16)Tedavi gruplarımızda miRNA-199a'nın düşük olması ve bununla birlikte VEGF ekspresyonunun yüksek bulunması literatür ile uyumludur.

Sonuç: Bulgularımız kök hücrelerin asherman sendromundan sonra bozulan epitel dokularında proliferatif etki yaptığını gösterdi.İmmunohistokimya ve western blot sonuçları bu etkisini özellikle IGF üzerinden gerçekleştiği düşündürdü.Yaptığımız çalışma asherman sendromunda miRNA-98'in ve miRNA-199a'nın uterus dokusundaki salınımının azaldığı saptanmıştır.Tedavi gruplarında miRNA seviyeleri azalmaya devam ettiği için bu tedavilerin miRNA ekspresyonunu etkilemediğini göstermiştir.

KAYNAKLAR:

1. Kilic S., Yuksel B., Pinarli F., Albayrak A., Boztok B., Delibas T. Effect of stem cell application on Asherman syndrome, an experimental rat model. *Stem Cell Biology* (2014) 31:975–982
2. Ding L., Li X., Sun H., Su J., Lin N., Péault B., Song T., Yang Y., Dai J., Hu Y. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on collagen scaffolds for the functional regeneration of injured rat uterus, *Biomaterials* 35 (2014)
3. Xia HF, Jin X-H, Cao Z-F, Shi T, Ma X, MiR-98 is involved in rat embryo implantation by targeting Bcl-xl, *FEBS Letters* 588 (2014) 574–583.
4. Gao L, Huang Z, Lin H, Tian Y, Li P, Lin S bone marrow mesenchymal stem cells restore functional endometrium in the rat model for severe asherman syndrome *Reprod sci.* 2018 Nov 20: 1933719118799201.
5. W. Risau Mechanisms of angiogenesis *Nature*, 386 (1997), pp. 671-674
6. P. Wei, X. Chen, X. Song, C. Han, Y. Liu VEGF, bFGF, and their receptors in the endometrium of rhesus monkey during menstrual cycle and early pregnancy *Mol Reprod Dev*, 68 (2004), pp. 456-462
7. X. Fan, S. Krieg, C.J. Kuo, S.J. Wiegand, M. Rabinovitch, M.L. Druzin, et al. VEGF blockade inhibits angiogenesis and reepithelialization of endometrium *FASEB J*, 22 (2008), pp. 3571-3580
8. Wendler A, Keller D, Albrecht C, Peluso JJ, Wehling M, et al. Involvement of let-7/miR-98 microRNAs in the regulation of progesterone receptor membrane component 1 expression in ovarian cancer cells. *OncolRep* 2011; 25(1): 273-279. 20.
9. Xiang Q, Tang H, Yu J, Yin J, Yang X, et al. MicroRNA-98 sensitizes cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma cells by up-regulation of HMGA2. *Pharmazie* 2013; 68(4): 274-281. 21.
10. Yanaiharu N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006; 9: 189-198. 22.
11. Li F, Li XJ, Qiao L, Shi F, Liu W, Li Y, Dang YP, Gu WJ, et al. miR-98 suppresses melanoma metastasis through a negative feedback loop with its target gene IL-6. *Experimental & Molecular Medicine* 2014; 46(10): 116-125.
12. Hong-Fei Xia, Xiao-Hua Jin, Zong-Fu Cao, Tian Shi, Xu Ma MiR-98 is involved in rat embryo implantation by targeting Bcl-xl *febslet*. 2013.12.026
13. Shen, Q., Cicinnati, V. R., Zhange, X., Lacob, S., Weber, F., Sotiropoulos, G. C., Radtke, A., Lu, M., Paul, A., Gerken, G., and Beckebaum, S. (2010). Role of microRNA-199a-5p and discoidin domain receptor 1 in human hepatocellular carcinoma invasion. *Mol. Cancer* 9, 227.
14. He, J., Jing, Y., Li, W., Qian, X., Xu, Q., Li, F. S., Lui, L. Z., Jiang, B. H., and Jiang, Y. (2013). Roles and mechanism of miR-199a and miR-125b in tumor angiogenesis. *PLoS ONE* 8, e56647.
15. Chan YC, Roy S, Huang Y, Khanna S, Sen CK. The microRNA miR-199a-5p down-regulation switches on wound angiogenesis by derepressing the v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1-matrix metalloproteinase-1 pathway. *J Biol Chem.* 2012;287:41032–41043.
16. Ning Hu, Zhiheng Cheng, Yifan Pang, Hongmian Zhao, Li Chen, Chao Wang, Tong Qin, Qianyu Li, Yu Han, Jinlong Shi, Lin Fu High expression of MiR-98 is a good prognostic factor in acute myeloid leukemia patients treated with chemotherapy alone *Journal of Cancer* 2019; 10(1): 178–18

SS009 - Kültüre Edilmiş Amniotik Hücrelerde Mezankimal Kök Hücre Özelliklerinin Tayini: Morfolojik Tiplendirme, Yüzey Antijen Ekspresyonu (Immüfenotipleme) ve Osteojenik, Adipojenik, Kondrojenik Farklılaşma

Özlem Sezer¹, Gönül Oğur²

¹Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik Bölümü, Samsun

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı, Samsun

Mezankimal kök hücreler(MKH), günümüzde vücudun farklı doku ve organlarından izole edilebilen, farklılaşma potansiyelleri embriyonik kök hücrelere göre daha sınırlı olan hücrelerdir. MKH'ler uygun kültür koşulları altında başlıca kemik, yağ, kıkırdak, kas ve endotel hücrelerine farklılaşabilmektedir. İmmünsupresif özelliklere sahip bu hücreler, etik sorun yaratmamaları, olog ya da allograft olarak elde edilebilir ve kullanılabilir olmaları nedeniyle özellikle doku mühendisliği ile birçok hastalığın tedavisinde kullanılmalarına olanak sağlamaktadır.

Çalışmamızda, rutin laboratuvar kültür koşullarında üretilen amniotik sıvı(AS) kökenli hücrelerin immüfenotipik temelde "Mezankimal Kök Hücre" karakteri gösterilmiş, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyelleri belirlenmiştir. Morfolojik değerlendirme verileri, ASMKH'nin, AS'nin heterojen hücre popülasyonu içinde özgün bir hücre grubundan(FB2-tip hücreler) kaynaklandığını düşündürmektedir.

Çalışmamızla birlikte, literatürdeki benzer çalışmalardan elde edilen veriler,ASMKH'lerin, in-vitro ortamda etkin olarak farklılaşabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda, 2 farklı hücre soyunda (osteojenik-kondrojenik) yeterli farklılaşma gösterebilmiş olması, kendi laboratuvarlarımızdaki rutin fetal hücre kültür koşullarının, ASMKH izolasyonunda avantaj sağladığını düşündürmekte ve ilerideki benzer çalışmalar açısından önemli bir kolaylık sağlamaktadır. AS ile ilgili son gelişmelerden biri, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında, ASMKH kullanımının geniş yer bulmasıdır. Gelecekte kök hücre tedavilerinin yaygınlaşmasıyla, örneğin hücre kaplanmış stent ve kataterler aracılığı ile kardiovasküler sistem hastalıkları tedavisine ve eklem hastalıklarının artroskopik tedavisine olanak sağlanabileceği ileri sürülmektedir. Daha da öte, AS KH'ler de dahil olmak üzere fetal KH'lerin, nörodejeneratif hastalıklar, kalıtsal genetik hastalıklar, depo hastalıkları, osteogenezis imperfekta gibi kemik hastalıkları, lösemi ve otoimmün hastalıklar, yara ve yanık tedavisi ve spinal kanal travmalarının tedavilerinde yaygın uygulama alanı bulacağı öngörülmektedir.

SONUÇ OLARAK;

- 1.AS kökenli MKH'ler, laboratuvarımızın rutin amniotik hücre kültür koşullarında üretilmiştir.
- 2.AS hücreleri, (1)Amniotik sıvı spesifik hücre tipi(AF), (2)Fibroblastoid hücre tipi(FB1, FB2) ve (3)Epiteloid hücre tipi(E) olarak üç sınıfta değerlendirilmiştir. Fibroblastoid-tip(FB1 ve FB2), birbirine paralel iğ şeklindeki hücreler olarak belirlenmiştir; FB1 hücrelerinin uzun ve ince bir yapılarının olduğu ve FB2 hücrelerine göre çok daha homojen olduğu gözlemlenmiştir. AF-tip hücreler, sıkı bağlantısı olmayan, yuvarlak şekilli ve poligonal hücreler olarak, epiteloid-tip hücreler ise oldukça sıkı bağlantılı, küçük koloniler oluşturan, yuvarlak ve keskin kenarlı, adacıklar oluşturan hücreler olduğu saptanmıştır.
- 3.AS hücrelerinin, in-vitro hücre kültüründe, plastik yüzeylere en erken 24-48 saatte yapıştığı, 3-5 gün içinde ise küçük koloniler oluşturduğu belirlenmiştir.
- 4.AF-tip, FB2-tip ve E-tipi hücre tipinin kültür işleminin başında ortaya çıkmaktadırlar; AF-tip hücreler kültür işlemi süresince varlığını sürdürürken, E-tipi hücreler önemli ölçüde azalma göstermektedir. FB1-tipi hücreler, kültür işlemi sürecinde geç dönemde ortaya çıkmaktadır.
- 5.Mekanik kazıma yöntemi ile alt-kültürlere ait özgün klonlar üretilmeye çalışılmış ve morfolojik değerlendirme paralelinde AF ve FB yönünde selektif sub-kültürler üretilmiştir.
- 6.Selektif sub-kültür yapılan olgularda, tripsinizasyon sonrasında, spesifik hücre tipine ait morfolojik yapının korunduğu gözlenmiştir.
- 7.FB yönünde yapılan selektif sub-kültürlerin, kültürlerde devamlılığı daha uzun süre sağladığı görülmüş, AF-tipi hücrelerin ise tripsinizasyondan kısa bir süre sonra geniş tabanlı ve bölünmeyen hücreler halinde gözlenmiştir.
- 8.AS hücrelerinin ve sub-kültürlerin, MKH immünofenotipik belirteçlerinden CD29, CD73, CD166, CD44, CD49e, CD90 için pozitif olduğu, hematolojik kök hücre belirteçlerinden CD34, CD45 ve HLA-DR için negatif olduğu gösterilmiştir.
- 9.AF(n=4) ve FB2(n=6) tipi sub-kültürlerde eksprese olan belirteçlerin kantitatif düzeyi, primer kültür hücreleri(n=15) ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak, sadece CD90 belirtecinde, AF-SSC de anlamlı fark gözlenmiştir. [P0/AFSSC(p<0,05;p:0,008); AF-SSC/FB-SSC(p<0,05;p:0,04); P0/FB-SSC(p>0,05;p:0,46)]. CD90 belirteçinin AF-SSC'de, FB2-SSC ve primer kültür hücrelerine göre daha düşük düzeyde eksprese olduğu gözlenmiştir(ortalama % 31,66).
- 10.AF selektif sub-kültürlerde, "embriyoid body" lere benzer biçimde "sferoid" kolonilerin oluştuğu gözlenmiştir.
- 11.AS kaynaklı MKH immünofenotipi taşıyan hücrelerin, in-vitro koşullarda osteojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyelleri olduğu gösterilmiş ancak adipojenik farklılaşma elde edilememiştir.

Çalışmamızın sonucunda, laboratuvarlarımızda amniotik sıvı kökenli hücrelerden MKH elde etmeye yönelik oluşturulan öncül protokoller ve elde edilen deneyimlerin, gelecek vaadeden pek çok pre-klinik/klinik araştırmaya olanak sağlayabileceği ve klinikte pek çok "çaresiz" hastalıkta, "kök hücre tedavisi(cell therapy) uygulamaları"nın öncüsü olabileceği inancındayız.

SS010 - Unique stem cell profile of amniotic fluid cells determined by expression status of pluripotency markers.

Ezgi Cokakli¹, Ozlem Izci Ay^{1,2}, Murat Cokakli¹, M.Ertan Ay¹, Umit Karakas¹, Huseyin Durukan³, Mehmet Emin Erdal¹.

¹ Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Mersin University

² Department of Stem Cell and Regenerative Medicine, Faculty of Medicine, Mersin University

³ Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Mersin University

Amniotic fluid cells (AFCs) are a heterogenous population having different pools of self-renewing cells, but their stem cell properties are not well characterized. Recently, AFCs have been considered as promising cell sources for regenerative medicine owing to their multipotent nature and effective reprogramming capacity with less immunogenicity. AFCs can more easily and effectively be reprogrammed than terminally differentiated cells to generate induced pluripotent stem cells (iPSCs) by transfectional and chemical strategies. Additionally, many studies have showed that AFCs can be differentiated into many cell types including cardiomyocytes, hepatocytes, renal, and neural-like cells. But stem cell dynamics and differentiation capacity of AFCs into multiple lineages are poorly understood. Moreover, variability in the expression profile of stem cell markers across individual AFC isolates, and relation to clinopathological characteristics and culture time were not identified comprehensively.

In this study, we investigated expression profile of pluripotency markers in AFCs taken from 17 patients, by Real-Time PCR. Additionally, we asked whether gestational and maternal age, culture time or gender could account for expressional changes among AFC cultures. Finally, effect of time as passage number on expression of pluripotency markers was analysed quantitatively.

In contrast to the limited number of previous studies, all of the pluripotency markers (Oct-3/4, Sox-2, Klf-4, c-Myc, c-Kit, Nanog, Dppa3, Dppa5, Fut4, Sall4) were found more or less as expressed in AFCs from different patients. To further examine whether expression levels are correlated to clinopathological properties, quantitative analysis were performed. We have found that Sox-2, Dppa3 and Dppa5 expressions are significantly higher in low gestational ages ($p < 0.05$). Additionally, Sox-2 and Dppa5 have been found as more expressed in younger maternal ages than older ones ($p < 0.05$). When we compare expression levels of pluripotency markers to passage numbers of AFC cultures, a strong correlation was observed between higher expression of c-Kit, Nanog, Sall4, Sox-2 and longer-cultured isolates. When we quantitatively compare expression levels of markers in all passages of same isolate, a significant change for c-Kit, Dppa5 and Sox-2 was found ($p < 0.05$). In a longer-cultured isolate (14 passage), there was a transient increase in expression of pluripotency markers followed by a decrease until last passage. For shorter-cultured isolate (5 passage), a general decrease was detected except for c-Kit. c-Kit expressions were increased with passaging. Taken together, a differential expression profile was found across multiple AFC isolates but there was a uniform pattern for some pluripotency markers.

These results showed that pluripotency markers are expressed in all amniocyte cultures, and gestational and maternal age effect their expression levels. Dppa3, Dppa5 and Sox-2 are more expressed in low maternal ages while increased expression was only detected for Dppa5 and Sox-2 in younger maternal ages. In conclusion, AFCs taken from younger women and/or early during gestation have more potency than older ones. However, stem cell profile of individual AFC cultures is different from each other probably due to heterogeneity of starting cell population but exhibit similar expression changes regardless of their ground profile. We have found that c-Kit positive cells are selectively survived during passaging to a certain extent, so its expression levels were found as increased. Likewise, c-Kit was correlated to culture time among all of isolates. These findings may suggest that c-Kit is critical for AFC survival. Additionally, Dppa-5 and Sox-2 were found as significantly changed during passaging, but their expression levels were decreased, denoting these markers may have a role for proliferation of AFCs rather than survival or stem cell maintenance.

Consequently, our results revealed that AFCs have a unique stem cell profile and gestational, maternal age and expression of individual markers when choosing cells for reprogramming and regenerative medicine applications would be efficient.

SS011 - Dental Pulpa Ve Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerinin Hypericum Perforatum (Sarı Kantaron) Etanol Ekstresi İle Prekondüsyonunda Osteojenik Farklılaşmanın Takip Edilmesi ve Adrenerjik Reseptör Ekspresyonu İle İlişkisinin Araştırılması

Aysegül Mendi¹, Esra Gündüzer²

¹ Gazi Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Temel Bilimler Bölümü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

² Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi

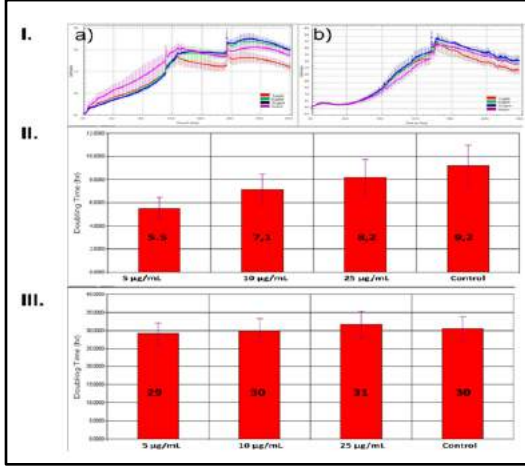
Giriş: Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) klinik uygulamaları öncesinde, in vitro “prekondisyon” stratejileri dikkat çekmekte ve doğal olmaları sebebi ile farmakolojik ajanlar alternatiflerinden ayrılmaktadır. Halk arasında yara iyileştirme ve antidepresan etkisi bilinen Hypericum perforatum (sarı kantaron) bitkisinin, antidepresan etkisini sinir hücrelerinde β -adrenerjik reseptör (ADRB) ekspresyonunu baskılayarak gerçekleştirmektedir. Osteoblastların da eksprese ettiği ADRB'nin baskılanması kemikleşmeyi uyarmaktadır. Bu noktadan yola çıkılarak, nöral krest kökenli dental pulpa MKH (DP-MKH) ile mezenkim kökenli MKH üzerinde (Kİ-MKH) H. perforatum etanol ekstresinin osteojenik farklılaşma üzerine etkisi, ADRB ekspresyonu ile ilişkisi ve tümör nekroz faktör (TNF)- α ile oluşturulan inflamasyonlu ortamdaki yanıtları araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: H. perforatum 'un DP- ve Kİ-MKH canlılığı üzerinde etkin konsantrasyonu (10 μ g/mL), TNF- α 'nın hücre canlılığını stabil tuttuğu ve inflamasyon oluşturduğu konsantrasyon (2 ng/mL) xCELLigence analiz sistemi ile belirlenmiştir.

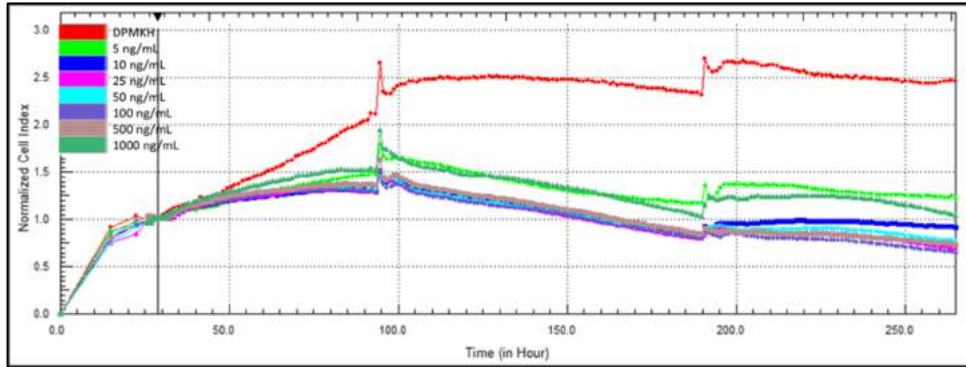
İnflamasyonlu ve inflamasyonsuz ortamda DP-MKH ve Kİ-MKH'ler osteojenik farklılaşmaya yönlendirilmiştir. Farklılaşmanın 4, 7, 14 ve 21. günlerinde kemikleşme işaretlerine (SPARC, BGLAP, RUNX2, SP7, ALPL) ve ADRB 1,2,3'e ait gen ekspresyonları RT-PCR ile belirlenmiştir. Farklılaşma Alizarin Kırmızısı boyaması ile gösterilmiştir.

Bulgular

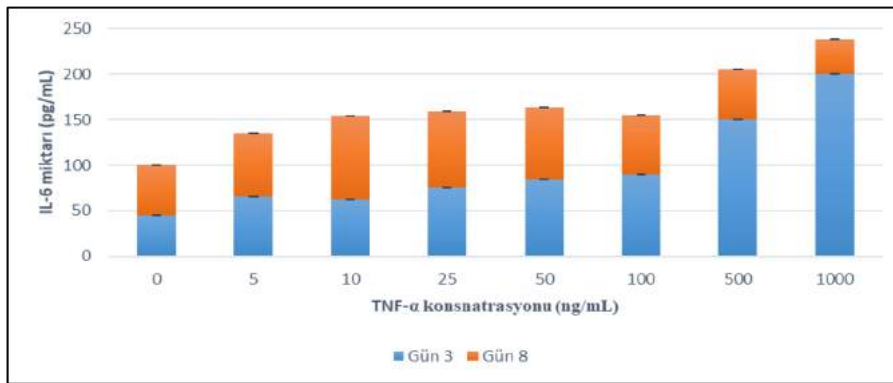
Etkin konsantrasyonların belirlenmesi: H. perforatum etanol ekstresinin DP-MKH ve Kİ-MKH üzerindeki etkin konsantrasyonu xCELLigence DP16 (Roche) ile tespit edilmiştir (**Şekil 1**). İnflamasyon oluşturan TNF- α konsantrasyonu 2 ng/mL olarak tespit edilmiştir (**Şekil 2 ve 3**).



Şekil 1: *H. perforatum* etanol ekstresinin hücreler üzerinde proliferasyon ikiye katlanma süresine etkisi. I.10 µg/mL konsantrasyon devam çalışmalarında kullanılmıştır. I.a. DP-MKH, I.b. KI-MKH, II. DP-MKH ikiye katlanma süresi kontrol grubuna göre düşmüştür. III. KI-MKH ikiye katlanma süresinde değişiklik izlenmemiştir.



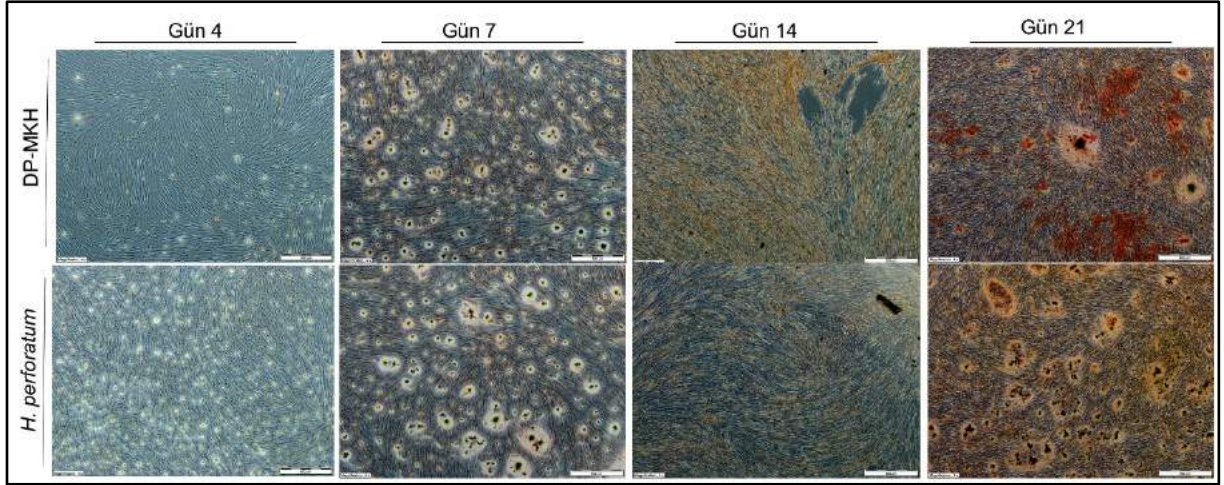
Şekil 2: *TNF-α* farklı konsantrasyonlarının DP-MKH canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 3: DP-MKH'lerin farklı konsantrasyondaki *TNF-α* uyarısına karşılık verdiği IL-6 yanıtı.

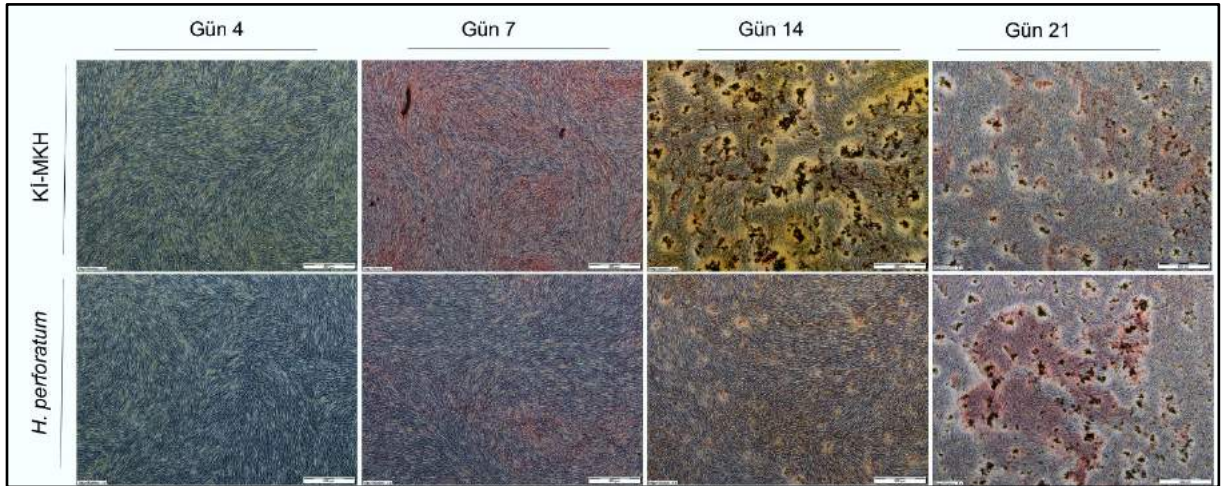
DP-MKH ve Kİ-MKH osteojenik farklılaşmasında *H. perforatum* etkisinin incelenmesi:

DP-MKH osteojenik farklılaşmasında kalsiyum granülleri 7. günden itibaren gözlenmeye başlanmıştır (**Resim 1**). Proliferasyon 14. günden sonra tamamlanmış ve kalsiyum birikimleri 21. günde net olarak gözlenmeye başlamıştır.



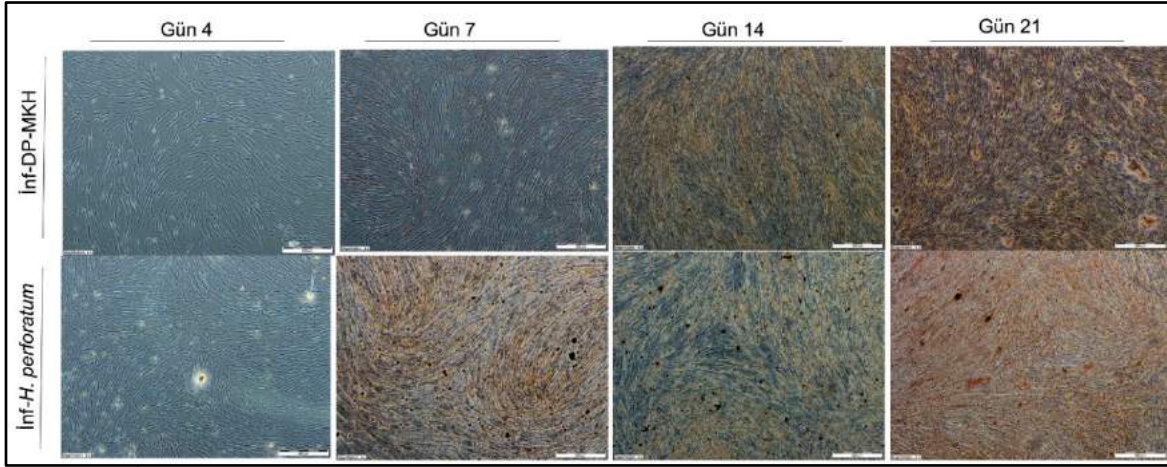
Resim 1: Alizarin Kırmızısı yöntemi ile DP-MKH osteojenik vasat ve *H. perforatum* eklenmiş osteojenik vasatta farklılaşma görüntüleri (4x, Olympos CKX41).

Kİ-MKH'lerde ise, *H. perforatum*'un osteojenik farklılaşmayı daha az indüklediği izlenmiştir (**Resim 2**).



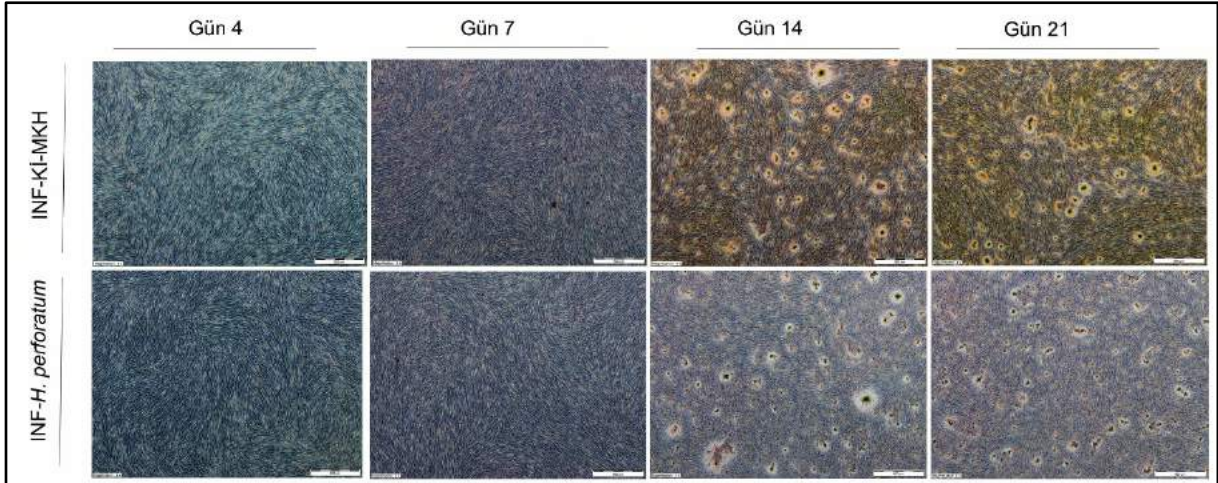
Resim 2: Alizarin Kırmızısı yöntemi ile Kİ-MKH osteojenik vasat ve *H. perforatum* eklenmiş osteojenik vasatta farklılaşma görüntüleri (4x, Olympos CKX41).

2 ng/mL TNF- α ile osteojenik farklılaşmaya yönlendirilen DP-MKH'lerde inflamasyon varlığında kalsiyum granülleri 14. günde izlenmeye başlarken, *H. perforatum* ekstraktı koruyucu etki göstermiş ve 7. günde granüllerin oluştuğu görülmüştür (**Resim 3**).



Resim 3: İnfamasyonlu ortamda, *H. perforatum* varlığında DP-MKH osteojenik farklılaşması. Alizarin Kırmızısı boyama yöntemi. (4x, Olympos CKX41)

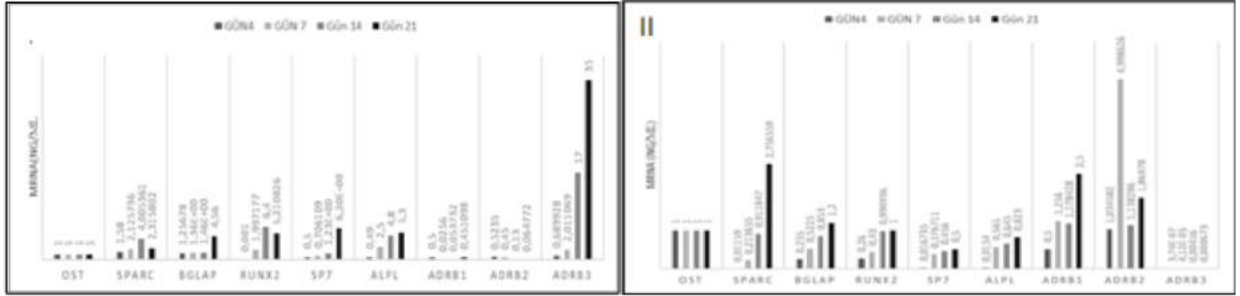
Kİ-MKH'lerde de, inflamasyon varlığında granüller 14. günde oluşmuş, ancak, *H. perforatum* ekstraktının osteojenik farklılaşmayı geriletmediği izlenmiştir (**Resim 4**).



Resim 4: İnfamasyonlu ortamda, *H. perforatum* varlığında Kİ-MKH osteojenik farklılaşması. Alizarin Kırmızısı boyama yöntemi. (4x, Olympos CKX41)

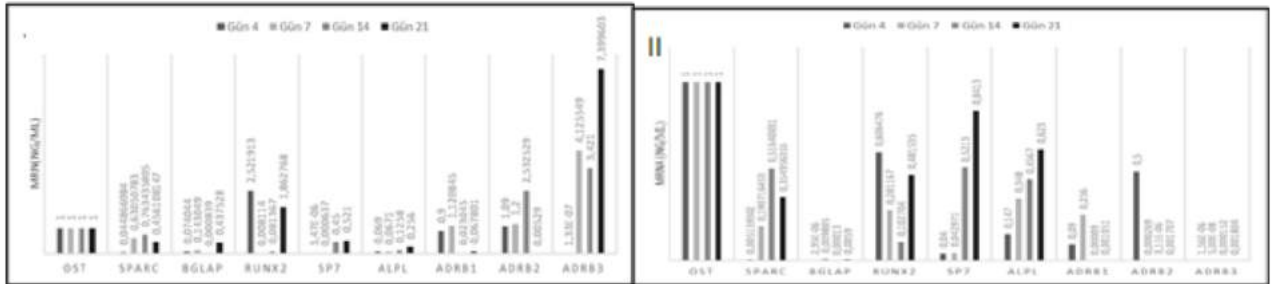
***H. perforatum* ekstraktının ADRB reseptörlerinin ekspresyonuna etkisi:**

DP-MKH ve Kİ-MKH hücre gruplarının *H. perforatum* içeren osteojenik vasatta kemik erken ve geç farklılaşma işaretleri ile ADRB gen seviyeleri taranmıştır (Şekil 4).



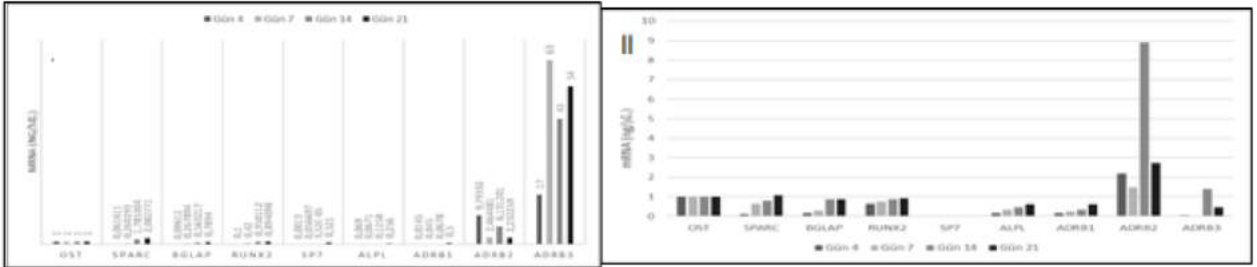
Şekil 4: DP-MKH (I) ve Kİ-MKH (II) mRNA seviyeleri. Normalizasyon ACTB'ye göre gerçekleştirilmiştir. OST: osteojenik vasat; SPARC: osteonektin, BGLAP: osteokalsin, RUNX2; SP7: osterix, ALPL: alkalın fosfataz, ADRB1: adrenerjik reseptör 1, ADRB2: adrenerjik reseptör 2, ADRB3: adrenerjik reseptör 3.

DP-MKH hücre gruplarının TNF- α içeren osteojenik vasatta kemik erken ve geç farklılaşma işaretleri ile adrenerjik reseptör gen seviyeleri taranmıştır (Şekil 6).



Şekil 6: İnflamasyonlu DP-MKH (I) ve *H. perforatum* içeren inflamasyonlu DP-MKH (II) mRNA seviyeleri. Normalizasyon ACTB'ye göre gerçekleştirilmiştir. OST: osteojenik vasat; SPARC: osteonektin, BGLAP: osteokalsin, RUNX2; SP7: osterix, ALPL: alkalın fosfataz, ADRB1: adrenerjik reseptör 1, ADRB2: adrenerjik reseptör 2, ADRB3: adrenerjik reseptör 3.

Kİ-MKH hücre gruplarının TNF- α içeren osteojenik vasatta kemik erken ve geç farklılaşma işaretleri ile adrenerjik reseptör gen seviyeleri taranmıştır (Şekil 8).



Şekil 8: : İnflamasyonlu Kİ-MKH (I) ve *H. perforatum* içeren inflamasyonlu Kİ MKH (II) mRNA seviyeleri. Normalizasyon ACTB'ye göre gerçekleştirilmiştir. OST: osteojenik vasat; SPARC: osteonektin, BGLAP: osteokalsin, RUNX2; SP1: osterix, ALPL: alkalın fosfataz, ADRB1: adrenerjik reseptör 1, ADRB2: adrenerjik reseptör 2, ADRB3: adrenerjik reseptör3

Sonuç: Farklı dokulara ait MKH'ler aynı uyarana farklı yanıtlar verebilmektedir. *H. perforatum*, DP-MKH'ler için beta-bloker hedefli kemik uyarani olabileceği önerilmektedir.

TÜBİTAK 113S448, 216S348, GAZİBAP-03/2017-21 desteğinde gerçekleştirilmiştir.

SS012 - The Effect of Cumulus Cell Conditional Media on Osteogenic Differentiation

Esra Aydemir, Derya Burukçu, Fikrettin Şahin

Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü

Objective;

Stem cells are always a favorite tool in biotechnology because of being capable of renewing themselves and differentiating into many different cell lineages. Human nucleus pulposus cells (hNPCs) derived from human inner core of the vertebral disc have very important stem cell markers. These cells are originated from mesodermal lineage having potential to differentiate into mesodermal lineage such as osteocytes, adipocytes and chondrocytes. However, inducing stem cell differentiation process with existing differentiation media is not always successful *in vitro* conditions. *In vitro* differentiation processes can be improved by conditioned medium belonged to special cell lines.

By the collection of cell secretome (conditioned media) valuable proteins that contain a signal peptide are obtained. These secreted proteins include numerous enzymes, growth factors, cytokines and hormones or other soluble mediators. They are important in the processes of cell growth, differentiation, invasion and angiogenesis by regulating cell-to-cell and cell-to-extracellular matrix interactions. To enhance differentiation capacity of cells via culture of cells with conditioned medium, novel cells are still needed. In this regard the use of cumulus cells (CCs) may offer a unique advantage. Cumulus cells (CC) directly surround oocyte and are necessary for the development of a healthy embryo as they provide the necessary nutrients and energy for oocyte maturation. We hypothesize that rich content of cumulus cells' conditioned medium can modulate recipient cells subsequently in terms of differentiation.

In this study, it is aimed to contribute to the differentiation process of mesodermal originated hNPCs to bone by culturing conditioned medium collected from the CCs.

Materials;

- Primary culture of CCs
- Primary culture of NPs
- Consumables for cell culturing (Both plastics; Serological pipette, flask, petri dish etc.)
- Instruments for cell culturing (Incubator, Laminar flow hood, centrifuge device etc.)
- Chemicals for cell culturing (DMEM F-12, DMEM low, Exosome-depleted FBS, PSA)
- Osteogenic differentiation medium components (Ascorbic Acid, Dexamethasone, Glycerol 3-phosphate)
- Components of the CCs culturing medium
- Collagen type I as a coating material
- Enzymes for primary culture (Hyaluronidase, pronase, collagenase II)
- Alizarin Red S stain

Method;

1. Isolation, characterization and culture of CCs

- Isolation of CCs was performed from the primary tissue surrounding oocyte that is obtained from women who receive IVF treatment at the Yeditepe Hospital. At isolation step, hyaluranidase enzyme treatment was applied. Then, culturing of these cells was maintained on collagen type I coated flasks with special medium. After the isolation, marker of CCs was confirmed by PCR analysis.

2. Isolation, characterization and culture of hNPCs

- Isolation of hNPCs was obtained from patients who have a hernia surgery at Yeditepe Hospital. Culturing of these cells was maintained on DMEM-low medium. After the isolation, characteristic surface markers were checked by flow cytometry analysis.

3. Conditioned media collection from the characterized CCs

- The media (conditioned) in which culture of CCs is maintained was collected to culture hNPCs.

4. Preparation of differentiation medium for hNPCs by CCs' conditioned medium

- Osteogenic differentiation chemicals were added to collected conditioned medium of CCs.

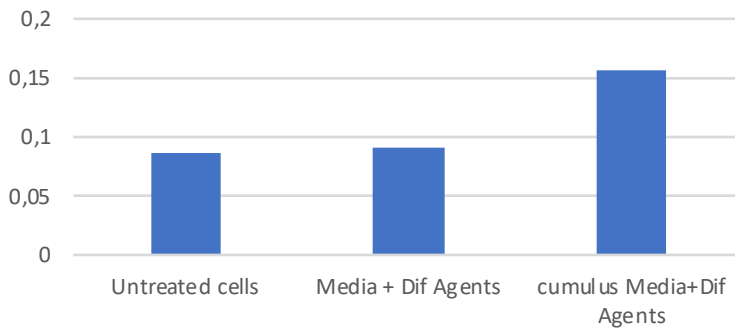
5. Alizarin Red S Staining

- In order to confirm the effect of cumulus cells conditioned medium on osteogenic differentiation of hNPSc, Alizarin Red S staining was performed. Quantification of this staining was done with absorbance reading at 450 nm.

Results: As a result, it was observed that absorbance values of CCs conditioned medium provided osteogenic differentiation was higher.

Following data are belonged to quantified Alizarin Red S staining

Alizarin Red Staining



Conclusion;

Our results indicate that rich content of cumulus cell conditioned media might be an effective media to improve osteogenic differentiation as opposed to the conventional differentiating media used.

SS013 - D-Ala2,D-Leu5,Enkefalin hematopoetik kök hücreleri in vitro oksidatif stres ve endoplasmik retikulum streslen korumaktadır

Aynura MAMMADOVA^{1,2}, Barış ULUM¹, Özgür ÖZYÜNCÜ³, Fatima AERTS KAYA^{1,2}

¹Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Bilimleri AD, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Ankara

³Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Ankara

Hematopoetik kök hücreler (HKH), kendini yenileyebilme ve bütün kan hücrelerine farklılaşabilme özelliklerine sahiptir. Opioidler; G-protein aracılı reseptörlerine bağlanarak hücrelerin sağ kalımı, proliferasyonu, migrasyonu ve kendini yenilemesinde önemli düzenleyici bir rol oynamaktadır. Delta opioid reseptörü (DOR) ve ligandı D-Ala2,D-Leu5,Enkefalin'in (DADLE); hücre tamiri ve iskemik süreç esnasında uyarılan korunma mekanizmalarını teşvik ederek, akciğer, kalp, karaciğer ve böbrek gibi nakil amaçlı kullanılan organların ömrünü uzattığı gösterilmiştir. HKH'lerin yüksek verimli kullanımı için toksik olmayan, hücre canlılığı koruyan, özgün ve kısa süreli hücre ekspansiyon protokollerine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, DADLE'nin çoğaltma, oksidatif ve ER stresi koşullarına maruz bırakılan HKH'lerin üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Göbek Kordon Kanından CD34+ HKH izolasyonu yapılmıştır. Hücre kültürü yapıldıktan sonra HKH'ler, H₂O₂ ile indüklenmiş, oksidatif strese veya Tünikamisin (TM) ve Tapsigargin (TG) ile indüklenmiş endoplasmik retikulum stres (ER stres)'e maruz bırakılmıştır. Hücre canlılığı WST-1 ile, apoptoz oranları Annexin-V/Propidium İyodür ile değerlendirilmiştir.

DADLE; 1) en yüksek test edilen 300 nM dozunda HKH canlılığı herhangi bir şekilde negatif etkilememekte; 2) HKH'leri 500 uM doza kadar uygulanan H₂O₂'dan korumakta; 3) HKH'leri 0,2 ug/mL TM ve 2 nM TG'den korumaktadır. DADLE antagonisti olan Naltrindol 100 uM dozunda HKH'lerin apoptozu artırmaktadır.

Bu çalışmada ilk defa DADLE'nin HKH'ler üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. DADLE; HKH'leri in vitro oksidatif stres ve ER stres indükleyen moleküllerin zararlı etkilerinden korumaktadır. Başka anti-oksidan veya ER stresinden koruyan maddeler ile birlikte, DADLE ileride klinikte uygulanabilir. HKH ekspansiyon protokollerinde DADLE kullanımı, hücrelerin canlılığının korunmasında önemli bir katkıda bulunabilir.

Bu çalışma TÜBİTAK 118S738 ve Hacettepe BAP TYL-2018-17435 projeleri tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hematopoetik Kök Hücre, Oksidatif Stres, ER stres, DADLE

SS014 - RAG2^{-/-} Ağır Kombine İmmün Yetmezliği Hematopoetik Kök Hücre Nakli Ve Gen Tedavi Optimizasyonu

Burcu Pervin¹, Özgür Doğuş Erol¹, Duygu Uçkan Çetinkaya², Gerard Wagemaker², Fatima Aerts Kaya¹

¹Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Bilimleri AD, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Ankara

Amaç: RAG2^{-/-} ağır kombine immün yetmezliği (SCID), nadir kalıtsal bir hastalıktır. RAG2; B ve T hücrelerinin olgunlaşmasında reseptör repertuarının oluşmasından sorumlu olan proteindir. RAG2 hastalar genelde birinci yaşam yılında ağır enfeksiyonlardan dolayı hayatını kaybetmektedirler. Hematopoetik Kök Hücre (HKH)'lerin engraftmanı için, hastanın kemik iliğinin radyasyon ya da kemoterapi ile boşaltılması gerekmektedir. Bazı hastaların genel durumundan dolayı hazırlık rejimine dayanamayıp ölebilirler. Bu çalışmada, RAG2^{-/-} fare modelinde Busulfan (BU)'ın yerine, kök hücre mobilize edici ajan G-CSF'in kullanılması amaçlanmıştır.

Gereç-Yöntem: Kontrol olarak 2 günlük TPO, SCF ve Flt3-ligand ortamında serumsuz HKH ekspansiyon medyumunda kültüre edilen Swiss fare kemik iliği lineaj negatif (Lin^{-/-}) hücreleri ve RAG2 geni taşıyan lentiviral vektörler ile aynı hücre kültürü koşullarında transdüze edilen RAG2^{-/-} Lin^{-/-} hücreleri; 25 mg/kg Busulfan i.p. veya 6 ug/fare/gün, 4 gün boyunca s.c. G-CSF verilen RAG2^{-/-} (her grup n=3) farelere enjekte edilmiştir.

Bulgular: BU hazırlık rejimi alan RAG2^{-/-} farelerindeki CD3, CD19 ve CD45RA oranları 1., 3., ve 6. ayda G-CSF alan farelere göre daha yüksek çıkmışve daha iyi bir engraftman sağlamıştır. Ayrıca RAG2 lentiviral vektör ile transdüze edilen RAG2^{-/-} Lin^{-/-} HKH'lerin nakil edildikten sonra RAG2^{-/-} fare periferik kanında sadece birinci ayda CD3+ hücreler tespit edilebilmiştir. Bu durum; 1) yeterli yüksek lentiviral aktarımının olmadığı; ve/veya 2) transdüze edilen hücrelerin uzun ömürlü engraftman kapasitesini kaybettiğini göstermektedir.

Sonuç: Engraftman için BU hazırlık rejimi G-CSF'e göre daha etkili ve RAG2 lentiviral vektörler ile muamele edilen HKH'lerin uzun ömürlü engraftman potansiyeli negatif olarak etkilenmiştir. Bu çalışma TÜBİTAK BİDEB 2221 no 2017/2 tarafından destek almıştır.

Anahtar Kelimeler: Ağır kombine immün yetmezliği, Hematopoetik Kök Hücre, Gen Tedavi, G-CSF, Busulfan

SS015 - CD19 Pozitif Kanser Türlerine Spesifik Transgenik CAR-T Hücre (ISIKOK-19[®]) İn Vitro Etkinlik Sonuçları

Cihan Taştan¹, Derya Dilek Kançağlı¹, Raife Dilek Turan², Nehir Kızıllısoley³, Begüm Çelik³, Merve Kongur Serin¹, Muhammet Yılandı¹, Bulut Yurtsever¹, Ercüment Ovalı¹

¹Acıbadem Labcell Hücre Laboratuvarı, İstanbul

²Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Medikal Biyoteknoloji, İstanbul

³Yeditepe üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, İstanbul

Amaç: Hematolojik ALL, NHL ve MM kanserlerinde relaps oranı yüksek olmakla birlikte, mevcut tedaviler tam remisyona ulaştırmada kurtarıcı değildir. Temel nedeni, kanser dokusuna karşı mevcut immün hücrelerinin düşük aktiviteli reseptörler tarafından yeterince uyarılamamış olmasıdır. Bu kanser türlerinin bir bölümü CD19 yüzey proteini ürettiğinden teröpatik hedef olarak kullanılabilir. Bu çalışmada, insan T lenfositlerinden CD19 pozitif kanserleri hedef alabilen yüksek afiniteli kimerik antijen reseptörler (CAR) üreten transgenik CAR-T hücrelerinin (ISIKOK-19[®]) üretilmesi ve pre-klinik modelde yüksek etkinlik seviyesinde sitotoksik sonuçlar elde edilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: CD19 spesifik CAR (anti-CD19 scFv h(CD28-CD3ζ)-EGFRt) kodlayan lentiviral vektör dizayn edilerek Creative Biolabs'a sentezletti. Genetik modifikasyon amacıyla kullanılacak olan CAR kodlayan plazmid ile lentivirüs paketleme proteinleri üretecek zarf (CMV_VSVG) ve paketleme (psPAX2) vektörleri çoğaltılmaları için DNA'yı alabilen ve transforme olabilen *E. coli* DH5α suşu içine transforme edilip ve plazmidler çoğaltılmıştır. Maxiprep plazmid izolasyon kiti kullanılarak endotoksinsiz plazmid üretimi gerçekleştirilmiş ve üretilen plazmidin kalite kontrol testleri (genomik/RNA/protein kontaminasyonu) yapılmıştır. Çoğaltılan ve izole edilen zarf, paketleme ve CAR plazmidleri FuGene transfeksiyon solüsyonu ile muamele edildikten sonra HEK293T hücrelerine verilerek hücre içinde paketlenmesi sağlanmıştır [Komplet besiyeri: %10 FBS ve %1 pen/strep, Texmacs medyum]. Lentivirüs miktar tayini (titer) ve diğer kalite kontrol testlerinin tamamlanmasını takiben virüsler -80°C'de saklanmıştır.

Fikol üzerine yayma işlemi ile üretilen periferik mononükleer hücre izolasyonunu takiben, anti-CD4 ve anti-CD8 mikro-bilyalar ile CD4+/CD8+ T hücreleri izole edildi. Anti-CD3/anti-CD28 mikro-bilyalar kullanılarak T hücre aktivasyonu sağlanmış ve üretilen virüslerle transdüksiyon süreci başlatılmıştır. Transdükte olmuş aktif T hücrelerinin 11 günlük kültür süreçleri komplet T hücre besiyerinde (50IU/ml IL-2, 10ng/ml IL-7, 5ng/ml IL-15, %3 Human AB Serum ve %1 pen/strep, Texmacs medyum) tamamlandı. CAR ekspresyon düzeyi, akım sitometri analizleri ile anti-EGFR-A488 antikoru kullanılarak tespit edilmiştir. Elde edilen CAR-T hücreleri ile pre-klinik *in vitro* çalışmaları başlatılmıştır. Preklinik *in vitro* etkinlik çalışmaları, hücre yüzeyinde CD19 ekspresyon eden RAJI hücreleri (CCL-86, ATCC) ile CAR-T hücrelerinin iki haftaya kadar költürünü (Efektör:Hedef; 1:1,5:1) takiben, 7AAD ve anti-CD19-PE ile sitotoksik etkinlik ve anti-CD25-APC ile CAR-T aktivasyonu değerlendirildi.

Bulgular: En az üç farklı sağlıklı donörden üretilen CAR-T hücrelerinde CAR ekspresyonu %20-75 oranında elde edilmiştir (Figür A). Akan hücre ölçer ile yapılan farklı CAR T:RAJI hücre kokültür biyolojik ve teknik üçlü testlerde 24.saatte normal T hücrelerinde %10-20 CD25 upregulasyon gözlemlenirken CAR-T hücrelerinde >%90 CD25 ekspresyonu belirlenmiştir (Figür B). 2. hafta sonunda tümör hücrelerinin >%99'unu öldürülebildiği, özellikle 5:1 kokültür ortamında, tespit edilmiştir. Kontrol T hücre ile RAJI kokültüründe kanserli hücre oranı >%90 ile baskın popülasyon haline gelmiştir (Figür C).

Sonuç: Optimize edilen protokolümüz ile *in vitro* CAR-T hücrelerinin CD19 kodlayan RAJI hücrelerine karşı yüksek sitotoksik etkinliği gösterildi. CAR-T hücrelerinin farklı dozlarla RAJI hücreleri ile ko-kültür testlerinde yüksek CAR-T dozunda (5:1) en iyi sitotoksik etkinlik gösterdiği tespit edildi. Bu durum, RAJI tümör modeli oluşturulacak SCID farelerde iki farklı dozda CAR-T hücre uygulanması gerektiği sonucu öngörmektedir. *In vitro* çalışmalarının tamamlanması ile birlikte SCID farelerde Luciferaz biyoluminesan ışması yapabilen RAJI hücreleri ile *in vivo* çalışmalar başlatılmıştır.

Anahtar kelimeler: Kimerik Antijen Reseptörü, ALL, CAR-T, İmmünoterapi

SS016 - CD19 Spesifik CAR T Hücreler (ISIKOK 19) – Acıbadem Labcell Preklinik *in vivo* Çalışma Verileri

Derya Dilek Kancağ¹, Cihan Taştan¹, Raife Dilek Turan², Muhammet Yılandı¹, Utku Seyis¹, Samed Özer³, Selin Mert⁴, Nehir Kızıllısoley⁵, Begüm Çelik⁵,ERCÜMENT OVALI¹

¹Acıbadem Labcell Hücre Laboratuvarı, İstanbul

²Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Medikal Biyoteknoloji, İstanbul

³Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi, İstanbul

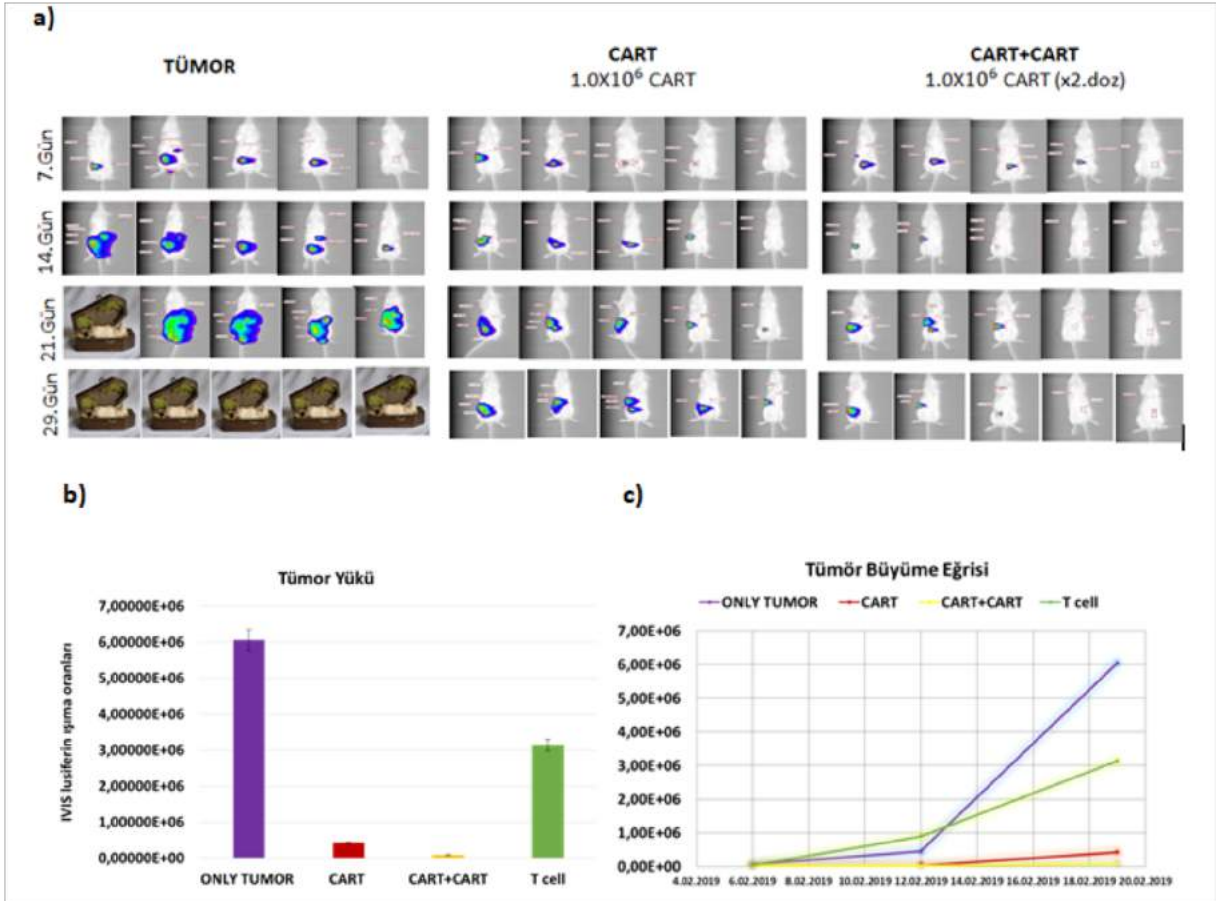
⁴Boğaziçi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Merkezi, İstanbul

⁵Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, İstanbul

Amaç: Moleküler biyoloji ve genetik modifikasyon olanaklarının gelişmesi ve ucuzlaması yıllardır kemoterapi ile sınırlı olan kanser tedavilerinde bir çağın kapanıp yeni bir çağın açılmasına sebep olmuştur. Kemoterapide kullanılan ilaçlar ile sadece kanserli hücrelerin değil; vücuttaki sağlıklı hücrelerin de zarar görmesinden dolayı kanserli hastaya özel kişisel tedavi teknikleri geliştirmek üzere yoğun çaba sarf edilmektedir. Bu girişimlerden en umut verici sonuçlardan biri genetiği değiştirilmiş CAR-T Hücre tedavisidir. Bu amaçla çalışmamızda lentiviral vektörler kullanılarak FMC63-CD8-CD28-CD3z-EGFRt sekansına sahip CD19 antijenine spesifik antikor başlığı içeren kimerik antijen reseptör eksprese eden T hücreler üretilmiş ve *in vitro* analizleri tamamlanarak NOD SCID fare gruplarında preklinik *in vivo* çalışmalar başarıyla tamamlanmıştır (ACU-DEHAM).

Gereç ve Yöntem: Raji hücreleri (Burkitt's lymphoma), fLusiferaz-mCherry plazmidi (Dr. Tuğba Bağcı Önder, Koç Üniversitesi) kullanılarak lentiviral yolla işaretlenmiş ve fLusiferaz-mCherry ekspresyonları akım sitometre ile teyit edilmiştir (>%90). NOD SCID farelere 500.000 fLusiferaz-mCherry pozitif Raji hücresi tümör modeli oluşturmak amacıyla intraperitoneal (i.p.) yolla enjekte edilmiştir. Çalışma; tümör + serum fizyolojik grubu (n=5, i.p.), tümör + T Hücre grubu (n=5, 3.gün, i.p.), tümör + CAR T Hücre grubu (n=5, 3.gün, i.p.) ve tümör + CAR T + CAR T Hücre grubu (n=5; 3. ve 10.gün, i.p.) olarak tanımlanmıştır. Tümör gelişimi IVIS-Invivo (Caliper Lumina 3, Boğaziçi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Merkezi) görüntüleme sistemiyle D-lusiferin enjeksiyonu sonrası biyoluminesan görüntüleme ile tespit edilmiştir. CAR T hücreleri, 3. gün gruplarda 1 milyon CD19 + CAR T/450 ul olacak şekilde tek doz veya bir hafta arayla iki doz şeklinde enjekte edilmiştir. T hücreleri eşit hücre sayısı ile uygulanmış ve tümör grubuna eşit hacimde serum fizyolojik verilmiştir.

Bulgular: Tümör grubuna kıyasla düşük veya yüksek doz CAR-T hücre uygulaması tümör yükünü azaltmıştır (Şekil 1a; >%90). Tümör yükü tümör grubuna kıyasla düşük doz CAR-T tedavisi ile 15 kat, yüksek doz CAR-T tedavisi ile 75 kat azalmıştır. Kontrol T hücre grubundaki tümör yükünün (%50) CAR-T hücre gruplarına kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 1b,1c; düşük doz ile %6,7, yüksek doz ile %1,3). Sağkalım analizlerinde tümör grubunda toplam sağkalım ortalama 24 gün, T hücre grubunda ortalama 27 gündür. CAR-T tedavi grubunda ölüm gözlemlenmemiştir (sağkalım>30 gün).



a) Farklı günlerde hastalık progresyonunu gösteren biyoluminesan görüntüleme sonuçları b) 21.gün tümör yükü sonuçları c) Zamana bağlı tümör yükü değişim eğrisi

Sonuç: CAR-T hücre gruplarında tümör yükünde azalma ve sağkalım avantajı görülmüştür. Ayrıca iki doz olarak uygulanan CAR-T hücre tedavisi ile doza bağlı etkinlik artışı gösterilmiştir. Bu sonuçlarla Klinik Araştırmalar Etik Kurul başvurusu için gerekli olan prelinik denemeler tamamlanmış olup, klinik çalışma süreci planlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Raji Hücreleri, CD19, CAR-T, Genetik Modifikasyon, NOD SCID fare

SS017 -Griscelli Tip 2 Mezenkimal Kök Hücrelerden Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Geliştirilmesi ve *in vitro* Hematopoetik Farklılaşması

Gülen GÜNEY-ESKEN¹, Özgür Doğuş EROL¹, Elif BİLGİÇ², Petek KORKUSUZ², Gülben Gürhan SEVİNÇ³, Tamer ÖNDER³, Duygu UÇKAN-ÇETİNKAYA⁴, Fatima AERTS-KAYA¹

¹Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Bilimleri AD, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD, Ankara

³Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi, İstanbul

⁴Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Ankara

Amaç: Griscelli Sendromu tip 2 (GS-2) *RAB27A* geninde mutasyon nedeniyle saçlarda hipopigmentasyon ve tekrarlayan enfeksiyonlar ile kendini gösteren nadir, kalıtsal immün yetmezliği hastalığıdır. Hematopoetik Kök hücre (HKH) nâkli bu hastalık için tek küratif tedavi yöntemidir. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler (uPKH); Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc (OSKM) transkripsiyon faktörleri ile yeniden programlanmış, pluripotent genleri ifade eden, sonsuz çoğalabilme ve üç germ yaprağına farklılaşma potansiyeline sahip olan hücrelerdir. GS-2 patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması ve yeni tedavi yöntemlerini geliştirebilmek için *in vitro* bir GS-2 modeline ihtiyacı vardır. Bu çalışmada, GS-2 hastalardan elde edilen Mezenkimal Kök Hücre (MKH)'lerden bir GS-2 uPKH modeli geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: GS-2 MKH'lerin, bisistonik O2S ve K2M veya polisistonik OSKM plasmit taşıyan lentiviral vektörler ile transdüksyonları yapılmıştır. Geliştirilen uPKH'lerin detaylı karakterizasyonu ve *in vitro* hematopoetik farklılaşmaları yapılmıştır.

Bulgular: GS-2 uPKH'lerde yüksek TRA-1-60, TRA-1-81 ve SSEA4 ifadeleri gösterilmiştir. qRT-PCR ile *SOX2*, *NANOG* ve *OCT4* pluripotent gen ifadeleri saptanmıştır. Yeni nesil sekanslama yöntemi ile uPKH klonlarında *RAB27A* mutasyonu doğrulanmıştır. uPKH'lerin karyotip analizlerinde kromozomal anomali saptanmamıştır. *In vivo* teratoma deneyleri ile 3 germ yaprağına farklılaşma kapasiteleri gösterilmiştir. uPKH'ler; SCF, TPO, Flt-3 ligand (STF), BMP4, ATRA ve deksametazon ile 8-14 gün arası Op9 stromal hücreler üzerinde ko-kültür edilip hematopoetik farklılaşmaları yapılmıştır. Farklılaştırılan Hematopoetik Kök Hücre (HKH)'ler STF içeren ekspansiyon medyumunu içerisinde 8 gün daha kültür edilmiştir. Ko-kültür sonrasında CD43, CD45 ve CD34 oranları %2 civarında ölçülmüştür. Ekspansiyon sonrasında CD43+ ve CD34+ hücrelerin oranı %50'nin üzerine çıkarılmıştır.

Sonuç: GS-2 hastalığından geliştirilmiş uPKH modelinden başarılı olarak hematopoetik farklılaşma yapılmıştır.

Bu proje TÜBİTAK 214S071 tarafından desteklenmiştir.

Anahtar kelimeler: Griscelli Sendromu Tip 2, uyarılmış pluripotent kök hücreler, hematopoetik farklılaşma

SS018 –Allojenik Segmental Menisküs Transplantasyonu; Histolojik İyileşme Sonuçlarının Poliüretan Skafold Uygulaması ile Karşılaştırılması

Yavuz Kocabey¹, Gökhan Polat², Serap Uslu³, Gülçin Başdemir⁴, Fatma Eyüpoğlu Ünüvar⁵,
Ercüment Ovalı⁵, Ömer Faruk Taşer⁶

¹Kocaeli Acıbadem Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği

²İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

³İstanbul Medeniyet Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

⁴Okan Üniversitesi Patoloji Bilim Dalı

⁵Acıbadem Labcell Laboratuvarları

⁶Fulya Acıbadem Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği

Amaç: Tavşanlar üzerinde yaptığımız çalışmamızda; menisküsün tamir edilemediği segmenter kayıplarında, allojenik segmental medial menisküs transplantasyonu ile menisküs defektinin rekonstrüksiyonu ile elde edilen histolojik iyileşme sonuçlarının, polüretan menisküs skafoldlarıyla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Etik kurul alınması sonrasında başlanılan çalışmamızda, 12 Yeni Zelandalı tavşanı her iki dizini operasyona alınmıştır. Tavşanlar bilgisayar sistemi ile randomize edilerek, 1 dizlerine medial menisküs orta 1/3'lük kısmı eksize edilerek poliüretan menisküs skafoldu uygulanmış, diğer dizine ise daha önceden sakrifiye edilen tavşanlardan temin edilerek liyofilize ve deselülarize edilerek allojenik hale getirilmiş medial menisküs allogrefti uygulanmıştır. Tavşanlar 3 aylık postoperative takip sonrasında sakrifiye edilerek menisküs dokuları makroskopik ve histopatolojik iyileşme açısından değerlendirilmiştir.

Bulgular: Postoperatif dönemde 1 tavşan kaybı yaşanmıştır. Sakrifikasyon sonrasında, yapılan makroskopik incelemede; allojenik menisküs grubunda 1 menisküste iyileşme olmadığı, skafold grubunda ise 3 menisküste iyileşme olmadığı tespit edildi. Elde edilen tamir dokularında toluidine blue, CD31, Masson-trichrome boyaları ile immunhistokimyasal boyama yapılarak, hücre sayımı ile histolojik iyileşme değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde skafold uygulamasında yabancı cisim reaksiyonunun daha fazla olduğu ($p<0.01$), ekstraselüler matriks elemanları açısından boyanmanın allojenik menisküs grubunda daha fazla olduğu ($p<0.05$) tespit edilmiştir. Yeni damar oluşumu açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır. ($p>0.05$). Çalışmamızda literatürde daha önce rastlamadığımız bir bulguya da rastlanmıştır. Transplante edilen dokularda sınırlı miktarda fokal ossifiye alanlar görülmüştür. Bu durumun deney hayvanının özelliklerine bağlı geliştiği düşünülmüştür.

Tartışma: Segmenter menisküs kayıpları sonrasında, menisküs fonksiyonu tamamen kaybolmakta ve eklem dejeneratif artrit gelişebilmektedir. Bu açıdan literatürde tarif edilen ve halen kullanılmakta olan poliüretan menisküs skafoldları, uygulama sonrası yetersiz iyileşme, yabancı cisim reaksiyonu, resorbsiyon, mekanik özelliklerin kaybı gibi sorunları beraberinde getirmektedir. Total menisküs transplantasyonu literatürde, kemik blolu ya da bloksuz olarak uygulanabilen bir tedavidir. Buna rağmen transplante edilecek alıcı eklem ile koronal ve sagittal planda tam bir uyum sağlanması gerekli olduğu için, ihtiyacı olan hastalarda yurtdışındaki sınırlı sayıda merkezden birkaç aylık bekleme süreleri temin edilebilmektedir.

Bununla birlikte 20.000 dolara varan maliyetleri nedeniyle kullanımı oldukça sınırlı olmaktadır. Literatürde ilk defa bizim tarafımızdan tanımlanan segmenter allojenik menisküs transplantasyonu; bu sorunların çözümü ile birlikte, menisküs dokusunun ve fonksiyonunun korunmasını sağlayabilecek, total menisküs transplantasyonuna göre daha ucuz ve uygulanabilir alternatifi bir tedavi olabilir.

Sonuç:Yapmış olduğumuz hayvan çalışmasında, segmenter menisküs defektlerinin rekonstrüksiyonunda parsiyel allojenik menisküs transplantasyonu ile poliüretan scaffoldlara göre daha iyi makroskopik ve histolojik iyileşme sonuçları elde ettik. İleride yapılacak klinik çalışmalar ile, segmental menisküs kayıplarında allojenik menisküs transplantasyonu tedavisinin uygulanabileceği kanısındayız.

Ek Bilgi: Bilim Kuruluna Not: Çalışmamız, Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği ve Türkiye Spor Yaralanmaları, Artroskopi ve Diz Cerrahisi Derneği tarafından tarafından desteklenmiştir.

SS019 - Glioblastom Sferoidleri ve Organoidleri

Emine Tural¹, Aleksander Skardal², Hemamylammal Sivakumar²

¹Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Denizli

²Wake Forest School of Medicine, Wake Forest Institute for Regenerative Medicine, Winston-Salem

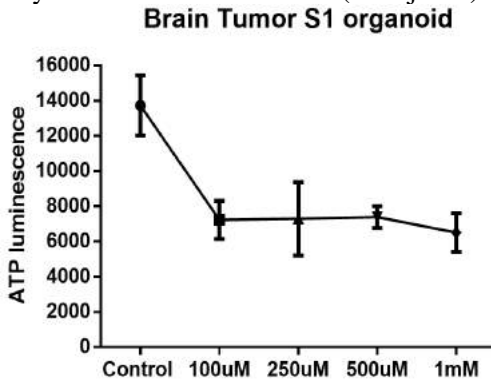
Genel bilgi ve amaç: 3 boyutlu (3D) hücre kültürlerinin in vivo ortamı 2 boyutlu (2D) kültürlerden daha iyi taklit ettiği düşünülmektedir (1). Çok hücreli yapılanma, hücrelerin birbirleri ile ve ekstrasellüler matris (ECM) ile etkileşime girmesine izin verir. Sferoidler ve organoidler üç boyutlu (3D) yapılarıyla doğal fizyolojik sistemlere daha yakın oluşumlardır. Özellikle kanser ve kök hücre araştırmalarında sferoidler ve organoidler büyük öneme sahiptir (1,2). Şimdiye kadar beyin, böbrek, pankreas, mide, karaciğer, akciğer, mesane, vb organoidleri yapılmış ve birçok biyomedikal uygulamada kullanım alanı bulmuştur (3).

Gliomalar erişkinlerde en sık görülen malign beyin tümörüdür (4). Gliomalar arasında en sık görülen glioblastomdur (astrocitom IV. Derece) ve tüm primer beyin tümörlerinin yaklaşık % 27'sini oluşturur. Tümör gelişimini önlemenin net bir yolu yoktur. Primer tedavi cerrahidir ve daha sonrasında kemoterapi ve radyoterapi uygulanmaktadır (5,6). Temozolomid adlı alkilleyici antineoplastik ilaç kemoterapinin bir parçası olarak sıkça kullanılmaktadır (7-9).

Bu çalışmadaki amacımız hastaya ait glioblastom dokusundan elde ettiğimiz hücrelerden sferoid ve organoid modeli oluşturmaktır. Hemen ardından glioblastom tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlardan temozolomid ile hastanın kendi kültüründe sitotoksikite çalışıp en etkili minimal dozu bulup hastanın kemoterapi protokolünü oluşturmaktır.

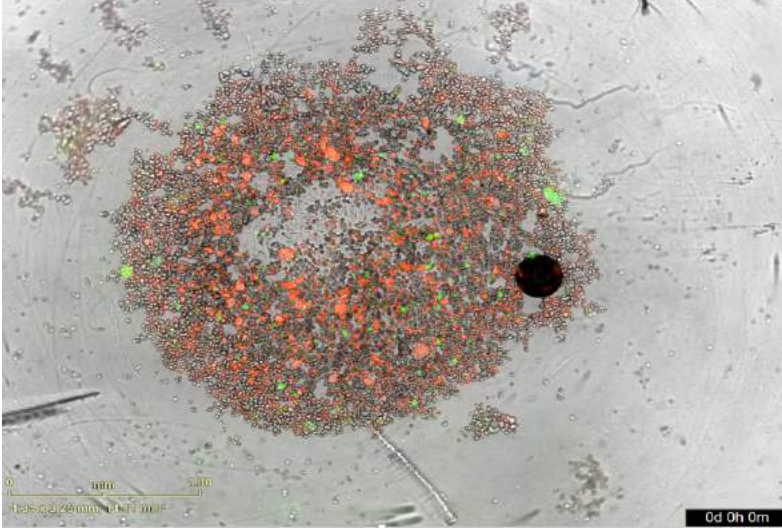
Gereç ve yöntem: Glioblastom hastasının cerrahisi yapıldı, hastadan alınan kanser dokusu medium içinde laboratuvarımıza getirildi. Hastanın glioblastom dokusu mekanik olarak küçük parçalara ayrıldı ve enzimatik olarak (kollajenaz) işlem gördükten sonra santrifüj edildi. Elde edilen

turuldu. Ardından temozolomid farklı dozlarda is ölçümlerine bakıldı.



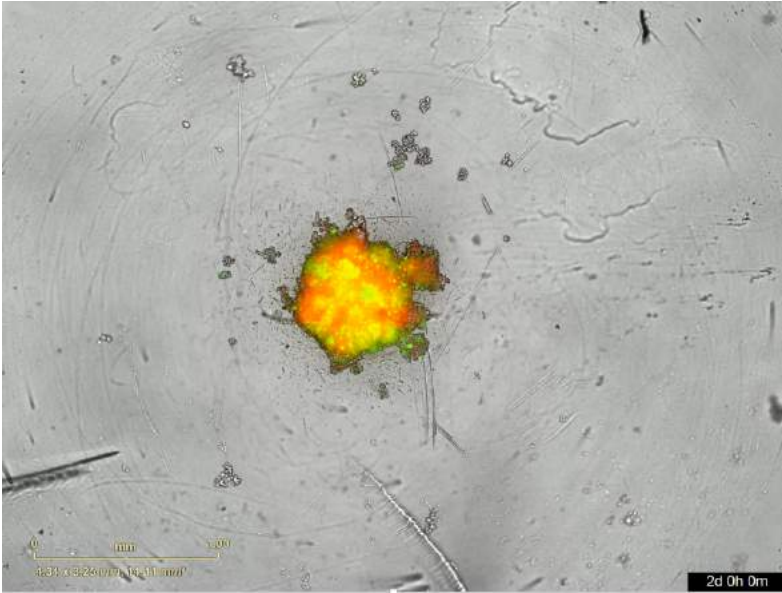
Şekil 1. Temozolomid'in Doza Bağlı Etkisi

Bu çalışmada hastadan tümör dokusu aldık ve temozolomid uygulamak için tümör organoidi yaptık. Farklı dozlarda temozolomid kullandık. Her bir doz için ATP lüminesans ölçümlerine baktık. Temozolomid adlı antineoplastik ilacın yüz mikromol(100Um) konsantrasyonunda hücrelerin canlılıklarını kaybettiklerini gösterdik.



Şekil 2. Ekim sonrası 0. gün sferoid.

DIO boyası astrositler (yeşil renk) ve DII boyası kanser hücreleri (kırmızı renk) için kullanılmıştır.



Şekil 3. Ekim sonrası 2. gün sferoid

Tartışma

Ogawa ve arkadaşları, malignitelerin temel yönlerini özetleyen insan kanseri fenotiplerini test etmek için organoidlerin bir platform olarak kullanılabilme potansiyelini göstermişlerdir (10).

Xu ve arkadaşları, organoidlerin insan kanserleri için mükemmel bir prelinik modeli temsil ettiğini ve temel kanser araştırmalarından klinik pratiğe geçişte çok önemli bir yerleri olduğunu söylemişlerdir (3).

Silva ve arkadaşları kök hücre bazlı bir organoid yaklaşımı ile GBM infiltrasyonunun modellenmesi ve miktarının belirlenmesi için bir temel oluşturmuşlar ve anti glioblastom stratejilerinin tanımlanması için kullanılabileceğini göstermişlerdir (4).

Hubert ve arkadaşları yaptıkları 3D glioblastom modellerinin çeşitli kök hücre ve kök hücre kaynaklı olmayan glioblastom hücrelerinde, mikro-çevresel etkilerin ve kanser kök hücresi biyolojisinin yeni yönlerini keşfetmek için yeni bir ex vivo model olduğunu belirtmişlerdir (11).

Sonuç

Geleneksel iki boyutlu hücre kültürü yöntemi, yıllardır kanser araştırması ve ilaç çalışmalarının temel taşı olmuştur. Birçok bilimsel buluşun ayrılmaz bir parçası olmasına karşın organların biyolojisini anlamak için sınırlı bir teknoloji sunar (12). İki boyutlu hücre kültürleriyle çalışmanın önemli dezavantajı, canlı içindeki hücrelerin diğer hücreler ve ECM ile çevrili üç boyutlu ortamda bulunduğunu dikkate almamasıdır (13). Bu nedenle, bu tür ilaç çalışmalarından elde edilen sonuçlar çoğu zaman doğru ve öngörücü olmayabilir. Tipik olarak, iki boyutlu hücre kültürlerinde etkili olduğu bulunan ilaçlar, insan klinik denemelerinden önce hayvan çalışmalarıyla devam eder (14). Maalesef, bu tür ilaçların % 90'ından fazlası klinik fazda başarısız olmaktadır. Son yıllarda yeni ilaç keşif çalışmaları ve doku mühendisliği üç boyutlu hücre kültürü sistemlerine ilgi duymaya başlamıştır. Üç boyutlu hücre kültürü araştırma modelleri, hücre-hücre etkileşimlerini, hücre-ECM etkileşimlerini geliştirdiği için ilaç araştırmalarında daha doğru ve güvenilir veriler sağlamak ve hızla iki boyutlu hücre kültür sistemleri ile hayvan modelleri arasında köprü haline gelmektedir (15).

Bu çalışmada hastanın glioblastom dokusundan bir hafta içinde 3D kültürü yapılmıştır. Ardından temozolomid adlı antineoplastik ilacının farklı dozları bu kültürde denenip en etkili minimal ilaç dozu tespit edilmiş ve hastanın tedavisi için kişiye özel kemoterapi protokolü oluşturulması sağlanmıştır. Kişinin kendi tümör dokusuna özel sitotoksik ilaç dozu ile tedaviye bir an önce başlamak sağ kalım süresi çok kısa olan bu hastalarda hayati öneme sahiptir. Bu da karşımıza önemli bir avantaj olarak çıkmaktadır.

Kaynaklar

1. Ching-Te Kuo, Jong-Yueh Wang, Yu-Fen Lin, Andrew M. Wo, Benjamin P. C. Chen, Hsinyu Lee. Three-dimensional spheroid culture targeting versatile tissue bioassays using a PDMS-based hanging drop array. *Scientific Reports*. 2017;4363
2. Marta Kapalczynska, Tomasz Kolenda, Weronika Przybyła, Maria Zajączkowska, Anna Teresiak, Violetta Filas, ve ark. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*. 2018;14, 4: 910–919
3. Hanxiao Xu, Xiaodong Lyu, Ming Yi, Weiheng Zhao, Yongping Song, Kongming Wu. Organoid technology and applications in cancer research. *J Hematol Oncol*. 2018;11: 116.
4. Barbara da Silva, Ryan K. Mathew, Euan S. Polson, Jennifer Williams, Heiko Wurdak. Spontaneous Glioblastoma Spheroid Infiltration of Early-Stage Cerebral Organoids Models Brain Tumor Invasion. *SLAS Discovery*. 2018;23(8): 862-868
5. Mary Elizabeth Davis. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs*. 2016;20(5): S2–S8.
6. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, ve ark. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(10):4009-14
7. Chooi Yeng Lee. Strategies of temozolomide in future glioblastoma treatment. *Onco Targets Ther*. 2017;10: 265–270
8. Mannas JP, Lightner DD, Debrates SR, Pittman T, Villano JL. Long-term treatment with temozolomide in malignant glioma. *J Clin Neurosci*. 2014;21(1):121-3.
9. Oshiro S, Tsugu H, Komatsu F, Ohmura T, Ohta M, Sakamoto S ve ark. Efficacy of Temozolomide Treatment in Patients with High-grade Glioma. *Anticancer Res*. 2009;29(3):911-7.
10. Junko Ogawa, Gerald M. Pao, Maxim N. Shokhirev, Inder M. Verma. Glioblastoma Model Using Human Cerebral Organoids. *Cell Rep*. 2018;23(4):1220-1229
11. Hubert CG, Rivera M, Spangler LC, Wu Q, Mack SC, Prager BC ve ark. A Three-Dimensional Organoid Culture System Derived from Human Glioblastoma Recapitulates the Hypoxic Gradients and Cancer Stem Cell Heterogeneity of Tumors Found In Vivo. *Cancer Res*. 2016;76(8):2465-77.
12. Xu H., Lyu X., Yi M., Zhao W. Song Y. & Wu, K. Organoid technology and applications in cancer research. *Journal of hematology & oncology*. 2018;11(1):116.
13. Duval, K., Grover, H., Han, L. H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*. 2017;32(4): 266–277.
14. Fang, Y., Eglén, R. M. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D*. 2017;22(5), 456–472.
15. Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*, 2014;12(4), 207–218.

SS020 - İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Kaynaklı Kornea Organoidleri

Nevin Ersoy¹, Soheil Akbari², Emine Kahraman³, Sinan Güven⁴, Canan Aslı Utine⁵, Esra Erdal⁴,
Hüsni Alper Bağrıyanık⁶

¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi

³İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, İzmir, Türkiye; Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü

⁴İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, İzmir, Türkiye; Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü, İzmir, Türkiye; Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,

⁵İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, İzmir, Türkiye; Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü, İzmir, Türkiye; Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

⁶İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, İzmir, Türkiye; Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü, İzmir, Türkiye; Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D.

Amaç: Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünyada yaklaşık 8 milyon insan kornea kaynaklı sebeplerle körlük sınırındadır. Bu hastalarda en sık kullanılan tedavi yöntemi kadavradan alınan donör korneasının allogenetik naklidir. Ancak nakil için uygun kornea bulmak zordur ve nakil sonrasında immünolojik red reaksiyonu ile greft kaybı mümkündür. Diğer bir alternatif olan yapay kornealar ise ameliyat sonrası komplikasyonları nedeniyle günümüzde kornea naklinin yerini alamamıştır. Günümüz teknolojilerinde, kişinin kendi deri fibroblast hücresinden embriyonik kök hücre benzeri indüklenmiş pluripotent kök hücre (İPKH) elde etmek ve bu hücrelerden in vitro koşullarda farklılaştırma protokolleri kullanarak vücudumuzdaki birçok hücre tipini üretmek mümkün olmuştur. Dolayısıyla hücresel tedaviler alanında çığır açan bir buluş ile kişiye özel tedavi amaçlı kornea üretmek mümkün hale gelmiştir. Son yıllarda geliştirilen organoid modellerinde, hücrelerin üç boyutlu (3B) ortamlarda üretilerek, kaynak aldığı organa benzeyen organ parçacıklarını oluşturmasını sağlamıştır. Bu çalışmada İPKH kaynaklı kornea organoid modellerini geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç-Yöntem: İPKH'lerden in vitro koşullarda 3B kornea organoidi oluşturmak için embriyogenez sürecini taklit ederek sırasıyla nöral farklılaşma, retinal ve korneal farklılaşma gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Oluşan organoid yapıları ultrastrüktürel olarak elektron mikroskopunda ve farklılaşma verimliliği her basamağa özgün Pax6, p63(nöroektodermal), Sox10, alpha-crystallin(retinal), Keratin3/12, Kollajen I, KollajenIV(Kornea) belirteçler ile analiz edilmiştir.

Sonuç: İPKH kaynaklı kornea organoidleri in vitro ortamda geliştirilmiş olup geliştirilen yapıların kornea hasarı ve/veya kornea hastalıklarında kişiselleştirilmiş tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Çalışmanın bir diğer amacı da oluşturulan kornea organoidlerinin kornea yapısını taklit eden hidrojel üzerinde mikroakışkan platforma yerleştirilip çoğalması hedeflenmektedir. Kullanılacak olan dinamik platformun, korneanın gelişimi sırasında gerek duyacağı doğala benzer bir yapıyı ve fibrillerin düzgün dizilimini tetikleyebilecek yüzey gerilimini sağlaması öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: İPKH, kornea, organoid

SS021 - Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre ve Makrofaj Etkileşimleri

Rabia Bilge Özgül Özdemir¹, Alper Tunga Özdemir², Ayla Eker Sarıboyacı³, Onur Uysal³, Mehmet İbrahim Tuğlu⁴, Cengiz Kırmaz⁵

¹Manisa Şehir Hastanesi, İmmünoloji ve Alerji Kliniği, Manisa

²Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Ana Bilim Dalı, İzmir

³Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Hücresel Tedavi ve Kök Hücre Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi, Eskişehir

⁴Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Manisa

⁵Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, İmmünoloji ve Alerji Bilim Dalı, Manisa

Genel Bilgi ve Amaç: Mezenkimal kök hücreler (MKH) güçlü immünomodülasyon yetenekleri olan yetişkin kök hücreleridir. Bu hücreler salgıladıkları PGE2,IDO, HGF, IL-10 ve TGF-b gibi moleküller ile immün sistem hücreleri üzerinde etkin bir baskılama gerçekleştirir (1). Ancak bu baskılama ne yazık ki geçicidir ve MKH'lerin ortamdan kaybolması ile patolojik durum geri gelir (2). Makrofajlar innat immün sistemin bir bileşenidir, temelde patojenlerin fagositozu, ROS ve NOS gibi oksidatif molekül sentezi üzerinden mikroorganizmaların eradikasyonundan sorumludur. Ancak Makrofajlar antijen sunumu yaparak innat sistem tarafından edinilen bilginin adaptif immün sisteme aktarılmasında kritik rol oynarlar (3). Ancak Makrofajlar ortamdan gelen uyarılara bağlı olarak fenotip ve fonksiyonlarını değiştirebilirler. Bu çalışma ile MKH kaynaklı immünomodülatuar sinyallerin makrofajların fenotip ve fonksiyonları üzerinde ne gibi etkiler oluşturduğunu araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Farklı makrofaj fenotipleri oluşturmak için sağlıklı gönüllülerden izole ettiğimiz makrofajlara M-CSF, GM-CSF, IFN-g, TNF-a, IL-4, IL-10 ve TGF-b1 sitokin uyarımları yaptık. MKH ve makrofaj etkileşimlerini değerlendirmek için MKH ve makrofajları direk (MEM-D) ve indirek (MEM-ID) olarak kültüre ettik. Makrofaj fenotipini değerlendirmek için CD14, CD64, CD80, CD200R ve CD163 antikoları kullanarak FACS analizleri yaptık. Devamında elde ettiğimiz farklı makrofaj fenotipleri ve MKH'leri ile kültüre edilmiş makrofajların CD4 T lenfositler üzerine etkilerini gözlemlemek için ko-kültür deneyleri gerçekleştirdik. FACS analizleri ile CD4, IFN-g, IL-4, IL-17a ve FoxP3 antikoları kullanarak hücre frekanslarının değişimlerini ve Luminex analizleri ile IFN-g, IL-4, IL-10, IL-17a sitokin değişimlerini tespit ettik.

Bulgular: M1 makrofaj uyarımı yaptığımız (GM-CFS, IFN-g ve TNF-a) Makrofajların CD14, CD163 ve CD200R ifadelerinin azaldığını, M2a (M-CSF ve IL-4) Makrofajların CD14 ve CD64 ifadelerinin azaldığını buna karşın CD200R ifadelerinin anlamlı olarak arttığını, M2c (M-CSF, IL-10 ve TGF-b1) Makrofajların ise CD200R dışındaki tüm marker ekspresyonlarının arttığını tespit ettik. MEM-D ve MEM-ID Makrofajların ise CD14, CD64 ve CD80 ifadelerinin arttığını CD163 ve CD200R ifadelerinin değişmediğini gözlemledik. Bu bulgular bize MKH'lerin makrofajları M2c benzeri bir hücre fenotipine farklılaştırmış olabileceğini düşündürdü. FACS analizlerinde Th2 ve Th17 hücre frekanslarının MEM-D, MEM-ID hücreleri ve MKH'lerin kendisi tarafından anlamlı olarak baskılanabildiğini ancak MKH ve makrofajların direk kültür edilmesinin Treg oluşumunu dramatik ve anlamlı olarak arttırdığını tespit ettik. Sitokin düzeylerine gelince, IFN-g, IL-10 ve IL-17a düzeylerinin MEM-D ve MEM-ID grubunda benzer ve anlamlı olarak baskılandığını, IL-4 düzeylerinin ise sadece US-M ve MEM-ID makrofajlarca anlamlı olarak baskılandığını gözlemledik.

Sonuç: MHC class II antijen ifadesi olmayan MKH'lerin CD4 T lenfositlere antijen sunma yetenekleri bulunmamaktadır (4). Bulgularımızda MKH'ler ile direk kültüre edilen Makrofajların en yüksek Treg uyarımına yol açtığını dolayısıyla MKH'ler ile oluşan immün baskılayıcı yanıtın adaptif immün sisteme aktarılmasında makrofajların kritik bir rolü olabileceğini düşünüyoruz. Buna ek olarak, MKH'ler ile indirek kültür yaptığımız MEM-ID grubunun da MKH'lerin kendisi kadar etkili bir immün baskılama yapabileceğini, indirek de olsa MKH-makrofaj etkileşimlerinin makrofajlarda bir hafıza oluşturmuş olabileceğini düşünüyoruz. Ancak in-vitro deneyler ile elde ettiğimiz bulgularımızın hayvan deneyleri ile desteklenmesine gereksinim bulunmaktadır.

1. Castro-Manrreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. *J Immunol Res [Internet]*. 2015 [a.yer 03 Ağustos 2016];2015. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4417567/>
2. Dazzi F, Krampera M. Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Haematol*. Mart 2011;24(1):49-57.
3. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol Baltim Md 1950*. 01 Temmuz 2005;175(1):342-9.
4. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, vd. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

SS022 - A New Perspective for Treatment of Castration Resistant Prostate Cancer: Combination of Erufosine and ABT-737

Ezgi Avşar Abdik¹, Ferda Kaleağasıoğlu², Hüseyin Abdik¹, Duygu Turan¹, Martin Berger³, Fikretin Şahin¹

¹Department of Genetics and Bioengineering, Faculty of Engineering and Architecture, Yeditepe University, Istanbul, Turkey

²Department of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, Near East University, Mersin 10, Turkey

³Toxicology and Chemotherapy Unit, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany

Abstract: Prostate cancer (PCa) is the second most common form of cancer in men in worldwide. Androgen deprivation therapy is used for treatment of PCa. In some case, androgen resistant take places known as castration resistant prostate cancer (CRPC). Therefore, development of new strategies for treatment of PCa is very crucial. In the present study, the anti-tumor potential of ABT-737 with erufosine alone and/or in combination was evaluated in CRPC cell lines (PC-3 and DU-145) and healthy prostate epithelium cell line (PNT-1A) in terms of their effects on autophagy and apoptosis as well as cell cycle *in vitro*. As results, Cytotoxicity was time and dose dependent but reached a ceiling effect at certain concentrations. The ceiling effect in combination was observed at the following concentrations (μM): PC-3 6.25/5; DU-145 50/5; PNT-1A 6.25/5. In PC-3 cells, a synergistic effect was observed with the combination. Combination treatment significantly induced the accumulation of DU-145 in the G2/M phase (56%) and had no influence on cell cycle phase distribution in PNT-1A cells (34%) when compared to other treated groups. On the other hand, in PC-3 cells, ErPC3 is more effective on cell cycle phase distribution (55%) when compared to the combination group (40%). Erufosine and ABT-737 alone and in combination induces autophagy in PC-3 but not in DU-145 and PNT-1A cells according to results of acridine orange staining. When cells were stained with Hoechst 33342, we observed that Erufosine and ABT-737 alone and in combination induces apoptosis in CRPC cells.

Keywords: ABT-737, Apoptosis, Autophagy, Erufosine, Prostate Cancer

Introduction

Prostate cancer(PCa) is the second most common cancer type and the fifth leading cause of cancer-related deaths in men worldwide(1). PCa is an initially androgen-dependent disease and responds to androgen deprivation therapy(ADT) but it may transform into an aggressive and lethal phenotype(castration-resistant prostate cancer,CRPC)(2, 3). Currently available treatment methods are considered to be ineffective in CRPC(4) and there exists an obvious need for the development of novel therapeutic modalities which target aberrant signaling pathways(5). The PI3K/NF- κ B/Bcl-2 survival mechanism is being considered as a crucial signaling pathway, especially in the initiation and progression of PCa and CRPC. Therefore, using drugs alone and combination that target Bcl-2 and PI3K signaling pathways can be a promising approach for the treatment of CRPC(6-7). The Akt inhibitor, erufosine(ErPC3) blocks cell proliferation by triggering both apoptosis and autophagy(8). The Bcl-2 inhibitor, ABT-737 blocks anti-apoptotic Bcl-2, it was also shown that ABT-737 interrupts its interaction with Beclin1 and thereby, induces autophagy(9). In the present study, ABT-737 with erufosine alone and/or in combination was determined in PC-3 and DU-145 and PNT-1A, in terms of their effects on autophagy and apoptosis *in vitro*.

Material and Methods

Cell viability assay. Cell proliferation was measured by MTT. Absorbance at 540-nm was detected using an ELISA plate reader.

Cell cycle analysis. Cells were stained with propidium iodide(PI) to identify the phases of the cell cycle. Analysis for cell phase distribution was made by the sub-G1 peak in the DNA histogram using BD FACS Caliber system.

Acridine orange (AO) staining. Cytoplasmic acidification was assessed by the AO staining procedure of the autophagic vacuoles. For quantification of the staining, cells were stained with acridine orange for 15 min, detached by trypsinization, and collected in PBS for the FACScan.

Hoechst 33342 staining. Cells were stained with 1.6mM Hoechst33342 solution for 10min in the dark at 37°C and photographed with fluorescence Zeiss Axiophot microscope.

Statistical analysis

The data were statistically analyzed using one-way ANOVA with Tukey post-hoc test.

Results & Discussion

Cell viability assay

Following 24, 48 and 72h, combined treatment with ABT-737(5 μ M)/ErPC3(6.25 μ M) reduced the cell viability to 84 \pm 10, 48 \pm 5, and 30 \pm 4%, respectively in PC-3. Therefore, ABT-737/ErPC3 combination displayed a synergistic cytotoxic effect in PC-3. In DU-145, following 24, 48 and 72h, ABT-737(5 μ M) with ErPC3(50 μ M) combination treatment decreased cell viability to 92 \pm 5, 52 \pm 5, and 41 \pm 2%, respectively. Therefore, combining ABT-737/ErPC3 provided no added value for all the incubation periods when compared to erufosine alone in DU-145. In PNT-1A, combination treatments did not demonstrate significantly higher cytotoxicity.

Cell cycle analysis

Combination treatment significantly induced the accumulation of DU-145 in the G2/M phase(56%) and had no influence on cell cycle phase distribution in PNT-1A(34%) when compared to other groups. On the other hand, in PC-3, ErPC3 is more effective on cell cycle phase distribution(55%) when compared to the combination group(40%).

Acridine orange (AO) staining

Erufosine and ABT-737 alone and in combination groups(0.5%) did not significantly induced AVOs in DU-145 and PNT-1A. On the other hand, erufosine(6.25 μ M) and ABT-737(5 μ M) alone and in combination groups(10%) induced the development of AVOs in PC-3.

Hoechst 33342 staining

Nuclear condensation and chromatin fragmentation were increased after combination treatment compared to the ErPC3 and ABT-737 alone in PC-3. ErPC3 alone was increased apoptotic morphologies compared to ABT-737 alone and combination treatment in DU-145. On the other hand, Hoechst staining showed no increase of the PNT-1A with morphologically apoptotic nucleus with ErPC3, ABT-737 alone and in combination.

Conclusion

In conclusion, the anticancer effects of targeted antineoplastic agents are dependent on the tumor type which implies that drug susceptibility testing and biomarker based selection of drug combinations may improve the therapeutic outcome in CRPC.

References

- 1.IARC. World cancer fact sheet 2014. Available from: International Agency for Research on Cancer; World Health Organization http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
- 2.Wise HM, Hermida MA, Leslie NR. Prostate cancer, PI3K, PTEN and prognosis. Clinical Science. 2017;131(3):197-210.
- 3.Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin M-E, Sternberg CN, Miller K, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. New England Journal of Medicine. 2012;367(13):1187-97.
- 4.Kim J-H, Lee H, Shin EA, Kim DH, Choi JB, Kim S-H. Implications of Bcl-2 and its interplay with other molecules and signaling pathways in prostate cancer progression. Expert opinion on therapeutic targets. 2017;21(9):911-20.
- 5.Wang G, Reed E, Li QQ. Apoptosis in prostate cancer: progressive and therapeutic implications. International journal of molecular medicine. 2004;14(1):23-34.
- 6.Heath EI, Carducci MA. Targeted therapy trials for prostate cancer. Prostate Cancer. 2008:383-400.
- 7.Zielinski RR, Eigel BJ, Chi KN. Targeting the apoptosis pathway in prostate cancer. The Cancer Journal. 2013;19(1):79-89.
8. S.S. Ansari, A.K. Sharma, H. Soni, D.M. Ali, B. Tews, R. König, H. Eibl, M.R. Berger, Induction of ER and mitochondrial stress by the alkylphosphocholine erufosine in oral squamous cell carcinoma cells, Cell death & disease 9(3) (2018) 296.
9. S. Huang, F. Sinicrope, Celecoxib-induced apoptosis is enhanced by ABT-737 and by inhibition of autophagy in human colorectal cancer cells, Autophagy 6(2) (2010) 256-269.

SS023 - Can Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Be Used in Retinal Diseases: A Case Presentation of Leber Congenital Amaurosis

Neslihan Sinim Kahraman., Ayse Oner

Acibadem Hastanesi

Abstract

Human umbilical cord blood is an excellent source of stem and progenitor cells which increase secretion of neurotrophic factors. These cells are known to have neuroprotective effect in neurodegenerative processes. The number of clinical reports including implantation of stem cells in retinal diseases are increasing rapidly. This paper aimed to review the safety and efficacy of umbilical cord derived mesenchymal stem cell implantation in retinal pathologies. We also present the first clinical case of a hereditary retinal disease called Lebers' congenital amaurosis with the sixth month follow-up results after stem cell treatment.

Key words: Leber congenital amaurosis, Retinal Diseases, Suprachoroidal implantation, Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell.

Introduction

Degenerative retinal diseases cause progressive irreversible vision loss in early stages of life. Usage of stem cells in the treatment of these retinal diseases is a fairly new and popular topic in ophthalmology. Many researchers consider that the transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs) is the most effective way of cell therapy. Simultaneous activation of multiple mechanisms (paracrine, trophic, immunomodulatory, and differentiation) affect all stages of the regeneration of damaged tissues. It has been reported that umbilical cord derived MSCs (UCMSCs) increase secretion of neurotrophic factors, angiogenic chemokines and angiogenic growth factors. ^[1,2] There are experimental studies demonstrating successful results of UCMSCs applications in degenerative retinal diseases ^[3,4] and to date there is no data about this type of stem cell implantation in human.

Leber congenital amaurosis (LCA) is an inherited retinal disorder characterized by severe visual impairment from birth or within the first months of life. It is the most common cause of congenital blindness which is also known as early onset form of retinitis pigmentosa (RP). The disease is thought to be caused by abnormal development of photoreceptor cells, or by the premature degeneration of retinal cells. After successful outcomes of phase III studies, the first gene therapy drug named voretigene neparvovec (Luxturna™) is approved by FDA for the treatment of LCA and other retinal dystrophies. Luxturna is an adeno-associated virus vector-based gene therapy indicated for the treatment of patients with confirmed biallelic RPE65 mutation. It is recommended for the patients which have viable retinal cells in early stages of the disease. ^[5]

This clinical case aimed to investigate the safety and efficacy of suprachoroidal UCMSC implantation in a patient with LCA. To the best of our knowledge, this is the first case report including the results of UCMSC treatment in LCA.

Case Presentation: In this report, we describe a 36-year-old female patient with the clinical diagnosis of LCA who received suprachoroidal UCMSC implantation. The patient had low visual acuity since childhood and her visual acuity decreased to light perception in her both eyes at the age of 7 years. Her vision was only light perception in both eyes at presentation. She had nystagmus and poor pupillary light responses. Fundus examination showed bilateral pale optic disc and severe peripheral pigmentary retinopathy. The electroretinography (ERG) testing was undetectable in both eyes and she was unable to do the visual field testing due to the low vision. Optic coherence tomography (OCT) testing showed atrophic retina and choroid in both eyes. Foveal thickness was 169 microns and choroidal thickness was 153 microns in the right eye. Her systemic examination was normal.

The patient was informed about gene therapy and genetic testing for RPE65 (this gene is the only treatable one) was performed. Unfortunately the RPE65 gene of the patient was found to be normal and there was no chance for gene therapy under current conditions. [5] Therefore we gave information about stem cell treatment option and written informed consent about stem cell therapy was obtained from the patient and her parents. After the approval by the Review Board of Stem Cell Applications of the Ministry of Health according to the regulations in our country (Review number for approval: 56733164/203), the patient received suprachoroidal UCMSC treatment to the right eye.

The details of the stem cell preparation were as follows: Umbilical Cord was disinfected and cut into pieces of 1-2 mm². The pieces transferred to 75-cm² culture flasks in DMEM-LG containing 10% HS (Human Serum), and 1% penicilin+streptomycin and cultured at 37°C in 5% CO₂. Culture medium was changed with fresh medium once every 3 days and waited for %70 confluency. Culture-expanded cells at the third passage were examined for surface protein expression by using flow cytometry. The UCMSCs were positive for CD 73, 90, 105 and negative for CD 34, 45, HLA-DR. No evidence of bacterial or fungal contamination was observed in the cells which were tested before releasing. Cell viability evaluated by trypan blue exclusion was > 90. 0 % ±0.5 before cell transplantation. 2x10⁶ cells/ml in isotonic solution containing 1 % human serum albumin were transferred in vials with the temperature controlled bag in 12 hours. The product was used in 24 hours. [3]

The surgery was carried out under local anesthesia. We performed a surgical technique defined as Limoli Retinal Restoration Technique (LRRT) which was described by Limoli et al [6] and was also applied in another study of our group and found to be safe. [7] The details of the surgery are as follows: The globe was deviated to the supero-nasal quadrant and conjunctiva was dissected at the infero-temporal quadrant at 8 mm from the limbus. A deep scleral flap of about 5 X 5 mm was opened by radial hinge at the infero-temporal quadrant. The sclerectomy was deep enough to allow viewing of the color of the choroid. A flap from the orbital fat was extracted from a gap above the inferior oblique muscle. This tissue was laid on the scleral bed and sutured with 6/0 vicryl at the proximal edge. The scleral flap was then sutured above the fat pedicle. The remaining space between the autologous fat graft, choroid, and scleral flaps was filled with 1 cc of 2x10⁶ UCMSCs. The conjunctiva was sutured with 8/0 vicryl. [6,7]

On the examination at 6 months after treatment best corrected visual acuity improved to hand motion at 1 meter in the treated eye. There was also an improvement in the self-reported visual acuity and the patient mentioned that she was able to distinguish some colors after the treatment. We found no difference in the examination of visual field and ERG testing. There was a reduction of the nystagmus frequency compared to baseline and to the fellow eye. Furthermore, we found an improvement in the pupillary constriction of the treated eye compared to the untreated eye. We also found a thickening of the choroid (increased from 153 microns to 173 microns) which may demonstrate the improvement in the choroidal blood flow after stem cell treatment (Figure 1). There were no systemic or ocular adverse events related to the surgical procedure of the patient.

Discussion:

In recent years, there have been significant developments about stem cells therapies for retinal diseases. Clinical studies showed that implantation of stem cells for advanced retinitis pigmentosa is safe and had no serious adverse effects. [8-10] In the Reticell-clinical trial, the investigators analyzed the effect of intravitreal use of autologous bone marrow derived MSCs (BMMSCs) to the quality of life of 20 patients with RP. [8] They found a statistically significant improvement in the quality of life of patients 3 months after treatment, whereas by month 12 there was no statistically significant difference from baseline.

In the largest ophthalmology stem cell clinical trial, seventeen patients with bilateral visual loss due to RP were included and followed up at least 6 months. Affected eyes were treated with 'The Stem Cell Ophthalmology Treatment Study' (SCOTS) protocol. In 33 treated eyes, 15 eyes improved an average of 7.9 lines of Snellen acuity, 15 eyes remained stable, and 3 eyes worsened by an average of 1.7 lines of Snellen acuity. [9]

Another recent study [10] included 11 patients with end-stage RP who received subretinal implantation of adipose tissue derived MSCs and only one patient experienced an improvement in visual acuity (from 20/2000 to 20/200), visual field, and ERG. Three patients mentioned that the light and some colors were brighter than before and there was a slight improvement in visual acuity. The remaining seven patients in the study had no vision improvement (five of them only had light perception before surgery).

Human umbilical cord blood is widely used as a rich and ethically acceptable source of stem cell and is known to have higher proliferative potential than the other sources of MSCs like bone marrow and adipose tissue. In all clinical studies UCMSCs administration had no side-effects. [2]

Limoli et. al. [6] treated 36 eyes of 25 dry age related macular degeneration patients with surgically grafted autologous cells and adipose tissue derived MSCs to the suprachoroidal space with his LRRT surgical technique. After 6 months the treatment improved visual performance in 19 eyes (52.78%) and no adverse effects were reported in any case in this study.

In the current case report, LRRT was used as a stem cell implantation technique in our patient without any ocular complications and we found improvement in visual performance of the treated eye at 6 month follow-up. Up to date no standardized treatment modality have been proved including the route of delivery for the stem cells. Suprachoroidal technique was applied in another study of our group in retinal diseases and it was found to be safe with no systemic or ocular complications and effective for stem cell implantation. [7]

In conclusion, stem cell based treatment modalities have been showing promising results in commonly encountered retinal diseases that currently have no curative treatment options. We believe that UCMSCs can be an effective stem cell source in the near future and stem cell therapies will hold an important place in the treatment of degenerative retinal diseases.

References:

1. Oner A. Stem Cell Treatment in Retinal Diseases: Recent Developments. Turk J Ophthalmol. 2018 Feb;48(1):33-38. doi: 10.4274/tjo.89972. Epub 2018 Feb 23.
2. Galieva LR, Mukhamedshina YO, Arkhipova SS, Rizvanov AA. Human Umbilical Cord Blood Cell Transplantation in Neuroregenerative Strategies. Front. Pharmacol. 2017 Sep 8;8:628. doi: 10.3389/fphar.2017.00628.
3. Zhang W, Wang Y, Kong J, Dong M, Duan H, Chen S. Therapeutic efficacy of neural stem cells originating from umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in diabetic retinopathy. Scientific Reports. 2017 Mar 24;7(1):408 doi:10.1038/s41598-017-00298-2
4. Mohamed EM, Abdelrahman SA, Hussein S, Shalaby SM, Mosaad H, Awad AM. Effect of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells administered by intravenous or intravitreal routes on cryo-induced retinal injury. IUBMB Life. 2017 Mar;69(3):188-201. doi: 10.1002/iub.1608. Epub 2017 Feb 5.
5. Oner A. Recent Advancements in Gene Therapy for Hereditary Retinal Dystrophies. Turk J Ophthalmol 2017 Dec;47 (6):338-343. doi: 10.4274/tjo.41017
- 6- Limoli PG, Limoli C, Vingolo EM, Scalinci SZ, Nebbioso M. Cell surgery and growth factors in dry age-related macular degeneration: visual prognosis and morphological study. Oncotarget. 2016; 7(30), 46913-23.
- 7: Oner A, Gonen ZB, Sevim DG, Sinim N, Unlu M. Suprachoroidal adipose tissue derived mesenchymal stem cell implantation in patients with dry type age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: 6 month follow-up results of a phase 2 study. Cellular Reprogramming. 2018;20(6):329-336. doi: 10.1089/cell.2018.0045
8. Siqueira RC, Messias A, Messias K, Arcieri RS, Ruiz MA, Souza NF, Martins LC, Jorge R. Quality of life in patients with retinitis pigmentosa submitted to intravitreal use of bone marrow-derived stem cells (Reticell -clinical trial). Stem Cell Res Ther. 2015 Mar 14;6:29. doi: 10.1186/s13287-015-0020-6.
9. Weiss JN, Levy S [Stem Cell Ophthalmology Treatment Study: bone marrow derived stem cells in the treatment of Retinitis Pigmentosa.](#) Stem Cell Investig. 2018 Mar ;5:18.
10. Öner A, Gönen ZB, Sinim N, Çetin M, Özkul Y. Subretinal adipose-tissue derived mesenchymal stem cell implantation in advanced stage retinitis pigmentosa: A Phase I clinical safety study. Stem Cell Research and Therapy, 2016 Dec 1;7(1):178.

List of Abbreviations:

- MSCs: Mesenchymal stem cells
UCMSC: Umbilical cord derived mesenchymal stem cells
LCA: Leber congenital amaurosis
RP: Retinitis pigmentosa
ERG: Electroretinography
OCT: Optical coherence tomography
LRRT: Limoli retinal restoration technique
BMMS: Bone marrow derived mesenchymal stem cells
SCOTS: The stem cell ophthalmology treatment study

SS024 - Primer ve Metastatik Kolon ve Meme Kanseri Hücre Hatlarında Hipoksik Koşullarda Exosom İçeriği

İbrahim Halil Gürçınar, Hilal Kabadayı, Seda Vatansever

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi

Eksozomlar, endozomal ağdaki küçük veziküllerdir ve hücreler arasında biyoaktif moleküllerin taşınmasında rol alırlar. Tümör hücrelerinden elde edilen eksozomların; anjiyogenez, hücre çoğalması ve immüno-regülasyon gibi tümör progresyonunda yer alan süreçlerde görev aldıkları gösterilmiştir. Tümör dokusu içindeki hipoksi ortamının kanser adaptasyon sürecini etkileyerek, malign fenotip gelişimini ve ilaç direncini etkilediği düşünülmektedir. İntratümoral hipoksi, kanser gelişimini yönlendiren, metastaz ve hasta mortalitesi ile ilişkili olan ortak bir mikro çevre uyarandır. Meme kanserinde, HIF-1 α veya HIF-2 α 'nın aşırı ekspresyonu, metastaz, tedavi başarısızlığı ve hasta mortalitesi ile ilişkilidir. Hipoksi ile indüklenen eksozom salımının, HIF bağımlı olduğu gösterilmekle birlikte eksozom salınması için gerekli spesifik hedef genler henüz tam olarak tanımlanamamıştır.

Bu çalışmada, primer meme (MCF-7) ve kolon (Colo-320) ile metastatik meme (M4A4) ve kolon (Colo-741) kanser hücre hatları, in vitro hipoksik (%3 O₂) ve normoksik ortamda eksozom varlığı, HIF-1 α sekresyonu ve kanser hücrelerinin köklülüğü üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlandı. Hücreler hipoksik ve normoksik koşullarda 48 saat inkübasyona tabi tutulduktan sonra kültür vasatları toplandı ve çalışmada kullanılmak üzere -80 0 C saklandı. Hücreler %4 paraformaldehit ile tespit edildikten sonra eksozom belirteçlerinin (CD9, CD63) kök hücre varlığının (CD133) ve HIF-1 α dağılımının değerlendirilmesi indirekt immünhistokimyasal boyama kullanılarak yapıldı. Kültür vasatındaki eksozomlar miRCURY™ Exosome Isolation Kiti kiti ile elde edildikten sonra total miRNA analizi yapıldı. Hipoksik koşullar altında, primer kanser hücre hatlarında (MCF-7 ve Colo-320) CD63 immünoaktivitesinin metastatik (M4A4 ve Colo-741) kanser hücre hatlarına göre fazla olduğu saptandı.

Buna karşın CD9 immünoaktivitesi tüm hücrelerde ve her iki ortamda negatif idi. Bununla birlikte, CD133 immünoaktivitesinin, hem primer hemde metastatik kolon ve meme kanseri hücre hatlarında hipoksik koşulda normoksik koşula nazaran daha fazla olduğu saptandı. Benzer şekilde HIF-1 α immünoaktivitesi hem hipoksik hem de normoksik koşullardaki tüm hücrelerde saptandı.

Hipoksik ortamın, primer meme ve kolon kanseri hücre hatlarında hem eksozom salgılanmasını arttırması hem de kanser hücrelerinde köklülüğü desteklemesi ile tümör mikroçevresinde kanser hücresinin metastatik ve agresiflik özelliğinin arttığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Eksozom, Primer kanser, Metastatik kanser, Hipoksi

SS025 - Spinal Kord Yaralanmasında Klinik Kök Hücre Uygulamaları

Necati Kaplan

Rumeli Üniversitesi İstanbul Reyap Hastanesi

Travmatik omurilik yaralanmasının (TOY) güncel tedavisinde kök hücrelerin olası potansiyellerini tanımlamak için deneysel ve klinik çalışmalar halen devam etmektedir. Bu kapsamda kullanılan hücreler mezenkimal kök hücreleri (örn., Wharton's Jelly kaynaklı mezenkimal kök hücreleri (WJ-MSC'ler)) veya embriyonik kök hücreleri (ESC'ler) sayabiliriz. Son yıllarda TOY tedavisinde veya bir anlamda benzer etyopatogeneze olduğu düşünülen santral sinir sisteminin iskemik hastalıklarında kök hücrelerin klinikte uygulanması umut verici sonuçlar öngörmektedir. Bizde T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Kan, Organ, Doku Nakli Hizmetleri Dairesi Başkanlığı Bilimsel Etik Kurulu onaylı 3 TOY hastamıza WJ-MSC'ler uyguladık. Devam eden klinik sonuçlarımızı bildirmek istedik. TOY patofizyolojisinin karmaşıklığını aydınlatan veriler ortaya çıktıkça, başarılı bir onarımın muhtemelen kök hücre nakli, gen tedavisi, scaffold biyomühendisliği gibi çok çeşitli biyomedikal veya biyomühendislik disiplinleriyle elde edilebilecek bilimsel verilerle aydınlatılabileceği düşüncesindeyiz.

Kaynaklar

1. Kabatas S, Teng YD. Potential Roles of Neural Stem Cell in Restoration of the Injured Spinal Cord: Review of the Literature. Turk Neurosurg 20(2): 103-110 pp., 2010
2. Kabataş S, Civelek E, İnci Ç, Yalçınkaya EY, Günel G, Kır G, Albayrak E, Öztürk E, Adaş G, Karaöz E. Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in a Patient with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Pilot Study. Cell Transplant 27(10):1425-1433 pp., 2018

Anahtar Kelimeler: omurilik yaralanması, mezenkimal kök hücre, kök hücre

3 kök hücre
ve hücresel tedaviler
kongresi
Joint Meeting With ISSCA

TUBA



TURKISH JOURNAL ASSOCIATION



ISSCA



Tıp Fakültesi



Spor Bilimleri
Fakültesi

12-14 Nisan 2019

Marmara Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi
Avusturya Otelleri Konferans Salonu

İstanbul

POSTER BİLDİRİ SUNUMLARI

PS001 -Kronik Böbrek Yetmezliğinin Progresyonunda Adiponektin Üzerine Plasenta Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Etkisi

Ezgi Akan¹, Emin Türkay Korgun², Dijle Kipmen Korgun¹

¹Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Antalya

²Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Antalya

Amaç: Kronik glomerüler ve tübülointerstisyel fibrozis, son dönem böbrek yetmezliğinin en yaygın sebebidir. Adiponektin, kronik böbrek yetmezliği (KBY) gelişimi için önerilen biyobelirteçlerden biridir. Çalışmamızda, sıçanlara subtotal nefrektomi yaparak kronik böbrek yetmezliği oluşturmayı ve böbrek hastalığında önemli bir biyobelirteç olabileceği önerilen adiponektin üzerine insan plasentasından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin (MKH) etkisini incelemeyi amaçladık.

Gereç-Yöntem: Çalışmamızda ilk olarak term plasentalarındaki amniyon membranından mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen hücrelerin flow sitometre ile karakterizasyonu yapıldı ve ardından mezenkimal hücrelerin adiposit, kondrosit ve osteositlere yönlendirilmesi sağlandı. Deney gruplarını oluşturmak için Wistar türü erkek ratların sol böbreklerine ligasyon yapıldıktan iki hafta sonra sağ böbrekleri tamamen alınarak 5/6 nefrektomi yapılmış oldu. Tüm gruplarda Adiponektin'in protein düzeyleri western blot yöntemi ile, mRNA ekspresyonları ise Real-Time PCR yöntemi ile tespit edildi. Ayrıca, adiponektinin idrar ve serum düzeyleri sıçana özgü ELISA kiti kullanılarak ölçüldü.

Bulgular: Adiponektin'in protein ve mRNA ekspresyonlarında nefrektomi yapılan gruplarda kontrol gruplarına kıyasla bir artma gözlenirken; 5/6 nefrektomi yapıldıktan sonra kök hücre verilmiş olan sıçanlarda, kök hücre verilmemiş KBY'li gruplar ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma belirlendi. Ayrıca, kök hücre verilen gruplarda serum adiponektin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artma gözlenirken, idrar adiponektin düzeylerinde ise anlamlı bir azalma tespit edildi.

Sonuç: Sonuç olarak, kan ve idrarda ölçülebilir bir biyobelirteç olan adiponektin kronik böbrek hastalığının ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. KBY'de klinik denemeler ve deneysel sistemlerin dizaynı açısından MKH'ler terapötik olarak rol oynayabilir.

Anahtar Kelimeler: Kronik böbrek yetmezliği, mezenkimal kök hücre, adiponektin

PS002 -Farklı Yöntemlerle İzole Edilmiş Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eksozomlarının Protein Konsantrasyonu ve Eksozom Miktarı Açısından Karşılaştırılması

Dilek Bahar, Zeynep Burçin Gönen

Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK), Kayseri

Giriş: Hücreler tarafından salgılanan mikroveziküllerden en çok çalışılan, hücre-hücre iletişiminde yeni bir araç olarak tanımlanan eksozomlar, 40-150nm büyüklüğünde, endositik orijinden gelen, birçok hücre tipi ile kan ve ürün gibi ekstraselüler ve amniyotik sıvılar, asitler, tükürük, anne sütü, sperm ve serebrospinal sıvılar tarafından hücre dışı alana salgılanan nanoveziküllerdir (1,3). Eksozomlar izole edildikleri kaynaklara göre içeriği değişebilmektedir ve proteinler, lipidler, mRNA'lar, miRNA'lar, lncRNA'lar, tRNA, genomik DNA, cDNA ve mtDNA gibi birçok biyoaktif molekülü içermektedir. İçerdikleri enzimler yardımıyla da enzimleri hedef hücreye aktararak hücre-hücre etkileşimini oluştururlar. Böylelikle eksozomlar ekstraselüler organeller olarak parakrin/endokrin rol oynarlar (4,6). Eksozomların içeriğinde bulunan biyoaktif moleküllerin işlenmesi ve paketlenmesi henüz çok aydınlatılmış olmasa da bu mekanizmanın çok sıkı bir şekilde kontrol edildiğini gösteren çalışmalara rastlanmaktadır ve son yıllarda hücrel tedavilerde görülen komplikasyonlara karşı olarak hücrel tedavi ürünü olarak kabul edilmektedir ve eksozom saklanma çözümü ile ilgili herhangi bir standart protokol bulunmamaktadır.

Amaç: Bu çalışmadaki amaç insan umbilikal kord dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücre (hUK-MKH) eksozomlarının, bir ticari kit (System Biosciences, ABD) ile ve Polietilen glikol (PEG) ve Dekstran kullanılmasıyla elde edilen iki fazlı sulu çözelti sistemi ile farklı iki yöntemle izole edilmesinin ve biri Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) diğeri *Radioimmunopresipitasyon tamponu* (RIPA) olan iki farklı solüsyonlarda saklanmasının protein konsantrasyonuna ve eksozom sayısına etkisini araştırmaktır.

Yöntem: İnsan umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücreler Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)'inden temin edildi. Hücreler 3. Pasaja kadar aMEM içeren standart besiyerinde kültüre edildi. Ardından kondrojenik, osteojenik ve adipojenik olmak üzere 3 farklı hatta farklılaştırılarak boyamaları yapıldı. Daha sonra akım sitometri ile hücrelerin yüzeyinde bulunan proteinler ile mezenkimal kök hücre karakterizasyonu yapıldı. Hücrelerin karakterizasyonu tamamlandıktan sonra hücreler 24 saat boyunca serumsuz besiyerinde inkübe edildi ve ardından eksozom izolasyonuna geçildi. Eksozomlar ticari kit ve PEG-dekstran kullanılarak izole edildi. Elde edilen eksozomların tanımlanması Westernblot, Zeta-Potansiyel Ölçümü ve Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) görüntüleriyle yapıldı. Westernblot ile eksozomal yüzey belirteci olan CD63'ün varlığına bakıldı. Zeta potansiyel ölçümü için eksozomlar distile su içinde 1:1000 seyreltilerek, Refraktif indeks: 1,39; absorbans ise 0,001 alınarak Zeta Potansiyel ölçümü yapıldı. SEM görüntüleri için de 30 ul eksozom temiz bir lam üzerine damlatıldı ve steril hava akışlı kabinde kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamlar SEM (Zeiss GEMINI 500) 'de görüntülendi. Görüntüsü alınan eksozomların yarıçapları ImageJ programı kullanılarak ölçüldü. Eksozomların tanımlanmasının ardından protein konsantrasyonu Bradford yöntemi kullanılarak ölçüldü.

Ekzozom sayısı ise Asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktivitesine dayalı bir kit olan ExoCet kit (SBI, ABD) kullanılarak yapıldı. Yapılan deneylerin absorbans ölçümleri ELISA cihazı (Promega Glomax, ABD) kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki fark t-testi ile istatistiksel olarak analiz edildi.

Sonuç: Westernblot sonuçlarına göre örneklerin CD63 ekzozomal yüzey proteinini ifade ettiği görüldü. Örneklerin Zeta potansiyeli $105,621 \pm 6,68$ nm ölçüldü. SEM görüntülerinden elde edilen ekzozom çapı ise $83,728 \pm 27,269$ nm hesaplanarak ekzozomların tanımlanması yapıldı. İki farklı yöntemle izole edilen ekzozomların ölçülen protein konsantrasyonunda istatistiksel olarak fark bulunmadı ($P=0,2$). RIPA tamponu içinde dondurulup çözödürülen ekzozomların protein konsantrasyonunun PBS içinde dondurulup çözödürülen ekzozomlardan daha fazla olduğu ve ikisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($P_{Ripa/Izolasyon\ Solüsyonu} < 0,001$). İki farklı yöntemle elde edilen aynı konsantrasyonda proteine sahip ekzozom örneklerinin sayısında ise istatistiksel olarak fark görülmedi ($P=0,35$).

Tartışma: Elde edilen sonuçlara göre kullanılan izolasyon yöntemleri arasında protein konsantrasyonu ve ekzozom miktarı açısından bir fark görülmemiştir. Bunun sebebi ticari kitin de PEG ve Dekstran tabanlı bir kit olması olabilir. Protein konsantrasyonu ve ekzozom sayısı arasında korelasyon görülmüş ve RIPA içinde saklanan ekzozomların protein konsantrasyonunun daha yüksek olduğu belirlenmiştir. İleriki çalışmalarla ekzozom çalışmaları daha etkin ve standart bir hale getirilebilir.

1. Burke, J. vd. 2016. "Stem cell derived exosomes: A potencial alternative therapeutic agent in orthopaedics", Stem CellIntenational, 1-6
2. Kahraman, T. vd. 2014. "Ekzozomlar: Tanı ve tedavide kullanılabilen doğal nanokesecek adayları", Turkish Journal of Immunology, 2, 34-40
3. They, C. 2011. "Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications, Biology Reports, vol. 3
4. O. G. De Jong, B. W. M. Van Balkom, R. M. Schiffelers, C. V. C. Bouten, and M. C. Verhaar, "Extracellular vesicles: potential roles in regenerative medicine," Frontiers in Immunology, vol. 5, article 608, 2014.
5. Masciopinto, F. vd. 2004. "Association of hepatitis C virus envelop proteins with exosomes", Eur J Immunology, 34,2834-2842
6. Valadi, h. Vd. 2007. "exosome mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic Exchange between cells", Nat Cell Biology, 9, 654-659

PS003 - Pankreatik Duktal Adenokarsinoma Kök Hücre Belirteci Olarak CD44

Furkan İlker ÖZBALCI¹, Nilgün GÜRBÜZ¹

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ISPARTA

Pankreas kanseri, teşhisinin geç ve prognozunun kötü olması nedeniyle dünya genelinde ölümcül ilk 5 kanser içerisinde gösterilmektedir (1). Pankreas kanseri hastalarının teşhis koyulduktan sonra 5 yıl içerisindeki hayatta kalma oranı, %2-3 gibi oldukça düşük bir değerdir ve genellikle tedavi ile ortalama ancak 6 ay gibi kısa bir süre yaşamlarını sürdürebilirler (2). Tüm pankreas kanser tipleri içerisinde, pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAC), %85'lik oran ile en sık rastlanılan pankreas kanseri formudur (3).

PDAC'nın kötü prognozunun moleküler açıdan sebebi, bozulan hücresel sinyal mekanizmalarıdır. PDAC hücrelerinde metastatik potansiyel oldukça fazla olup apoptozis gibi önemli bir hücre ölüm mekanizmasına da direnç gösterirler. PDAC gelişiminde rol oynayan kilit mediyatörlerin tanımlanması, tanısı ve tedavisi çok zor olan pankreas kanserinin takibinde çok önemlidir. Bu nedenle PDAC'ye spesifik biyomarkarların tespit edilmesi gerekmektedir. Bu kapsamda yapılan çalışmalarda CD (Cluster Differentiation) hücre yüzey proteinlerinin antijenik özelliklerinden dolayı biyomarker etkileri ön plana çıkmaktadır. 2016 yılı itibariyle insanlarda tanımlanan CD'lerin sayısı 371 olup ancak her geçen yıl bu rakam artmaktadır(4). İnsanlarda tanımlanan bu CD'ler içerisinde CD44'ün, gen amplifikasyonuna bağlı olarak birçok farklı kanser türünde aşırı derecede eksprese olduğu gösterilmiştir.

CD44 molekülü hücre-hücre veya hücre-matriks etkileşimi sağlayan tip 1 transmembran glikoproteinidir. Transmembran, ekstrasellüler ve intrasellüler / sitoplazmik olmak üzere üç alt birimden oluşan CD44'ün ekstrasellüler alt birimi hücre dışında bulunan kollajen, osteopontin, hyaluronik asit, laminin gibi ekstrasellüler matriks komponentleriyle etkileşime girer. Transmembran alt birimi proliferasyon, büyüme, migrasyonu sağlayan sinyal yollarında ko-faktör ve adaptör kısım olarak görev alır. İntrasellüler / sitoplazmik alt birimi ise kısa kuyruk ve uzun kuyruk konfigürasyonlarına sahiptir, bunun yanı sıra çeşitli moleküllerin nukleer lokalizasyonunu ve Notch1, MMP gibi hücre migrasyonunda ve invazyonunda rol oynayan proteinlerin transkripsiyonunda aracılık eder. CD44, hücre proliferasyonunu hem pozitif hem de negatif olarak düzenleyebilir. CD44 mRNA'sının ekson 6-15 arasındaki alternatif kırılmalar sonucunda CD44'ün birçok farklı varyantları oluşur. Farklı kanser tiplerinde farklı CD44 varyantlarının ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Örneğin; CD44v8-10 pankreatik kanserlerde (5), CD44v6 ise kolorektal kanserlerde aşırı derecede eksprese edilir (6). 67 pankreas kanseri hastasında yapılan bir çalışmada, CD44 açısından negatif olan hastaların pozitif olanlara göre yaklaşık on ay daha fazla yaşadığı tespit edilmiştir (7). CD44'ün kanserdeki birçok kilit rolüne ilaveten en önemlisi kanser kök hücrelerden fazlaca eksprese edilmesidir. Yapılan çalışmalar net olarak ortaya koymuştur ki CD44, pankreas kanseri kök hücre için bir biyomarkerdir. Wnt/B-catenin kanonik sinyal yolağında Wnt proteininin, LRP5/6 reseptörlerine bağlanması sonucu B-katenin defosforile olur ve böylece GSK3-beta de grede edilemez. Defosforile haldeki B-katenin nukleer por kompleksinden geçerek TCL/LEF kompleksiyle beraber CD44 transkripsiyonunu artırır (8). CD44 geninin CD44 siRNA ile susturulması sonucu pankreas kanserlerinde proliferasyon, migrasyon ve invazyonun azaldığı görülmüştür.

Tüm bu kanıtlar ışığında CD44'ün, hem hastalığın teşhisinde hem de progresyonunun takibinde hem de tedavide uygulanacak kemoterapötüğün yanıtının değerlendirilmesinde oldukça yardımcı olacağını ifade etmektedir. Hücre proliferasyonu, hücre ölümü, invazyon/migrasyon gibi pankreas kanserinin gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli hücrel mekanizmalarda CD'ün kilit rolleri dikkate alındığında, CD44'ün hedef olarak alındığı hem gen düzeyinde hem de protein düzeyinde potansiyel terapötik ajanların geliştirilmesi, pankreas kanserinin tedavisinde etkin bir stratejik yaklaşım geliştirecektir.

KAYNAKLAR

- 1-) Saika K ve Sobue T. *Gan To Kagaku Ryoho* 2013;40:2475-80.
- 2-) Wang ve ark. *Hepatogastroenterology* 2008;55:681-6.
- 3-) Li D ve ark. *Lancet* 2004;363:1049-57.
- 4-) HCDM, responsible for HLDA workshop and CD molecules". Human Cell Differentiation Molecules Council. Retrieved 2016-04-21.
- 5-) Rall CJ ve Rustgi AK. *Cancer Res* 1995;55:1831-5.
- 6-) Yamane ve ark. *Oncology* 1999;56:232-8.
- 7-) Li ve ark. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:6724-31
- 8-) Chang ve ark. *Cancer Cell Int* 2013;13:117.

PS004 - Gbm Kök Hücreleriyle Hazırlanan Dendritik Hücre Aşısı Optimizasyonu

Ayfer Haydaroğlu¹, Aysel Yurtsever², Nezih Oktar³, Tayfun Dalbastı³, Sevgi Erdem⁴, Gülin Kavakalan⁴, Pınar Hüner⁵, Ayşe Caner¹

¹Ege Üniversitesi Kanser Araştırma Merkezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı, İzmir

²Ege Üniversitesi Kanser Araştırma Merkezi, İzmir

³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahi Ana Bilim Dalı, İzmir

⁴Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı, İzmir

⁵ONKIM Kök Hücre Teknolojileri, İstanbul

Giriş: Kötü prognozlu Glioblastoma Multiforme (GBM) olgularında standart tedavi yaklaşımı cerrahi sonrası radyoterapi ve kemoterapidir. Ancak tüm agresif multimodel tedavilere karşın beklenen hayat süresi çok kısadır. Bu nedenle GBM’lerde sürekli yeni model tedavi arayışları sürmekte ve immunoterapi bu arayışların başında gelmektedir.

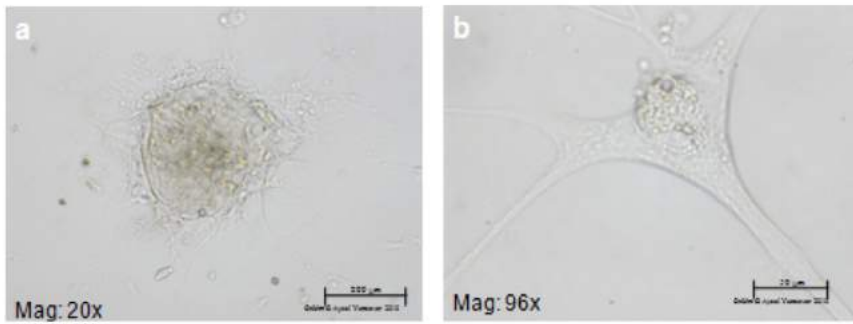
Çalışma Amacı: Bu çalışma GBM de daha iyi bir prognoz için yapılacak immunoterapi kapsamında dendritik hücre (DH) aşılarının optimizasyonu amacı ile kordon kanından elde edilmiş ve GBM kök hücreleri (GKH) ile olgunlaşmış DH lerle yapılan flow sitometrik bir analiz çalışmasıdır. Hedefimiz tümör içinden ayrılan GKH ile aşı hazırlanmasını, DH matürasyonu için hangi dilüsyonların daha uygun olduğunu göstermektir.

Materyal ve Yöntem: GBM’li 15 hastanın tümör örnekleri, EÜTF Beyin Cerrahisi AD tarafından onayı alınan hastalardan alındı. Göbek kordonu kanları ailelerin bilgilendirilmiş onayı alınarak toplandı. GKH, Miyeloid ve plazmasitoid DH ler mikroskop altında gözlemlendi ve hareketleri, davranışları videoya alındı. Göbek kordonu kanında bulunan DH lerin ve GKH lerin Akım sitometresi kullanılarak analizleri yapıldı. PTEN ve MGMT genlerin analizi gerçekleştirildi. DH matürasyonunu gösteren CD123 ve CD11c aktiviteleri farklı seyreltilmiş örneklerde karşılaştırıldı. İstatistiksel analizde Mann Whitney U testi ve Pearson korelasyon analizi kullanıldı, P < 0,05 olarak anlamlı bulundu.

Bulgular ve Tartışma: Neurosferler ve öncül hücreler video çekimleri ve fotoğraflarla gösterildi (Şekil 1). GBM’li 15 olgu kök hücre işaretleyicileri açısından değerlendirildi (Tablo 1) ve istatistiksel olarak genetik işaretleyicilerde önemli bir fark bulunmazken kök hücre işaretleyicileri arasında korelasyon açısından önemli bir fark bulundu (R= 0,999) (p<0,0001) (Tablo 2). DH aşılarının etkinlik değerlendirmesi için flow sitometride CD 123 ve CD 11c ekspresyon seviyesine bakılarak DH olgunlaşma derecesi saptandı. DH ler ile GBM hücrelerinin farklı dilüsyonlarıyla ko-kültür yapıldı. 123 CD ve CD 11c ekspresyon seviyeleri kontrol grubuyla mukayese edildi. GBM 1/2 seyreltme bir etki bulunmadı ama 1/4 ve 1/256 aralığı önemli bir etki gösterildi. 1/512 ve 1/1024 seyreltmelerde ise etki daha düşük bulundu (Şekil 2). Göbek kordon kanında DH konsantrasyonları 1.2×10^6 olarak, GBM antijenleri 1×10^6 olarak tespit edildi. CD 123 ve CD11c sellülarite ve granülarite oranı arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon bulundu (R= 0,999) (p<0,001) ve bunun fagositoz açısından anlamlı taşıdığı düşünüldü.

Sonuçlar:

1. DH aşısı konsantrasyonları için 1/4-1/256 diluzyonları daha uygun bulundu.
2. Sellularite ve granülarite oranı arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon bulundu.
3. Kanser kök hücreleri ile genetik analizler karşılaştırıldığında önemli bir korelasyon bulunmazken kök hücre ekspresyonları arasında istatistiksel bir fark bulundu.
4. DH aşılarının optimizasyonu açısından gelecekteki çalışmalara ve protokollere yardımcı olacak sonuçlar elde edildi.



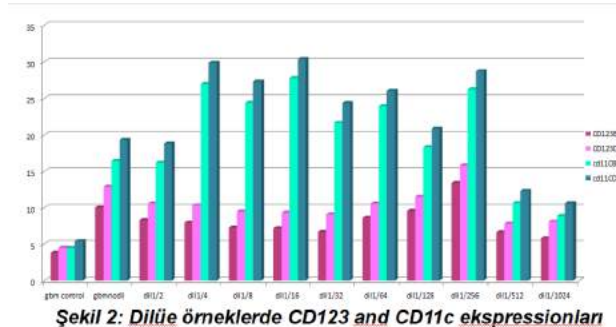
Şekil 1: Tümörden izole edilen nöral hücreler. a. Nörosfer, b. Diferansiyel nöral hücre

Olgu	CD 133 %	CD111 %	CD56 %	CD34 %	CD45 %
Olgu 1 (GS)	3,72	5,22	8,07	3,22	6,4
Olgu 2 (FU)	3,01	2,25	2,35	1,77	4,5
Olgu 3 (MK)	0,63	1,77	2,33	1,51	2,2
Olgu 4 (MuK)	4,80	6,70	5,30	5,30	10,0
Olgu 5 (NA)	0,13	0,16	0,30	0,06	0,0
Olgu 6 (DA)	0,06	0,20	0,04	0,10	0,1
Olgu 7 (G)	0,21	0,20	0,24	0,12	0,0
Olgu 8 (AB)	0,12	0,15	0,23	0,06	0,0
Olgu 9 (AM)	0,12	0,16	0,07	0,06	0,0
Olgu 10 (KA)	0,99	0,16	0,38	0,12	0,0
Olgu 11 (AA)	0,07	0,08	0,10	0,10	0,0
Olgu 12 (NB)	0,07	0,20	0,04	0,33	0,0
Olgu 13 (ZA)	0,23	0,16	0,30	0,10	0,1
Olgu 14 (OC)	0,20	0,07	0,24	0,19	0,1
Olgu 15 (EG)	0,21	0,11	0,00	0,33	0,0

Tablo 1: GBM Kök Hücre Ekspresyonları

		CD34B	CD56	CD111
CD56	R	0.880		
	p	0.000		
CD111	R	0.989	0.934	
	p	0.000	0.000	
CD133	R	0.945	0.886	0.955
	p	0.000	0.000	0.000

Tablo2: GBM Kök Hücre Ekspresyonlar Arasında Korelasyon



Şekil 2: Dilüe örneklerde CD123 and CD11c ekspresyonları

PS005 - Aşı Amaçlı Kanser Kök Hücreleri ve Dendritik Hücre Ko-Kültürü

Aysel Yurtsever¹, Ayfer Haydaroğlu², Gülin Kavakalan³, Sevgi Erdem³, Rukset Attar⁴, Ayse Caner²

¹Ege Üniversitesi Kanser Araştırma Merkezi, İzmir

²Ege Üniversitesi Kanser Araştırma Merkezi;Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı, İzmir

³Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı, Kanser Biyolojisi ve İmmunolojisi, İzmir

⁴Yeditepe Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Departmanı, İstanbul

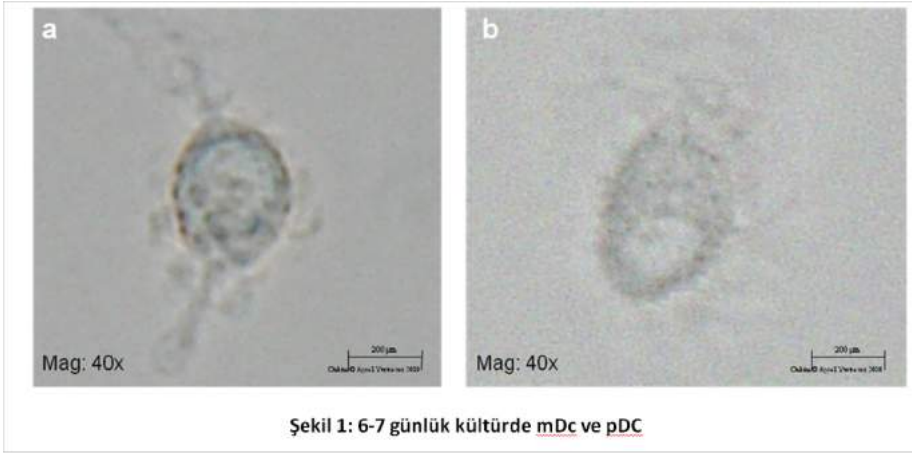
Giriş: Yaşam beklentisi kısa olan ileri evre kanserlerde konvansiyonel radyoterapi ve kemoterapi gibi tedavilerinden sonra otolog hazırlanmış tümör aşısının standart tedavilere eklenmesinin yaşam süresini uzattığını göstermek önem kazanmıştır.

Çalışma Amacı: Bu çalışmada amaç; ileri evre kanserlerde yaşam süresini arttıracak aşı geliştirilmesinde kullanılmak üzere yöntem araştırmaktır.İleri evre kanserlerde, tümör dokusu içinden kanser kök hücrelerini(KKH) ayırmak, kanser hücrelerini dendritik hücreler(DH)le karşılaştırılarak tumor antijenine karşı duyarlı hale getirmek, DH maturasyonları üzerine etki eden faktörleri araştırmak, dilüsyon çalışmaları ile en uygun hangi dilüsyonlarda aşının etkin olabileceğini saptamak, kanser kök hücrelerinin analizlerini yapmak ve istatistiksel olarak kıyaslamaktır.

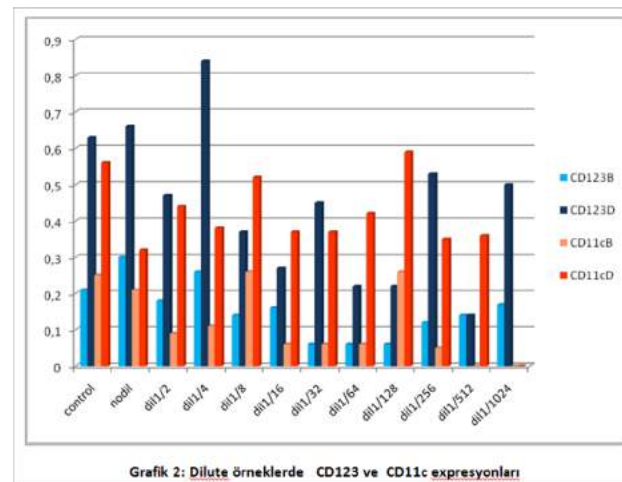
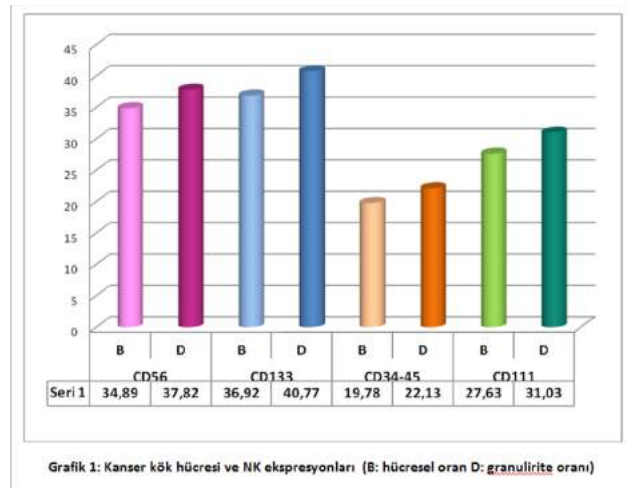
Materyal ve Yöntem: Dendritik hücreler, annelerin bilgilendirilmiş olur formlarıyla izinleri alınarak umbilikal kord kanından elde edildi. Over kanser örneği İstanbul Üniversitesi Kadın Doğum ABD dan izin veren hastadan ameliyat sırasında alındı. Myeloid DH(mDH) ve plasmositoid DH(pDH) mikroskop altında gözlemlendi(Şekil 1) ve videoya çekildi. DH lerin hücre yüzeyine tipik proteinleri, insan antijenlere karşı; CD56, NK hücreleri, CD133/1-PE, CD11a-FITC; CD18-PE; CD123-PE olgunlaşmamış DHler için, ve CD 80 ile işaretlendikten sonra flow sitometrede analizleri yapıldı. Kanser kök hücreleri CD34-PE, CD45-FITC, CD56-PE, CD133/1-PE ve CD111-PE kullanılarak işaretlendi. Flow sitometri kullanılarak analizleri yapıldı. CD123 ve CD11c aktiviteleri farklı dilüsyon örneklerinde karşılaştırıldı. Pearson korelasyon analizi istatistiksel analiz için kullanıldı.Sonuçlar P < 0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: Kordon kanından $1,2 \times 10^6$ oranında DH lerin sabit konsantrasyonları, seri olarak dilüe edilmiş $1,5 \times 10^6$ over kanseri kökenli karaciğer metastazı hücreleriyle ko-kültür yapıldı. CD123 hücre ve parçalı yapı oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulundu(Grafik 1). Over kanser kökenli karaciğer metastazı hücrelerinin 1/8 dilüsyonunda DH'in en belirgin şekilde etkili olduğu gözlemlendi.(Grafik 2) Sellülarite ve granülarite oranı arasında istatistiksel önemli seviyede anlamlı olduğu (CD123, p=0,007; CD11c p=0,013) ve fagositoz açısından anlam taşıdığı düşünüldü.

Sonuçlar: Kanser mikroçevresinin KKH konsantrasyonunu artırdığı, NK hücre konsantrasyonu ve parçalı yapı oranında önemli artış olmasının DH aşısı üretimindeki önemi ve 1/8-128 dilüsyonlarının DH aşısı konsantrasyonları için daha uygun olduğu bulundu. Sellülarite ve granülarite oranı arasında istatistiksel anlamlı korelasyon bulundu ve fagositoz başarıyla gösterildi.



Şekil 1: 6-7 günlük kültürde mDc ve pDc



PS006 - Effects Of Human Placental Amnion Derived Mesenchymal Stem Cells On Proliferation And Apoptosis Mechanisms In Chronic Kidney Disease In The Rat.

Emin Turkey Korgun¹, Busra Cetinkaya^{1,4}, Gozde Unek¹, Dijle Kipmen-Korgun², Sadi Koksoy³,

¹Department of Histology and Embryology, ²Department of Medical Biochemistry, ³Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical Faculty, Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey, ⁴Department of Histology and Embryology, Medical Faculty, Bulent Ecevit University, 67600 Zonguldak, Turkey

Background and Objectives: The feature of chronic kidney failure (CKF) is loss of kidney functions due to erosion of healthy tissue and fibrosis. Recent studies showed that Mesenchymal stem cells (MSCs) differentiated into tubular epithelial cells thus renal function and structures renewed. Furthermore, MSCs protect renal function in CKF. Therefore, we aimed to investigate whether human amnion-derived mesenchymal stem cells (hAMCS) can repair fibrosis and determine the effects on proliferation and apoptosis mechanisms in chronic kidney failure

Methods and Results: In this study, rat model of CKF was constituted by applying Aristolochic acid (AA). hAMCS were isolated from term placenta amnion membrane and transplanted into tail vein of rats. At the end of 30 days and 60 days of recovery period, we examined expressions of PCNA, Ki67, p57 and Parp-1 by western blotting. Immunoreactivity of PCNA, Ki67, IL-6 and Collagen type I were detected by immunohistochemistry. Besides, apoptosis was detected by TUNEL. Serum creatinine and urea were measured.

Expressions of PCNA and Ki67 increased in hAMSC groups compared with AA group. Furthermore, expressions of PARP-1 apoptosis marker and p57 cell cycle inhibitory protein increased in AA group significantly according to control, hAMSC groups and sham groups. IL-6 proinflammatory cytokine increased in AA group significantly according to control, hAMSCs groups and sham groups. Expressions of Collagen type I protein reduced in hAMSCs groups compared to AA group. After hAMSC treatment, serum creatinine and urea levels significantly decreased compared to AA group. After injection of hAMSC to rats, Masson's Trichrome and Sirius Red staining showed fibrosis reduction in Kidney.

Conclusions: According to our results hAMSCs can be ameliorate renal failure.

Keywords: Human Amnion derived mesenchymal stem cells, Chronic kidney failure, Apoptosis, Proliferation, Rat

Introduction

Chronic kidney injury can progress end-stage renal failure that causes an irreversible glomerular and tubular damage lead to loss of renal function (1). Apoptosis, oxidative damage and microvascular rarefaction are responsible for glomerular and tubulointerstitial fibrosis in chronic kidney failure (2).

Aristolochic acid (AA) is obtained from the Chinese herb *Aristolochic fangchi*. (3) In recent studies showed that AA leads to renal damage has been identified (4). AA effects on proximal tubular cells and causes Chronic Kidney Diseases (CKD) and AA nephropathy (AAN) create progress fibrosis rapidly. (5). Therefore, renal functions deteriorate and end stage renal failure occurs in a short while (6). Several studies asserted that specific AA-DNA adducts formation in renal epithelial cells after AA injection and these adducts effect proximal tubular epithelial cells (PTEC) regeneration negatively leading to apoptosis. Therefore, irreversible proximal tubular atrophy occurs (7-11).

CKD is caused by the development of renal fibrosis. It is characterized by renal interstitial fibrosis, tubular atrophy, interstitial inflammatory cell infiltration, and interstitial matrix accumulation. In fibrotic kidneys, type 1 and type 3 together with basal membrane type 4 collagen are the most common types of collagen. Kidney fibrosis is characterized by collagen synthesis accumulation, cross-linking and decreased degradation (12-13). AAN patients are observed high serum creatinine rate with anemia and proteinuria. AA induces loss of peritubular capillary that results of hypoxia and tubular cell death (14, 15). Transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs) was performed to provide renal repairment of damaged kidney in most of studies. Therefore, stem cells were considered therapeutic tool for the treatment of kidney diseases (16-20).

Placenta is used as a source of MSCs alternatively and placenta is an important reserve for stem cells and progenitor cells. Chorionic villus, amniotic membrane, umbilical cord stroma and amniotic fluid are indicated as a source of MSCs in placenta (21,22). Diaz-Prado and colleagues determined that isolation, localization, phenotypic characterization and differentiation potential of human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSC) (23). AMSC show plastic adherence and fibroblast-like growth as MSCs obtained from bone marrow. They express specific cell surface markers such as CD90, CD44, CD73, CD105, CD166 and CD29 and lack expression CD45, CD34, CD14, HLA-DR (23,24) .

Several studies demonstrated the effect of MSCs that obtain from bone marrow on CKD (25-28). However, effects of placental-derived mesenchymal stem cell in CKD experiments are limited. In the present study, we aimed to investigate whether amnion membrane derived mesenchymal stem cells can repair fibrosis that occurs because of chronic kidney failure and they are effective in mechanisms of proliferation and apoptosis.

Materials and Methods

Isolation of Human Amnion derived Mesenchymal Stem Cells

Human term placentas of normal pregnancies (range 38–42 weeks, n = 6) were obtained after spontaneous delivery or caesarean section with informed consent. Approval of the Ethical Committee of the Medical University of Akdeniz was granted. Isolation of hAMSC was performed according to the protocol of Soncini et al 2007 using enzymatic treatment of the amnion with collagenase A and DNase (both from Roche, Penzberg, Germany) after manual separation from the chorion (29) . hAMSC were cultured in DMEM (Lonza, Basel, Switzerland) low glucose supplemented with 15 % FBS (FBS Gold, both from Gibco, Invitrogen, Paisley, UK).

Immunophenotyping of Cells

The cell surface marker phenotype of these hAMSCs was analyzed by flow cytometry and shown to be for CD90+, CD105+, CD73+, CD44+ and negative cocktail containing CD34, CD11b, CD19, CD45 and HLA-DR. hAMSCs were analyzed with a FACS Aria III Cell Sorter flow cytometry and the CellQuest software (BD Biosciences, New Jersey, USA).

Chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiation

For induction of osteogenic, chondrogenic, or adipogenic differentiation, hAMSCs were cultured in StemPro Osteogenic, StemPro Chondrogenic, or StemPro Adipogenic differentiation media (Life Tech, Carlsbad, USA), respectively, and with appropriate supplements. At week 3 of postosteogenic, postchondrogenic and postadipogenic inductions cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min. The cells were stained with Alizarin Red, Alcian Blue, and Oil Red O dyes (Sigma–Aldrich, St Louis, USA) for detection of calcium deposits, proteoglycans, and fat vacuoles as an indication of osteogenic, chondrogenic, and adipogenic differentiations, respectively.

Animal Experiment

The study involving both human (File No: 294) and animals (File No: 2014.07.03) was conducted in accordance with the principles of the Helsinki Declaration and was approved by the ethical committee of Akdeniz University.

Aristolochic acid I (AA; Sigma-Aldrich, St Louis, USA) was used to mimic the structural and functional damage of CKD. AA was dissolved in Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Animals were randomized in 6 groups. (i) Control group (n=5), Sham groups that received intraperitoneal injection of DMSO as a vehicle for 6 weeks. (ii) After 6 weeks one of the Sham groups was waited for 30 days (S+30; n=5) and (iii) the other Sham group was waited for 60 days (S+60; n=6) and sacrificed (iv). Every three days, rats received intraperitoneal injections of 10 mg/kg body weight AA for six weeks to induce AA group (n=6). After AA was taken, we waited six weeks thus we made a model of CKD. Then AA group was sacrificed. In hAMSCs groups, after rats were received AA for six weeks, 6×10^5 hAMSCs were injected from in the tail vein with 500 μ l DMEM medium. (v) One of hAMSCs group was waited for 30 days (AA+hAMSCs+30; n=5) and (vi) the other MSCs group was waited 60 days (AA+hAMSCs+60; n=6) and sacrificed. Furthermore, all-cell treated rats received daily subcutaneous injections of cyclosporine A (1 mg/day, Cell Signaling, Danvers, USA), starting one day before engraftment and continuing for seven days after engraftment.

Functional and histological damage assessment

Functional damage was evaluated by serum creatinine and urea levels. Blood samples were collected prior to sacrifice. Serum creatinine was analyzed by creatinine assay kit (Invitrogen, Paisley, UK) according to manufacturer's protocol. BUN was measured by serum urea with urea assay kit according to protocol of manufacturer (Invitrogen, Paisley, UK). Tissue damage was assessed through morphological analysis using Masson's Trichrome and Sirius Red (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) staining. Percentage of fibrosis was measured by Image J (Maryland, USA).

Immunohistochemistry and TUNEL analysis

The immunohistochemical procedure has been described elsewhere (30). Briefly, slides were incubated with primer antibodies that are mouse monoclonal PCNA (1:1000, Cell Signaling), rabbit monoclonal Ki67 (1:100 dilution, Abcam) and mouse monoclonal human anti-Mitochondrial Antibody (1:250 dilution, Abcam), IL-6 (1:100 dilution, Abcam) and Collagen type I (1:100 dilution, Novus), through overnight at 4 °C through overnight at 4 °C. Staining was completed by performing LSAB 2 System-HRP (Dako) and then AEC system was used for developing. Hematoxylin counterstaining was performed.

Apoptosis was determined by terminal transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end-labeling (TUNEL) assay (In situ cell detection kit-POD, Roche, Risch-Rotkreuz, Switzerland) in paraffin-embedded tissue sections according to protocol of the manufacturer.

Western Blotting

Immunoblot analysis were performed as described previously (31). Briefly, Membranes were incubated with PCNA (1:2000 dilution, Cell Signaling, Danvers, USA), p57 (1:250 dilution, Santa Cruz, Dallas, USA), PARP-1 (1:500 dilution, Abcam, Cambridge, UK) and Beta Actin (1:5000 dilution, Abcam, Cambridge, UK) at 4°C through overnight. Then the membranes were incubated with horseradish peroxidase ppconjugated IgG (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) for 2 h at room temperature. SuperSignal CL-HRP Substrate System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) was used for immunolabeling. Membranes were exposed to Hyperfilm (Amersham, Little Chalfont, UK) and analyzed by using Alpha Digi Doc 1000 gel documentation unit (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA).

Statistical analyses

Data were expressed as mean \pm SEM. One way ANOVA test was used to compare means of multiple groups using GraphPad Prism (version 4.0; GraphPad Software, La Jolla, USA). The level of statistical significance was set $p < 0.05$.

Results

Characterization of hAMSCs

Human placenta amnion membrane-derived MSCs that showed fibroblast-like phenotype were isolated. At passage 3, hAMSCs were characterized with cell surface markers by flow cytometry analyses: CD90, CD105, CD73, CD44 positive and negative cocktail containing CD34, CD11b, CD19, CD45 and HLA-DR with isotype controls. The percentages of cell surface markers were 98.8%, 93.5%, 95.3%, 88.6% and 3.9% respectively (Figure 1A-J).

Phase contrast microscopic images of human amniotic membrane MSCs in the second passage are given in Figures 2A and 2B. hMSCs were spindle or triangular shaped and adhered to plastic.

hAMSCs Undergo Adipogenic, Chondrogenic and Osteogenic Differentiation

hAMSCs could differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteocytes. To show lipid droplets, cells were stained with Oil Red O in adipocyte differentiation (Figure 2C). To determine deposition of calcium, cells were stained with Alizarin Red S in osteocyte differentiation (Figure 2D). To determine chondrocytes, cells were stained with Alcian Blue (Figure 2E) and Sirius Red (Figure 2F). While proteoglycans were stained with Alcian blue, collagens were stained with Sirius Red.

Morphological Studies

To evaluate renal histology and determine renal fibrosis, paraffin-fixed specimens were sectioned at a thickness of 5 μ m and stained with Masson's Trichrome (Figure 3A-D) and Sirius Red (Figure 3E-H). Increased extracellular matrix production was shown with Masson's Trichrome. Accumulation of collagen was shown with Sirius Red. There were no significant extracellular matrix and collagen in control and sham groups (S+30, S+60) (Figure 3A) (Figure 3E). Morphological differences were not found between control and sham groups (control and S+60 results not shown). In AA group, significant increase of extracellular matrix was observed near proximal and distal tubules compared to hAMSCs groups (AA+MSCs+30 and AA+MSCs+60) (Figure 3B). Also in AA group, accumulation of collagen was more than MSCs groups at the same area (Figure 3F). Although rats were treated with hAMSCs, Masson's Trichrome and Sirius Red staining showed fibrosis reduction in both AA+hAMSCs groups (Figures 3C and 3D) and (Figures 3G and 3H). The percentage of fibrosis measured with Image J.

MSC tracking

To determine hAMSC localization in kidney tissues, immunohistochemistry analysis was performed. We used human anti-mitochondrial antibody. hAMSC was observed in kidney tissues (Figures 4A and 4B). Furthermore, human decidua tissue was used as a positive control for human anti-mitochondrial immunostaining (Figures 4C and 4D).

Proinflammatory cytokine IL-6 and Fibrosis marker Collagen type I immunostaining

Expressions of the proinflammatory cytokine IL-6 significantly increased in AA group especially in proximal and distal tubule cells. However, after hAMSCs injection expressions decreased both AA+hAMSC+30 and AA+hAMSC+60 groups significantly (Figures 5A-D).

Renal interstitial fibrosis was determined a significant increase in the collagen I protein in AA group compared to control group, sham groups, AA+hAMSC+30 and AA+hAMSC+60 groups. In hAMSCs groups expressions of collagen I decreased significantly (Figures 5E-H).

Proliferation (PCNA and Ki67 staining) and Western blot analysis of PCNA expression

The proliferations markers PCNA and Ki67 were expressed in sham group Kidney Tissue (Figures 6A and 6E). The immunohistochemistry staining of PCNA and Ki67 in AA group kidneys were observed weak signal (Figures 6B and 6F). However, after injection of hAMSCs, in both AA+hAMSCs groups cell proliferation was significantly increased. Increase of PCNA and Ki67 staining were observed especially in proximal and distal tubule cells. PCNA and Ki67 staining were not observed significant differences between AA+hAMSC+30 and AA+hAMSC+60 groups (Figures 6C and 6D, and Figures 6G and 6H). Western blot analysis results showed that PCNA expression was decreased in the AA group compared with control, S+30 and S+60 groups. Furthermore, after hAMSCs injection, expression of PCNA was increased significantly in the AA+hAMSCs groups (Figure 7)

Apoptosis (TUNEL staining) and Western blot analysis of PARP-1 expression

In AA group, numbers of apoptotic cells were observed to increase compared with sham groups (Figures 6K and 6L). When rats treated with hAMSCs, apoptotic cells were reduced significantly in tubules (Figures 6M and 6N). We determined expression of Parp-1 protein as an apoptosis marker. In western blot analysis, Parp-1 expression of AA group was compared with that of control and sham groups. In AA group, apoptosis level was higher than control and sham groups (Figure 7). However, after hAMSCs injection, Parp-1 expression level of both AA+hAMSCs groups was decreased significantly compared with AA group. Therefore, TUNEL results supported western blot analysis of Parp-1 expression (Figure 7).

Western Blot Analysis of p57 expression

In AA group, p57 expression was increased compared with control and sham groups. However, p57 expression level was reduced compared to AA group after hAMSCs injection. Differences were not finding between both hAMSC groups and control and sham groups in expression of p57 significantly (Figure 7).

Functional renal damage studies

Renal function was assessed by serum creatinine and BUN. Therefore, the development of CKD was evaluated in model of AAN. AA group rats showed significantly higher levels of serum creatinine and BUN than normal control and sham groups. When rats were treated with a single intravenous of 6×10^5 hAMSCs after AAN, serum creatinine and BUN levels were decreased significantly according to levels of AA group. Furthermore, creatinine and BUN levels of the both AA+hAMSCs groups were not significantly different from normal control and sham groups (Figure 8).

Discussion

CKD increases day after day as a public health problem. Recently, cell therapies are applying for the repair of kidney injury. More studies, stem cell transplantation was carried out to damage kidney for provision of renal repair (32-36). Human amniotic membrane is thought to be a reservoir of mesenchymal stem cell. For these reason, hAMSCs has been the focus of interest as a source of MSCs in cell transplantation and regenerative medicine. In this study, we showed that a single administration of amniotic membrane derived MSCs prevents CKD after induction of AAN in rats.

Several studies showed that the administration of MSCs protects rats against CKD in different models. To ensure recovery after application of MSCs could be explained by several mechanisms. MSCs can differentiate into kidney cells. One of the mechanisms is paracrine effect. In model of chronic allograft nephropathy, MSCs migrated to the injured tissue and integrated to kidney. Briefly, MSCs has been determined to ameliorate the process of fibrosis when MSCs applied in the CKD model (25, 35, 37, 38).

In present study, CKD model was constituted after 6 weeks AA injection, rats were waited six weeks. Therefore, AA induced CKD model was occurred after total 12 weeks. We determined fibrosis with Masson's Trichrome and Sirius Red staining. In addition expressions of collagen I was determined with immunohistochemistry staining. In AA group, fibrosis increased significantly compared with control and sham groups. Particularly, accumulation of collagen occurred in the vicinity glomeruli, proximal and distal tubules. Recent studies showed that the primarily target of AA is proximal tubules. According to Huang et al, AA applied kidney is showed to increase collagen in interstitial area (39). After hAMSC administration, accumulation of collagen decreased compared with AA group. Therefore, tubular damage was considered to ameliorate after hAMSCs injection.

In CKD, damaged tubular cells, macrophages, accumulating fibroblasts and infiltrating lymphocytes produce cytokines and growth factors, causing the kidneys to become inflammatory. This inflammation leads to interstitial fibrosis (40). Therefore, the levels of expression of the proinflammatory cytokine IL-6 was determined by immunohistochemistry. In AA group, expressions of IL-6 significantly increased. However after hAMSCs injection reduced expressions of IL-6 both AA+hAMSC+30 and AA+hAMSC+60 groups.

Renal functions are damaged rapidly in AAN and end-stage renal failure arises in a few months. Both *in vitro* and *in vivo* studies, specific AA-DNA adduction formation was demonstrated in renal epithelial cells after AA injection and this formation can prevent proximal tubular epithelial cells (PTEC) proliferation capacity. Besides, apoptosis was determined in CKD and this condition was suggested to be mechanism of tubular epithelial cell deletion. Progressing tubular atrophy correlate with unrecoverable regeneration and apoptosis of PTEC. Additionally, staining of Ki67 and PCNA inform about DNA damage. The reduction of PCNA expression in PTECs, AA-DNA addition formation is considered impairment of DNA repair and this situation induces defective cell proliferation and tubular atrophy (11). In present study, AA injected group was observed to decrease PCNA and Ki67 immunohistochemistry staining compared with control and sham groups. The reason for this is due to degradation of DNA repair mechanism, AA-DNA addition formation occurred. This condition indicated that reduction of proliferation in AA injected group. Furthermore, cell death was determined with TUNEL and western blot analysis of PARP-1 protein expression. In accordance with other studies (36, 41) both TUNEL and western blot analysis indicated that apoptosis increased in AA group compared to other groups. Li et al. reported that cell cycle arrest of PTECs was occurred after AA injection (42). We observed that expression of p57 increased in AA group compared with other groups. Therefore, unrecoverable PTECs can lead to apoptosis.

Sun et al. evaluated the use of human amniotic fluid stem cells (hAFSCs) in cell-based therapy (36). They investigated whether hAFSCs effect on interstitial fibrosis in unilateral urethral obstruction which is one of the CKD model. Therefore, proliferation and apoptosis mechanisms of tubular cells were investigated to evaluate therapeutic effect of hAFSCs injection. The mechanism that covers proliferation and apoptosis of tubular epithelial cell includes paracrine effect. Furthermore, proliferation of resident epithelial cells was suggested that a mechanism of basic-repair in ischemia-induced tubular injury model (36)

Gatti et al investigated that MSCs derived microvesicles administration can ameliorate ischemia-reperfusion induced acute kidney disease (AKD) and CKD (41). After injection, microvesicles accumulated in glomeruli and damaged tubules temporarily and they induced proliferation of tubular cell. Furthermore, microvesicles reduced significantly tubular cell apoptosis. These biological effects are specific for MSC derived microvesicles because these effects were not seen in fibroblast derived microvesicles (41).

In this study, fibrosis can be considered to ameliorate due to increasing of renal tissue cell proliferation after hAMSCs administration. This study suggested that hAMSCs have an important role in tubular atrophy and hAMSCs can prevent damage formation in PTECs and other cells. This situation shows that hAMSCs have therapeutic features. In addition to, the increase of proliferation is considered to cause hAMSCs can replace with damaged cell and differentiate into adult tissue cells. Furthermore, hAMSCs have paracrine effects thus they can secrete various growth factors and cytokines.

We observed expression of apoptosis marker and cell cycle inhibitor decreased significantly after hAMSCs administration. Therefore, apoptosis can be prevented due to tubular cell regeneration.

Recent studies were reported that serum creatinine, BUN, urea levels decreased significantly after MSCs injection in various CKD models (26, 41, 43). In present study, when serum creatinine, serum urea and BUN levels were analyzed, we observed to increase in AA group compared with control and sham groups. After hAMSCs administration, levels of serum creatinine, serum urea and BUN decreased significantly. In AA-induced CKD model after hAMSCs injection, reduction of serum creatinine, urea and BUN levels indicate that hAMSCs have renoprotective effects.

Conclusion

Consequently, we suggest that hAMSCs can play an active role to ameliorate renal damage and they can prevent the induction of apoptosis because of fibrosis. Therefore, hAMSCs have therapeutic effect in CKD.

Acknowledgements

This study was supported by Research Foundation of Akdeniz University, Turkey (project number: TYL-2014-131).

Potential Conflict of Interest

The authors have no conflicting financial interest.

REFERENCES

1. Little MH. Regrow or repair: potential regenerative therapies for the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2390-2401
2. Nangaku M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Intern Med* 2004;43:9-17
- 3- Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastre R, But P, Vanherweghem JL. . Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. *Lancet* 1994; 343:174-174
4. De Broe ME. Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy: toward a single entity, aristolochic acid nephropathy. *Kidney Int* 2012;81:513-515
5. Nortier JL, Deschodt-Lanckman MM, Simon S, Thielemans NO, de Prez EG, Depierreux MF, Tielemans CL, Richard C, Lauwerys RR, Bernard AM, Vanherweghem JL. Proximal tubular injury in Chinese herbs nephropathy: monitoring by neutral endopeptidase enzymuria. *Kidney Int* 1997;51:288-293
6. Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, Abramowicz D, Dratwa M, Jadoul M, Richard C, Vandervelde D, Verbeelen D, Vanhaelen-Fastre R. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 1993;341:387-391

7. Schmeiser HH, Bieler CA, Wiessler M, van Ypersele de Strihou C, Cosyns JP. Detection of DNA adducts formed by aristolochic acid in renal tissue from patients with Chinese herbs nephropathy. *Cancer Res* 1996;56:2025-2028
8. Nortier JL, Martinez MC, Schmeiser HH, Arlt VM, Bieler CA, Petein M, Depierreux MF, De Pauw L, Abramowicz D, Vereerstraeten P, Vanherweghem JL. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *N Engl J Med* 2000;342:1686-1692
9. Lebeau C, Arlt VM, Schmeiser HH, Boom A, Verroust PJ, Devuyst O, Beauwens R. Aristolochic acid impedes endocytosis and induces DNA adducts in proximal tubule cells. *Kidney Int.* 2001;60:1332-1342
10. Lebeau C, Debelle FD, Arlt VM, Pozdzik A, De Prez EG, Phillips DH, Deschodt-Lanckman MM, Vanherweghem JL, Nortier JL. Early proximal tubule injury in experimental aristolochic acid nephropathy: functional and histological studies. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:2321-2332
11. Pozdzik AA, Salmon IJ, Debelle FD, Decaestecker C, Van den Branden C, Verbeelen D, Deschodt-Lanckman MM, Vanherweghem JL, Nortier JL. Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation. *Kidney Int* 2008;73:595-607
12. Soylemezoglu O, Wild G, Dalley AJ, MacNeil S, Milford-Ward A, Brown CB, el Nahas AM. Urinary and serum type III collagen: markers of renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant.* 1997; 12: 1883-1889
- 13- Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7:684-696
- 14- Sun D, Feng J, Dai C, Sun L, Jin T, Ma J, Wang L. Role of peritubular capillary loss and hypoxia in progressive tubulointerstitial fibrosis in a rat model of aristolochic acid nephropathy. *Am J Nephrol* 2006; 26: 363-371
15. Yang L, Li X, Wang H. Possible mechanisms explaining the tendency towards interstitial fibrosis in aristolochic acid-induced acute tubular necrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:445-456
16. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:568-584
17. Lange C, Tögel F, Itrich H, Clayton F, Nolte-Ernsting C, Zander AR, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Kidney Int* 2005;68:1613-1617
18. Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Müller-Newen G, Yu D, Floege J. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2202-2212
19. Bi B, Schmitt R, Israilova M, Nishio H, Cantley LG. Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2486-2496
20. Hopkins C, Li J, Rae F, Little MH. Stem cell options for kidney disease. *J Pathol* 2009;217: 265-281
21. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-317
22. Jin CZ, Park SR, Choi BH, Lee KY, Kang CK, Min BH. Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. *Tissue Eng* 2007;13:693-702

23. Diaz-Prado S, Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T, Rendal-Vazquez ME, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, Blanco FJ. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J Cell Biochem* 2010;111:846-857
24. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strom SC. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2008;26:300-11
25. Choi S, Park M, Kim J, Hwang S, Park S, Lee Y. The role of mesenchymal stem cells in the functional improvement of chronic renal failure. *Stem Cells Dev* 2009;18:521-529
26. Semedo P, Correa-Costa M, Antonio Cenedeze M, Maria Avancini Costa Malheiros D, Antonia dos Reis M, Shimizu MH, Seguro AC, Pacheco-Silva A, Saraiva Camara NO. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem Cells* 2009;27:3063-3073
27. Villanueva S, Ewertz E, Carrion F, Tapia A, Vergara C, Cespedes C, Saez PJ, Luz P, Irarrazabal C, Carreno JE, Figueroa F, Vio CP. Mesenchymal stem cell injection ameliorates chronic renal failure in a rat model. *Clin Sci (Lond)*. 2011;121:489-499
28. Klinkhammer BM, Kramann R, Mallau M, Makowska A, van Roeyen CR, Rong S, Buecher EB, Boor P, Kovacova K, Zok S, Denecke B, Stuetgen E, Otten S, Floege J, Kunter U. Mesenchymal stem cells from rats with chronic kidney disease exhibit premature senescence and loss of regenerative potential. *PLoS One* 2014;9:e92115
29. Soncini M, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, Denegri M, Albertini A, Wengler GS, Parolini O. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1:296-305
30. Korgun ET, Celik-Ozenci C, Seval Y, Desoye G, Demir R. Do glucose transporters have other roles in addition to placental glucose transport during early pregnancy? *Histochem Cell Biol*. 2005; 123:621-9
31. Ozmen, A, Unek G, Kipmen-Korgun D, Korgun ET. The expression of Akt and ERK1/2 proteins decreased in dexamethasone-induced intrauterine growth restricted rat placental development. *J Mol Histol* 2011;42:237-249
32. Lin F, Cordes K, Li L, Hood L, Couser WG, Shankland SJ, Igarashi P. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1188-1199
33. Broekema M, Harmsen MC, Koerts JA, Petersen AH, van Luy MJ, Navis G, Popa ER. Determinants of tubular bone marrow-derived cell engraftment after renal ischemia/reperfusion in rats. *Kidney Int* 2005;68:2572-2581
34. Fang TC, Otto WR, Rao J, Jeffery R, Hunt T, Alison MR, Cook HT, Wright NA, Poulosom R. Haematopoietic lineage-committed bone marrow cells, but not cloned cultured mesenchymal stem cells, contribute to regeneration of renal tubular epithelium after HgCl₂ -induced acute tubular injury. *Cell Prolif* 2008;41:575-591
35. Humphreys BD, Bonventre JV. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Annu Rev Med* 2008;59:311-325
36. Sun D, Bu L, Liu C, Yin Z, Zhou X, Li X, Xiao A. Therapeutic effects of human amniotic fluid-derived stem cells on renal interstitial fibrosis in a murine model of unilateral ureteral obstruction. *PLoS One* 2013;8:e65042

37. Cosyns JP, Dehoux JP, Guiot Y, Goebbels RM, Robert A, Bernard AM, van Ypersele de Strihou C. Chronic aristolochic acid toxicity in rabbits: a model of Chinese herbs nephropathy? *Kidney Int* 2001;59:2164-2173

38. Inumaru J, Nagano O, Takahashi E, Ishimoto T, Nakamura S, Suzuki Y, Niwa S, Umezawa K, Tanihara H, Saya H. Molecular mechanisms regulating dissociation of cell-cell junction of epithelial cells by oxidative stress. *Genes Cells* 2009;14:703-716

39. Huang L, Scarpellini A, Funck M, Verderio EA, Johnson TS. Development of a chronic kidney disease model in C57BL/6 mice with relevance to human pathology. *Nephron Extra* 2013;3:12-29

40- Grande MT, Pérez-Barriocanal F, López-Novoa JM. Role of inflammation in túbulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy. *J Inflamm (Lond)* 2010;7:19

41. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:1474-1483

42. Li Y, Liu Z, Guo X, Shu J, Chen Z, Li L. Aristolochic acid I-induced DNA damage and cell cycle arrest in renal tubular epithelial cells in vitro. *Arch Toxicol* 2006;80:524-532

43. Cavaglieri RC, Martini D, Sogayar MC, Noronha IL. Mesenchymal stem cells delivered at the subcapsule of the kidney ameliorate renal disease in the rat remnant kidney model. *Transplant Proc* 2009;41:947-951

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. hAMSC characterization. Flow cytometry analysis of hAMSCs for CD90 (A, B), CD105 (C, D), CD73 (E, F), CD44 (G, H) and negative cocktail (I, J) with isotype controls.

Fig. 2. Phase contrast microscopic images of human amniotic membrane derived mesenchymal stromal cells in 4X (A) and 40X magnifications (B). hAMSCs were differentiated into adipocytes (C., as shown by Oil Red O staining), osteocytes (D., as shown by Alizarin Red S staining) and chondrocytes (E and F, as shown by Alcian Blue and Sirius Red staining).

Fig. 3. Masson's Trichrome was performed to determine fibrosis in sham+30 (A), AA (B), AA+hAMSC+30 (C) and AA+hAMSC+60 (D) groups. Sirius Red staining was showed sham+30 (E), AA (F), AA+hAMSC+30 (G) and AA+hAMSC+60 (H) groups respectively.

Fig. 4. At 30 day hAMSCs tracking in kidney tissue with immunolabeling of human anti-mitochondrial antibody (A x40, B x100). Positive control is human decidua tissue (C x40, D x100).

Fig 5. A, Immunohistochemical staining of kidney tissue sections for the sham+30, AA, AA+hAMSC+30 and AA+hAMSC+60 groups using IL-6 (a-d), Collagen-I (e-h)

B and C, H scores of IL-6 and Collagen-I. Values presented as mean \pm SD. AA group compared with Sham, Control, AA+hAMSC+30, and AA+hAMSC+60 groups. Values statistically significant at: * $p < 0.05$, Sham and Control groups compared with AA and hAMSC groups; # $p < 0.05$

Fig. 6. PCNA, Ki67 and TUNEL immunostaining in kidneys tissue for the control, sham+30 (A), AA (B), AA+hAMSC+30 (C) and AA+hAMSC+60 (D) groups, for Ki67 sham+30 (E), AA (F), AA+hAMSC+30 (G) and AA+hAMSC+60 groups (H) and for TUNEL immunostaining sham+30 (K), AA (L), AA+hAMSC+30 (M) and AA+hAMSC+60 (N) groups.

Fig. 7. Western blot results of PCNA, p57, total PARP and cleaved-PARP. AA administration caused increased PARP and p57 expressions but decreased PCNA compared with control, sham+30 and sham+60. After hAMSC administration PARP and p57 expressions decreased and PCNA expression increased significantly. Protein levels between AA+hAMSC+30 and AA+hAMSC+60 were not statistically significant. All results were normalized to beta actin. Graphics represent means of optical densitometry measurements. * $p < 0.005$.

Fig. 8. Functional damage assessment. Serum creatinine (a), serum urea (b) and BUN (c) levels were determined. AA administration caused increased serum creatinine, serum urea and BUN compared to control and sham groups significantly. After hAMSC administration, serum creatinine, serum urea and BUN levels decreased significantly. Graphics represent means of optical densitometry measurements. * $p < 0.005$.

PS007 – Development Of Gene Editing Strategies For Human β -GLOBIN (HBB) Gene Mutations

Batuhan Mert Kalkan¹, Ezgi Yagmur Kala¹, Melek Yuçe², Medine Karadag Alpaslan²,
Fatih Kocabas³

¹Koc University, Istanbul, Turkey

²Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey

³Yeditepe University, Istanbul, Turkey

Sickle cell disease (SCD), is a devastating disease with significant morbidity and mortality and affect millions of people worldwide. The disease is defined as a monogenic blood disease caused by a point mutation in the human β -globin gene encoding the subunits of hemoglobin. Recent advances in gene editing technology have made it possible to make the desired changes in the DNA sequence using programmable endonucleases. These novel gene editing tools are promising candidates for clinical applications in the treatment of genetic disorders such as SCD, a hereditary monogenic disorder caused by point mutations in the HBB.

In this study, it was aimed to target HBB gene via CRISPR/Cas9 genome editing tool to introduce nucleotide alterations for efficient genome editing and correction of point mutations causing SCD in human cell line, by Homology Directed Repair (HDR).

As a result of the study, the target specific nucleotide changes in the HBB gene could be induced in the locus of the mutation causing SCD. The effect of on-target activity of standard-gRNA and the newly developed long gRNA were investigated. It was observed that longer gRNA has higher affinity to target DNA while having the same performance for targeting and Cas9 induced DSBs. The HDR mechanism was triggered by co-delivery of donor DNA repair templates in circular plasmid form. As a result, we have suggested methodological roadmap for efficient targeting with higher affinity to target DNA and generating desired modifications on HBB gene.

Keywords: Sickle cell disease, thalassemia, anemia, gene regulation, CRISPR / Cas9

PS008 - MCF-7 Hücre Hattında Twist1 Geni Transfeksiyonunun Radyasyon Duyarlılığına Etkisi

Bahadır ÖZTÜRK¹, Güler YAVAŞ², Suray PEHLİVANOĞLU³, İlkey SAK¹, Hilal TESTİCİ¹

¹ Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı, Konya-Türkiye

² Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim dalı, Konya-Türkiye

³ Necmettin Erbakan Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalı, Konya-Türkiye

Özet:

Meme kanseri gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kadınlarda görülen kanserlerin %33'üne ve kanserle ilişkili ölümlerin %20'sine neden olmaktadır. MCF-7 insan meme adenokarsinomundan türetilmiş ve hücre zarında östrojen hormon reseptörü (ER), progesteron hormon reseptörü (PR) bulunduran ancak insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) reseptörünü bulundurmayan bir epitel kanser hücre dizisidir [1].

Twist1, hücreleri epitelyal mezenkimal geçişe teşvik ederek hücre metastazını destekleyen bir onkogen olarak tanımlanmıştır. Twist1 olması gerekenden başka bir bölgede ekspresyonun sağlanmasıyla, E-Kaderin ekspresyonunu baskılamakta ve mezenkimal belirteçlerde artış ve beraberinde hücre motilitesinde artışa yol açmaktadır [2].

Epitelyal mezenkimal geçiş radyasyon direnci ile ilişkilidir. Twist1 bir epitel mezenkimal geçiş düzenleyicisi olduğundan, radyasyon direnci ile ilgili olabilecek potansiyel bir faktör olabilmektedir [3].

Radyasyon tedavisi birçok kanser türü için kullanılan bir tedavi yöntemidir. İyonize radyasyon(IR) tedavisi, iltihaplı süreçleri aktive ederek hücre sağkalımını etkileyebilecek çok miktarda molekülün salınmasına neden olur. Radyasyon, kanser hücrelerinin canlılığını azaltmadaki doğrudan etkisinin yanında, tümör büyüme ve gelişmesini etkileyebilecek lokal mikro ortamlarda değişikliklere neden olabilmektedir. Meme kanserinde kullanılan IR, tümör eksizyonu sonrasında kalan rezidü hücreleri ortadan kaldırmak için kullanılmaktadır [4].

Bu çalışmada, Twist1 geni ile transfekte edilmiş MCF-7 hücre hattına farklı dozlarda uygulanan iyonize radyasyonun etkilerini incelemek amaçlanmıştır.

Yöntem ve gereçler:

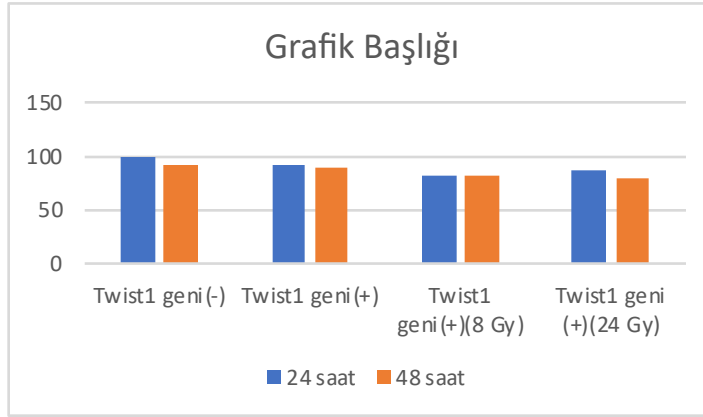
MCF-7 hücreleri 10% fetal bovine serum içeren Dulbecco's modified Eagle's medium'da 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda kültüre edildi. %70-80 konfluent olan hücreler transfeksiyon deneyi için kullanıldı. Escherichia coli DH5a bakterisi suşundan izole edilen Twist1 geni pozitif pcDNA3.1 vektörleri MCF-7 hücrelerine lipofectamine 2000 (invitrogen) yardımıyla transfekte edildikten sonra kültür işlemine devam edildi [2].

Hücrelere radyasyon uygulanması

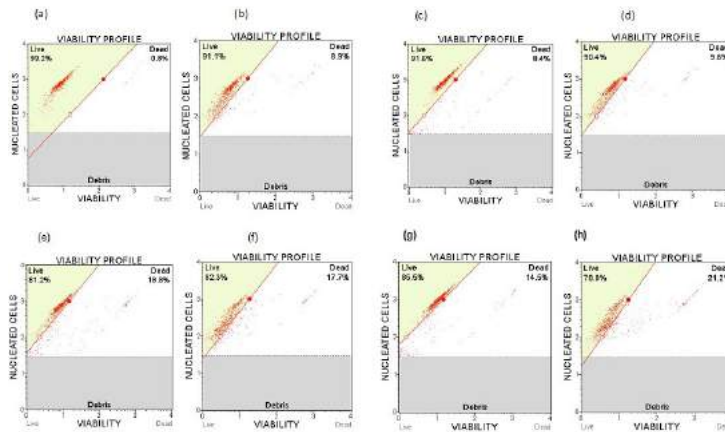
Twist1 geni ile transfekte hücreler konfluense olduktan sonra 1x10⁶ hücre olacak şekilde üç grup olarak petri kaplarına pasajlandı. Birinci grup kontrol olarak, ikinci gruba 8 Gy, üçüncü gruba ise 24 Gy dozlarında iyonize radyasyon (NOVAC7 İntraoperatif Elektronik Radyasyon Tedavi Sistemi) uygulandı [3]. Hücrelerin sayı ve canlılık durumu radyasyon uygulamasından 24 saat ve 48 saat sonra Flow Sitometri cihazında (Muse Cell Analyzer, Merck Millipore), sayı ve canlılık testiyle analiz edildi.

Bulgular:

Twist1 geni transfeksiyon işleminden sonra üç farklı petri kabına ayrılan hücreler sırasıyla kontrol, 8 Gy ve 24 Gy radyasyon uygulanan gruplara ayrıldı. Ayrıca MCF-7 hücresi de kontrol olarak kullanıldı. Twist1 geniyle transfekte edilmiş MCF-7 hücrelerinde sayı ve canlılık incelendi. IR uygulanmamış kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. Kontrol MCF-7 hücreleri, IR uygulanmamış Twist1 geni transfekte MCF-7 hücreleri ve IR uygulanmış (8 ve 24 Gy) Twist1 geniyle transfekte MCF-7 hücreleri karşılaştırıldı. 8 Gy ve 24 Gy radyasyon verilmiş hücrelerin sayı ve canlılık oranında 24 saat ve 48 saat sonunda kontrol gruplarına göre bir farklılık görülmedi. (Tablo 1, Şekil 1)



Tablo 1: Twist1 geni transfekte ve transfekte olmayan MCF-7 hücrelerinde IR uygulama sonrası sayı ve canlılık yüzde oranları.



Şekil 1: (a,b) Twist1 geniyle transfekte edilmemiş, radyasyon uygulanmamış MCF-7 hücrelerinin 24 saat ve 48 saat sayı ve canlılık flow sitometri sonuçları, (c,d) Twist1 geni transfekte edilmiş, radyasyon uygulanmamış MCF-7 hücrelerinin 24 saat ve 48 saat sayı ve canlılık flow sitometri sonuçları, (e,f) Twist1 geni transfekte edilmiş 8 Gy radyasyon uygulanmış MCF-7 hücrelerinin 24 saat ve 48 saat sayı ve canlılık flow sitometri sonuçları, (g,h) Twist1 geni transfekte edilmiş 24 Gy radyasyon uygulanmış MCF-7 hücrelerinin 24 saat ve 48 saat sayı ve canlılık flow sitometri sonuçları.

Tartışma:

Literatür incelendiğinde, Twist1 kanser metastazının ana düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. Meme kanseri, tiroit kanseri, akciğer kanseri, mide karsinomu, kolorektal kanser, hepatoselüler karsinom, pankreas kanseri gibi maling tümörlerde fazla eksprese edilir. Twist1 geni ekspresyonunun down regülasyonunun in vivo olarak akciğer kanseri metastazını azalttığı gözlemlenmiştir [5].

Birçok metastatik meme kanseri hücre hattında Akt2 ve Twist1 seviyeleri birbirlerine pozitif olarak bağımlıdır. Akt2, Twist1 üzerinde düzenleyici bir etkiye sahiptir. MCF-7 hücrelerinde, Akt2 aktivasyonu, Ser42 rezidüsünde Twist1 fosforilasyonuna yol açar. Twist1 fosforilasyonu radyasyon tedavisi ile indüklenen DNA hasarına cevaben p53 seviyelerinin azalmasına ve p53 kaynaklı apoptozun baskılanmasına yol açarak hücre sağkalımını arttırmıştır [6]. Bizim çalışmamızda ise MCF-7 hücrelerinde Twist1 geni transfeksiyonuyla hücrelerde radyasyon duyarlılığı üzerinde bir etki görülmemiştir.

Kaynaklar:

1. [Teles RHG¹](#), [Moralles HF²](#), [Cominetti MR¹](#), Global trends in nanomedicine research on triple negative breast cancer: a bibliometric analysis, [Int J Nanomedicine](#). 2018 Apr 17;13:2321-2336.
2. Aktaş Kont K, Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Twist1 Transkripsiyon Faktörünün Glikoz Metabolizmasındaki Rolünün Araştırılması, Konya-2018
3. Valentina Bravatà, Luigi Minafra, Giusi Irma Forte, Francesco Paolo Cammarata, Giorgio Russo, Federica Maria Di Maggio, Giuseppa Augello, Domenico Lio & Maria Carla Gilardi, Cytokine profile of breast cell lines after different radiation doses, *International Journal of Radiation Biology*, 93:11, 1217-1226,
4. [Zang C¹](#), [Liu X¹](#), [Li B²](#), [He Y¹](#), [Jing S¹](#), [He Y¹](#), [Wu W¹](#), [Zhang B¹](#), [Ma S¹](#), [Dai W¹](#), [Li S¹](#), [Peng Z¹](#). IL-6/STAT3/TWIST inhibition reverses ionizing radiation-induced EMT and radioresistance in esophageal squamous carcinoma. *Oncotarget*. 2017 Feb 14;8(7):11228-11238
5. [Ren H¹](#), [Du P¹](#), [Ge Z²](#), [Jin Y¹](#), [Ding D³](#), [Liu X⁴](#), [Zou Q¹](#) TWIST1 and BMI1 in Cancer Metastasis and Chemoresistance, [J Cancer](#). 2016 May 25;7(9):1074-80
6. Lucí'lia Pereira¹, Sara Horta², Rita Mateus² and Mafalda A. Videira², Implications of Akt2/Twist crosstalk on breast cancer metastatic outcome, *Drug Discovery Today*, Volume 20, Number 9, September 2015

Anahtar Kelime: Meme kanseri, MCF-7, Twist1, Radyasyon, Sayı&Canlılık

PS009 -MDA-MB 231 hücre hattında twist1 antisense gen transfeksiyonunun radyasyon duyarlılığına etkisi

Bahadır ÖZTÜRK¹, Güler YAVAŞ², Suray PEHLİVANOĞLU³, İlkay SAK¹, Hilal TESTİCİ¹, İlker GÜVEN¹

¹Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı, Konya-Türkiye

²Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim dalı, Konya-Türkiye

³Necmettin Erbakan Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalı, Konya-Türkiye

ÖZET: Meme kanseri, dünya çapında kadınlarda en sık teşhis edilen malignitedir ve kanserin ikinci ölüm nedenidir (1).MDA-MB 231 insan meme adenokarsinomundan türetilmiş ve hücre zarında östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2(HER2) ifadelerinin eksikliği ile üçlü negatif meme kanseri (TNBC)olarak tanımlanan ve meme kanserinin yaklaşık% 15-20'sini oluşturan bir epitel kanser hücre dizisidir (2).

Antiapoptotik ve prometastatik bir transkripsiyon faktörü olan TWIST1, düzenleyici temel bir sarmal ilmek-sarmal (bHLH) transkripsiyon faktörleri ailesinin oldukça korunmuş bir üyesidir ve birçok kanser hücresi tipinde migrasyondan sorumludur (3,4).Twist1 aynı zamanda E-cadherin baskılanması ve N- cadherinin indüksiyonu yoluyla epitelyal mezenkimal geçişi (EMT) düzenlemektedir (4,5).Twist1'in, çok çeşitli insan kanserlerinde, apoptozu inhibe ederek ve DNA hasarı veya onkogen aktivasyonu sonrasında hücre sağkalımını teşvik ederek onkogeneze yer aldığına dair birçok yayın vardır (6).

Radyasyon tedavisi (RT), kanser hücrelerinde DNA hasarına neden olur, bu da hücre ölümünün ardından büyüme inhibisyonuna yol açar(7). RT, üçlü negatif meme kanseri (TNBC) tedavisi için birincil yöntemlerden biridir (8).

Kanser için en yaygın kullanılan tedavi yöntemlerinden biri olan iyonize radyasyon (IR), DNA çift sarmalının kopmasına neden olur ve tümör döngüsünün durmasını ve/veya kanser hücrelerinin ölümünü indükleyerek tümörlerin büyümesini önler (9, 10). IR maruziyeti apoptoz ve senesens gibi çeşitli hücre reaksiyonlarına neden olabilir (11).

Bu çalışmanın amacı, Twist1 antisens geni ile transfekte edilmiş MDA-MB 231 hücre hattına farklı dozlarda uygulanan iyonize radyasyonun etkilerinin incelenmesidir.

YÖNTEM VE GEREÇLER:

Hücre kültürü ve Transfeksiyon

MDA-MB 231 hücreleri 10% fetal bovine serum içeren Dulbecco's modified Eagle's medium'da 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda kültüre edildi.%70 konfluent olan hücreler transfeksiyon deneyi için kullanıldı. Escherichia coli DH5a bakterisi suşundan izole edilen twist1 antisens pozitif pcDNA3.1 vektörleri MDA-MB 231 hücrelerine lipofectamine 2000(invitrogen) yardımıyla transfekte edildikten sonra kültür işlemine devam edildi(12).

Hücrelere radyasyon uygulanması

Twist1 antisens ile transfekte hücreler konfluense olduktan sonra 1x10⁶ hücre olacak şekilde üç grup olarak kültür kaplarına pasajlandı. Birinci grup kontrol olarak kullanıldı ikinci gruba 8 Gy üçüncü gruba ise 24 Gy dozlarında iyonize radyasyon (NOVAC7 İntraoperatif Elektron Radyasyon Tedavi Sistemi) uygulandı (13). Hücrelerin apoptotik durumu uygulamadan 24 saat ve 48 saat sonra Flow Sitometri cihazında (Muse Cell Analyzer, Merck Millipore), Annexin V-Dead cell testiyle analiz edildi.

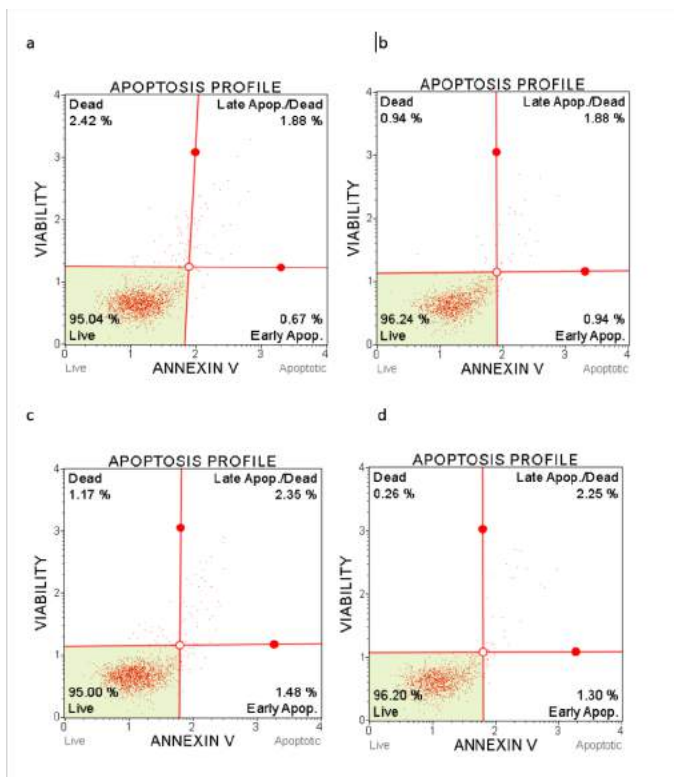
BULGULAR:

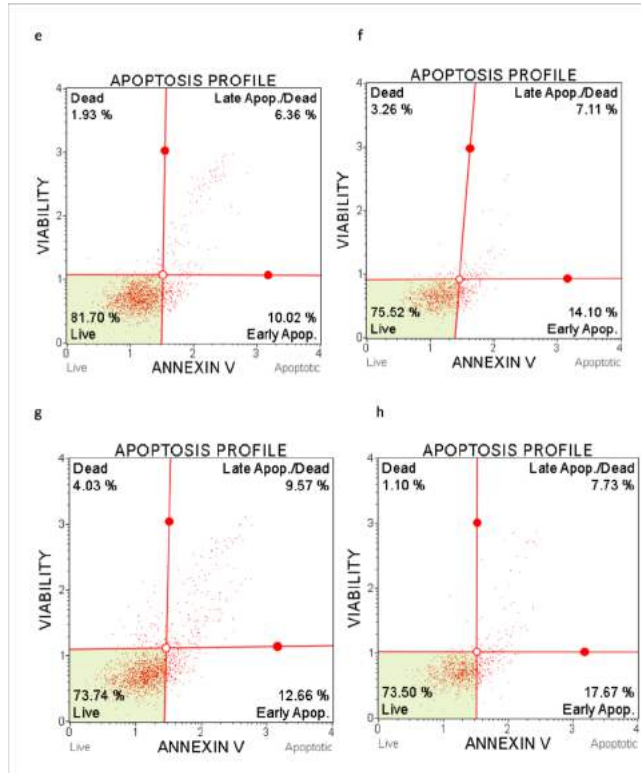
Transfeksiyon işleminden sonra üç ayrı kültür kabına ayrılan hücreler sırasıyla kontrol, 8 Gy radyasyon uygulanan ve 24 Gy radyasyon uygulanan gruplara ayrıldı. Bunun yanında MDA-MB 231 hücresi de kontrol olarak kullanıldı. Twist1 antisensle transfekte MDA-MB 231 hücrelerinin apoptozu incelendi. IR uygulanmamış kontrol grupları arasında total apoptoz oranında fark görülmedi. Kontrol MDA-MB 231 hücreleri, IR uygulanmamış twist1 antisens transfekte MDA-MB 231 hücreleri ve IR uygulanmış (8 Gy, 24 Gy) twist1 antisensle transfekte MDA-MB 321 hücreleri karşılaştırıldı. 8 Gy ve 24 Gy radyasyona maruz kalan hücrelerin 24 ve 48 saat sonra kontrol gruplarına göre total apoptoz miktarları artmış olduğu görüldü (Tablo 1, Şekil 1).

Tablo 1

Apoptoz yüzde oranı	Apoptoz yüzde oranı			
	0 Gy(Tw1 AS-)	0 Gy(Tw1 AS+)	8 Gy(Tw1 AS+)	24 Gy(Tw1 AS+)
■ 24 saat	2,55	3,83	16,38	22,23
■ 48 saat	2,82	3,55	21,21	25,4

Tablo 1: Twist1 Antisens(AS) transfekte ve transfekte olmayan MDA-MB 231 hücrelerinde radyasyon uygulama sonrası apoptoz yüzde oranları.





Şekil 1: Twist1 antisens geniyle transfekte edilmemiş radyasyon verilmemiş MDA-MB 231 hücrelerinin 24 ve 48 saat Annexin V flow sitometri sonuç grafiği (a,b). Twist1 antisens geniyle transfekte edilmiş radyasyon verilmemiş MDA-MB 231 hücrelerinin 24 ve 48 saat Annexin V flow sitometri sonuç grafiği (c,d). Twist1 antisens geniyle transfekte edilmiş 8 Gy radyasyon verilmiş MDA-MB 231 hücrelerinin 24 ve 48 saat Annexin V flow sitometri sonuç grafiği (e,f). Twist1 antisens geniyle transfekte edilmiş 24 Gy radyasyon verilmiş MDA-MB 231 hücrelerinin 24 saat,48 saat Annexin V flow sitometri sonuç grafiği (g,h).

TARTIŞMA

Twist1, kanser hücrelerinde motilite, invazivlik ve anjiyogenez oluşumunun artırılması dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Literatür incelendiğinde Twist1 transfeksiyonlu Nazofarenks mukozal epitelinden kaynaklanan nazofrenks karsinomu (NPC) hücreleri radyasyona maruz kaldıktan sonra twist1 hücrelerin apoptozunu inhibe ettiği bildirilmiştir (14). Twist1 geni ile transfeksiyonun Özefagus skuamöz karsinomunda radyasyona maruziyetle hücrelerin apoptozunu arttırdığı ifade edilmiştir (15). H1299 ve H460 insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücrelerine siRNA transfeksiyonu sonucu twist1 seviyesi düşürülmüş ve NSCLC'lerde arsenik trioksit ve iyonize radyasyon kaynaklı hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir (16). Bizim çalışmamızda da MDA-MB 231 hücrelerine Twist1 antisense geni transfeksiyonu sonucunda radyasyon uygulamasının apoptozu arttırdığı görülmüştür.

KAYNAKÇA

- 1-[Kirkham AA](#)¹, [Baudry RI](#)², [Paterson DJ](#)³, [Mackey JR](#)⁴, [Haykowsky MJ](#)⁵. Curing breast Cancer and killing the heart: A novel model to explain elevated cardiovascular disease and mortality risk among women with early stage breast Cancer. [Prog Cardiovasc Dis](#). 2019 Feb 21
- 2-[Hong Y](#)¹, [Fan D](#)². Ginsenoside Rk1 induces cell cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cells. [Toxicology](#). 2019 Feb 21
- 3-[Qi W](#)^{1,2}, [Yang Z](#)^{1,2}, [Li H](#)^{1,2}, [Cui Y](#)³, [Xuan Y](#)^{1,2}. The role of Tenascin-C and Twist1 in gastric cancer: cancer progression and prognosis. [APMIS](#). 2019 Feb;127(2):64-71.
- 4-[Gort EH](#)¹, [Suijkerbuijk KP](#), [Roothaan SM](#), [Raman V](#), [Vooijs M](#), [van der Wall E](#), [van Diest PJ](#). Methylation of the TWIST1 promoter, TWIST1 mRNA levels, and immunohistochemical expression of TWIST1 in breast cancer. [Cancer Epidemiol Biomarkers Prev](#). 2008 Dec;17(12):3325-30
- 5-[Tsukamoto H](#)¹, [Shibata K](#), [Kajiyama H](#), [Terauchi M](#), [Nawa A](#), [Kikkawa F](#). Irradiation-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) related to invasive potential in endometrial carcinoma cells. [Gynecol Oncol](#). 2007 Dec;107(3):500-4. Epub 2007 Oct 1.
- 6-[Vichalkovski A](#)¹, [Gresko E](#), [Hess D](#), [Restuccia DF](#), [Hemmings BA](#). PKB/AKT phosphorylation of the transcription factor Twist-1 at Ser42 inhibits p53 activity in response to DNA damage. [Oncogene](#). 2010 Jun 17;29(24):3554-65
- 7-[Wu SY](#)^{1,2}, [Chen CL](#)³, [Tseng PC](#)^{4,5}, [Chiu CY](#)⁴, [Lin YE](#)⁴, [Lin CF](#)^{4,5}. Fractionated ionizing radiation facilitates interferon- γ signaling and anticancer activity in lung adenocarcinoma cells. [J Cell Physiol](#). 2019 Feb 14
- 8-[Zhou KX](#)¹, [Xie LH](#)², [Peng X](#)³, [Guo QM](#)⁴, [Wu QY](#)⁴, [Wang WH](#)⁴, [Zhang GL](#)⁴, [Wu JF](#)⁴, [Zhang GJ](#)⁵, [Du CW](#)⁶. CXCR4 antagonist AMD3100 enhances the response of MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells to ionizing radiation. [Cancer Lett](#). 2018 Apr 1;418:196-203
- 9-[Wang Y](#)¹, [Wang Y](#)², [Liu S](#)³, [Liu Y](#)⁴, [Xu H](#)⁵, [Liang J](#)⁶, [Zhu J](#)⁷, [Zhang G](#)⁸, [Su W](#)⁹, [Dong W](#)¹⁰, [Guo Q](#)¹¹. Upregulation of EID3 sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation-induced cellular senescence. [Biomed Pharmacother](#). 2018 Nov;107:606-614
- 10-[Liakou E](#)¹, [Mavrogonatonou E](#)¹, [Pratsinis H](#)¹, [Rizou S](#)², [Evangelou K](#)², [Panagiotou PN](#)³, [Karamanos NK](#)⁴, [Gorgoulis VG](#)^{2,5,6}, [Kletsas D](#)¹. Ionizing radiation-mediated premature senescence and paracrine interactions with cancer cells enhance the expression of syndecan 1 in human breast stromal fibroblasts: the role of TGF- β . [Aging \(Albany NY\)](#). 2016 Aug;8(8):1650-69.
- 11-[Nguyen HQ](#)¹, [To NH](#)², [Zadigue P](#)³, [Kerbrat S](#)⁴, [De La Taille A](#)⁵, [Le Gouvello S](#)⁶, [Belkacemi Y](#)⁷. Ionizing radiation-induced cellular senescence promotes tissue fibrosis after radiotherapy. A review. [Crit Rev Oncol Hematol](#). 2018 Sep;129:13-26
- 12-Aktaş Kont K, Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Twist1 Transkripsiyon Faktörünün Glikoz Metabolizmasındaki Rolünün Araştırılması, Konya-2018
- 13-Valentina Bravatà, Luigi Minafra, Giusi Irma Forte, Francesco Paolo Cammarata, Giorgio Russo, Federica Maria Di Maggio, Giuseppa Augello, Domenico Lio & Maria Carla Gilardi, Cytokine profile of breast cell lines after different radiation doses, [International Journal of Radiation Biology](#), 93:11, 1217-1226,
- 14-[Linli Zhang](#)¹, [Beibei Su](#)¹, [Wei Sun](#)¹, [Wenwen Li](#)¹, [Min Luo](#)¹, [Dongbo Liu](#)¹, [Qi Mei](#)¹, [Guoxian Long](#)¹, [Guangyuan Hu](#)¹ and [Guoqing Hu](#)¹ Twist1 promotes radioresistance in nasopharyngeal carcinoma [Oncotarget](#). 2016 Dec 6; 7(49): 81332-81340.
- 15-[Zang C](#)¹, [Liu X](#)¹, [Li B](#)², [He Y](#)¹, [Jing S](#)¹, [He Y](#)¹, [Wu W](#)¹, [Zhang B](#)¹, [Ma S](#)¹, [Dai W](#)¹, [Li S](#)¹, [Peng Z](#)¹. IL-6/STAT3/TWIST inhibition reverses ionizing radiation-induced EMT and radioresistance in esophageal squamous carcinoma. [Oncotarget](#). 2017 Feb 14;8(7):11228-11238
- 16-[Seo SK](#)¹, [Kim JH](#)¹, [Choi HN](#)¹, [Choe TB](#)², [Hong SI](#)³, [Yi JY](#)⁴, [Hwang SG](#)¹, [Lee HG](#)⁵, [Lee YH](#)⁶, [Park IC](#)⁷. Knockdown of TWIST1 enhances arsenic trioxide- and ionizing radiation-induced cell death in lung cancer cells by promoting mitochondrial dysfunction. [Biochem Biophys Res Commun](#). 2014 Jul 11;449(4):490-5.

PS010 - Effects of Pineapple Derived Exosomes on Human Adipose Stem Cells

İrem Özkan¹, Neslihan Taşlı¹, Beyza Mat¹, Murat Özpolat¹, Merve Yıldırım¹, Polen Koçak¹,
Fikretin Şahin¹

¹ Department of Genetics and Bioengineering, Faculty of Engineering and Architecture, Yeditepe University, 26 Ağustos Campus, Kayisdagi cad., Kayisdagi, TR-34755 Istanbul, Turkey.

Objective

Secreted from all types of cells, exosomes are nanosized vesicles with their sizes ranging between 30-100 nm. Although it is well known fact that the communication between eukaryotic cells are carried out through exosome secretion, the role of plants exosomes remain unexplored. Here, we examined for the first time the effects of pineapple exosomes on human adipose stem cells. In order to achieve that, first the characterization of pineapple exosomes are performed and then followed with the uptake analysis of the exosomes inside the stem cells. The effect of varying doses of pineapple exosomes are also evaluated through MTS assay, cell cycle analysis and doubling time.

Materials & Methods

Pineapple fruit was used for exosome source and applied on to the human adipose stem cells (hADSCs) to evaluate their effects on the stem cells *in vitro*. Exosomes from pineapple were isolated by using two phase fluid system and exosome concentration were characterized via nanoparticle tracking analysis (NTA). Flow cytometry is also used for exosome characterization for specific exosome antibodies. MTS assay is used to determine the effective concentration of the exosomes as well as to detect their toxicity on the stem cells if there is any. Uptake analysis is also shown with uptake analysis assay. Cell cycle analysis and doubling time experiments were also performed to analyze any changes occurred due to exosome application.

Results

Exosome Isolation & Characterization

Pineapple exosomes were chooped and centrifuged to get the liquid of the fruit. Then two-phased fluid system is applied to isolate exosomes. The size of the exosomes were determined via nanoparticle tracking analysis devices and it proved that the size of our exosomes is ranging between 30-100nm. Exosome specific markers such as CD9, CD63, CD81 and HSP70 were used to characterize them via flow cytometry.

MTS Assay

Increasing doses of pineapple exosomes were applied to the human adipose stem cells and no significant changes were observed via MTS assay.

Exosome Uptake Analysis

Cells, exosomes and cell core were dyed with different fluorescence dyes and exosome entry were observed into the cells via fluorescence microscopy.

Cell cycle Analysis

When applied onto the human adipose stem cells, pineapple exosomes appeared to have no significant effects on cell cycle process of the human adipose stem cells.

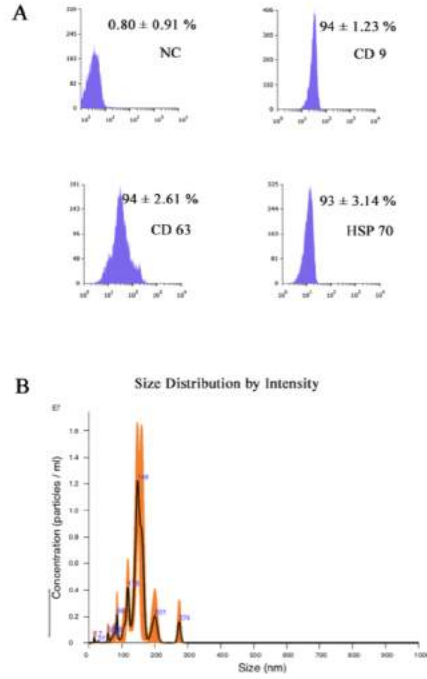


Figure 1: Characterization of Pineapple exosomes

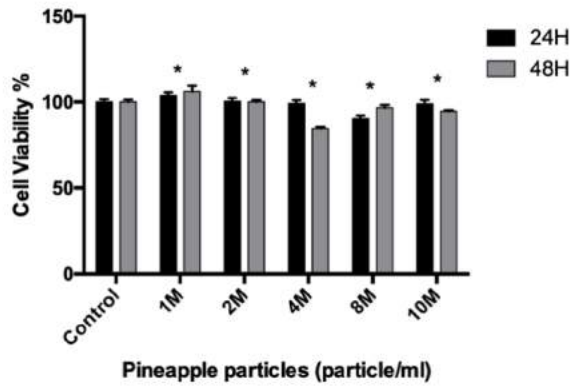


Figure 2: Cell Viability Assay of hADSc when treated with pineapple exosomes

PS011 - Hashimato Hastalığında Dental Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Hücrel Tedavide İmmünomodülatör Etkisinin İn-vitro Ortamda Araştırılması

Muazzez Gökalp¹, Hülya İlıksu Gözü², Nur Ecem Öztop¹, Fatma Rabia Kahraman¹, Cem Armağan Turan², Tunç Akkoç¹

¹Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, İstanbul

²Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, İstanbul

Amaç: Hashimato tiroiditi toplumda en sık rastlanılan otoimmün tiroid hastalıklarındandır. Tiroid bezi lenfositler tarafından infiltre edilmekte, sonrasında hormon üretimi bozulacak kadar hasar oluşmaktadır. Çalışmamızda Hashimato hastalarının periferik kanlarından izole edilen lenfositlerin 0. Gün immünofenotiplenmeleri ve 3. Gün anti-CD3 ve anti-CD28 uyarımları sonrasında mezenkimal kök hücre (MKH) varlığında ve yokluğundaki kültür sonrası; proliferasyon, Treg hücre düzeyleri, lenfositlerin naif-memori ve Fas-FasL düzeyleri arasındaki ilişki sağlıklı bireyler ile karşılaştırılarak in-vitro ortamda araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç-Yöntem: Endokrinoloji polikliniğine başvuran 18 yaş üzeri, Tiroid Stimule Edici Hormon Reseptör antikoru, anti-TPO, anti-Tg düzeyleri hashimato patogeneziyle uyumlu 8 Hashimato hastası çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak hiçbir otoimmün hastalığı bulunmayan 8 sağlıklı birey çalışmaya alınmıştır. Bireylerden 10 cc venöz kan alınmış ve Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) izolasyonları yapılmıştır. İzolasyonu takiben 0. Gün immünofenotipleme (CD3+CD4+Th, CD3+CD8+Tc, CD3-CD19+B ve CD3-CD16+56+NK) yapılmıştır. PKMH'ler 3 gün süre ile anti-CD3 ve anti-CD28 ile uyarılarak MKH varlığında ya da yokluğunda kültüre edilmiştir. Kültür sonrası CFSE ile hücre proliferasyonu, lenfosit FAS-FASL düzeyleri, CD4+CD25+FoxP3/Treg hücre düzeyleri ve lenfositlerin naif-memori düzeyleri incelenmiştir.

Bulgular: Hashimato hastalarının ve sağlıklı bireylerin 0. Gün ve 3. Gün kültür sonrası MKH varlığında ve yokluğunda CD3+CD4+Th düzeylerinde bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). CD3+CD8+Tc hücre düzeyleri MKH yokluğunda Hashimato patogeneziyle bireylerde sağlıklı ve Hashimato hastalarının MKH varlığındaki kültürlerle göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) ve CD4+CD25+FoxP3/Treg düzeyleri arasında hasta ve kontrol grubu arasında fark gözlemlenmemiştir. MKH varlığındaki Hashimato hastalarının kültürlerinde FAS-FASL düzeyleri ve lenfosit proliferasyonu sağlıklı ve MKH yokluğundaki kültürlerine göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.05$).

Sonuç: Ön çalışma sonucunda MKH'lerin Hashimato patogeneziinde lenfosit proliferasyonunu ve Fas-FasL düzeylerini baskılayarak sağlıklı bireydeki düzeylere yakın olması MKH'lerin hastalık patogeneziinde iyi bir düzenleyici olarak görülmekte ve otoimmün tiroid hastalıklarda hücrel tedavinin yeni bir seçenek olabileceği yönünde yapılacak çalışmalara kapıları aralamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Hashimato, Mezenkimal Kök Hücre, İmmünomodülasyon

3 kök hücre
ve hücresel tedaviler
kongresi
Joint Meeting With ISSCA

TUBA



TURKISH JOURNAL ASSOCIATION



ISSCA



Tıp Fakültesi



Spor Bilimleri
Fakültesi

12-14 Nisan 2019

Marmara Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi
Arastırma Merkezi Konferans Salonu

Istanbul

TEMATİK BİLDİRİ SUNUMLARI

TS001 - Radyolojik görüntüleme ve nörolojik hasarın önlenmesinde kullanılan ilaçların intervertebral disk dokusunun rejenerasyonu üzerine etkisi

Duygu Yaşar Şirin¹, Numan Karaarslan²

¹Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ

²Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Tekirdağ

GİRİŞ: Toksik etki ilaç endüstrisi için büyük bir sorundur. toksisiteye neden olma potansiyeli olan ilaçları belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar sayesinde tedavi süresi ve dozları belirlenebilmekte veya uygun önlemler alınabilmektedir (1). Literatürde dejenere intervertebral disk dokusu ile yapılan çok sayıda çalışma olmasına karşın intakt doku ayrıca primer veya eksplant kültürlerde yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu sunumda intakt intervertebral disk dokusundan elde edilen primer ve eksplant annulus fibrosus /nucleus pulposus (AF/NF) hücre kültürlerinde daha önce etkileri değerlendirilmemiş olan ilaçlar (iopromid, gadoksetik asit, nimodipin ve pregabalin) ile yaptığımız çalışmaların sonuçlarının sunulması amaçlanmıştır.

İopromid ve gadoksetik asit, diskografide sıklıkla kullanılan radyo kontrast ajanlardır (2). Kalsiyum kanal bloke edicileri olarak bilinen bir ilaç grubuna dâhil olan Nimodipin, serebrovasküler kaynaklı iskemik nörolojik hasarı önlemek için kullanılmaktadır (3). Pregabalin (PGB) bir GABA analogu olan bir farmakolojik ajandır (4). Kimyasal yapısı ve farmasötik özellikleri nedeniyle PBG, epilepsi, periferik nöropatik ağrı (5), kronik kas-iskelet sistemi ağrısı, lomber - ameliyatı sonrası postoperatif ağrı (6), anksiyete, somnipati ve fibromiyalji (7) tedavisi için kullanılmaktadır.

MATERYAL ve YÖNTEM: Laminektomi ve diskektomi ile elde edilen intakt intervertebral disk dokusundan hazırlanan primer hücre kültürlerinde ilaç uygulamaları gerçekleştirilmiştir. AF/NP kültürlerine İopromid final konsantrasyonu 0,0025 mmol/mL ve gadoksetik asit 0,39 mg/mL olacak şekilde 2, 4 ve 6 saat süreyle, nimodipin ve pregabalinin ise final konsantrasyonu 100 µMolar olacak şekilde 24 ve 48 saat süreyle uygulanmıştır. Hücrelerin gelişimi invert mikroskopi ile takip edilmiş ve görüntülenmiştir. Canlılık analizi; MTT analizi ve Akridin orange/ Propidyum iyodit (AO/PI) boyama sonrasında floresan mikroskopi ile gerçekleştirildi. İlaç uygulanan kültürlerde özellikle hücre proliferasyonu ve ekstraselüler matriks oluşumu üzerine etkili olduğu daha önceki çalışmalar ile bildirilen chondroadherin (CHAD), type II collagen (COL2A1) ve hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF 1α) genlerinin ekspresyonu qRT-PCR yöntemi ile değerlendirildi. Veriler one-way ANOVA ve post-hoc Tukey HSD yöntemleri kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA: Literatürde yaptığımız çalışmadan önce, Nöroşirujide diskografi metodolojisinde kullanılan radyo-kontrast farmasötikler iopromid ve gadoksetik asitin intakt disk dokusu hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkisini net bir şekilde gösteren hiçbir çalışma yapılmamıştır. İopromid ve gadoksetik asitin AF/NP hücrelerine negatif bir etki göstermediği saptanmıştır (2).

İskemik nörolojik hasarın önlenmesinde kullanılan Nimodipine uygulanan kültürlerde hücre proliferasyonunun yavaşladığı ve hücre ölümü gerçekleştiği saptandı. Şekil 1. de nimodipin uygulanan kültürler için AO/PI boyama ve invert mikroskopi görüntüleri sunulmuştur (Şekil 1). AO/PI boyamaları incelendiğinde özellikle nimodipin uygulamasının 48. saatinde apoptotik hücre ölümlerinin gerçekleştiği görülecektir.

Nimodipin uygulanan intact AF/NP kültürlerin 0, 24 ve 48. saatlerinde RNA izolasyonunu takiben qRT-PCR ile özellikle ekstraselüler matriks oluşumu ile ilişkisi daha önceki çalışmalar ile saptanmış olan COL2A1, CHAD ve HIF 1 α genlerinin ekspresyonları belirlenmiştir. 0 saat kültürleri referans olarak kabul edilmiş ve bu kültürlerdeki gen ekspresyon seviyesinin RQ = 1 (% 100) olduğu kabul edilmiştir. 24 ve 48. saatlerdeki gen ifadesi referans ile kıyaslanarak kat olarak hesaplanmıştır. COL2A1 gen ifadesi kontrol veya nimodipin uygulanmış hiçbir kültürde saptanamamıştır. CHAD gen ekspresyonu nimodipin uygulamasından etkilenmemiştir. HIF 1 α ifadesinin ise kontrol grubuna göre azaldığı saptanmıştır. Ancak, nimodipine uygulaması ile çalışılan genlerin ifadelerinde gözlenen değişim arasında bir korelasyon saptanamamıştır. Pregabalin uygulanan kültürlerde doz ve süreden bağımsız olarak hücre proliferasyonunun baskılandığı gözlenmiş ancak hücre ölümü belirlenmemiştir. Pregabalin uygulanan intact AF/NP kültürlerin 0, 24 ve 48. saatlerinde de qRT-PCR yöntemi ile COL2A1, CHAD ve HIF 1 α genlerinin ekspresyonları araştırılmıştır. Bu kültürlerde COL2A1 gen ekspresyonu değişmeden kalırken, CHAD ve HIF-1 α genlerinin ifadesinde azalma belirlenmiş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sonuç olarak yaptığımız çalışmalar tek başına ilaç uygulamalarının klinik etkilerini yanıtlamasa da, uygulama süre ve dozlarının belirlenmesinde yön verici olabilecek yeni veriler sağlamıştır.

KAYNAKÇA

1. Zhu JJ, Xu YQ, He JH, Yu HP, Huang CJ, Gao JM, et al. Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish. *J Appl Toxicol* 2014;34(2):139-48.
2. Karaarslan N., Yılmaz İ., Özbek H., Yaşar Şirin D., Kaplan N., Çalışkan T., Özdemir Ç., Akyuva Y., Ateş Ö., Are Radio-Contrast Agents Commonly used In Discography Toxic to the Intact Intervertebral Disc Tissue Cells?, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018;1-9.
3. Karaarslan N., Yılmaz İ., Yaşar Şirin D., Özbek H., Kaplan N., Kaya Y. E., Akyuva Y., Gürbüz M. S., Öznam K., Ateş Ö., Pregabalin treatment for neuropathic pain may damage intervertebral disc tissue, *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 16, pp.1259-1265, 2018.4.
4. Goodman CW and Brett AS: Gabapentin and pregabalin for pain-is increased prescribing a cause for concern? *N Engl J Med* 377: 411-414, 2017.
5. Blommel ML and Blommel AL: Pregabalin: An antiepileptic agent useful for neuropathic pain. *Am J Health Syst Pharm* 64: 1475-1482, 2007.
6. Zarei M, Najafi A, Mansouri P, Sadeghi-Yazdankhah S, Saberi H, Moradi M and Farzan M: Management of postoperative pain after lumbar surgery-pregabalin for one day and 14 days-a randomized, triple-blinded, placebo-controlled study. *Clin Neurol Neurosurg* 151: 37-42, 2016.
7. Roth T, Arnold LM, Garcia-Borreguero D, Resnick M and Clair AG: A review of the effects of pregabalin on sleep disturbance across multiple clinical conditions. *Sleep Med Rev* 18: 261-271, 2014.

TS002 -The potential role of Apelin receptor signaling in skin regeneration: A fibroblast perspective

Taha Baru Hayal, Fikrettin Şahin, Ayşegül Doğan

Department of Genetics and Bioengineering, Faculty of Engineering, Yeditepe University, İstanbul, Turkey

Introduction: Skin regeneration is a crucial process for mammals since it plays critical role in wound healing, tissue regeneration and homeostasis. Cell migration which plays a role in cancer, immunological response and embryonic development is also required for skin regeneration. Fibroblasts cell migration is important in homeostasis of several organs such as skin. G protein coupled membrane bound receptor, Apelin receptor (Aplnr), has been shown to be effective in gastrulation movements before. In the study, Aplnr has been identified as a potential candidate pathway for fibroblast cell migration and future regenerative medicine therapies.

Materials and Methods: Cell proliferation and colony forming assay of PMEF-CF (primary mouse embryonic fibroblast) and NIH-3T3 fibroblasts was performed to show Aplnr pathway in cell viability. GFP-Aplnr fusion protein construct was generated by inserting the Aplnr gene next to C-terminal part of sfGFP-C1 plasmid and receptor internalization has been shown in mouse fibroblast cells. Aplnr receptor pathway was activated by Apelin peptide and small molecule ML-233 for further wound healing experiments. siRNA of Apelin and Aplnr has been used for downregulation of Aplnr signaling in mouse fibroblast cells. Scratch assay and transwell cell migration analysis was performed for cell migration analysis. Migratory phenotype was demonstrated by gene and protein expression analysis by qPCR and western blot analysis.

Results: Aplnr overexpression was conducted by transfection of the cells with GFP-Aplnr fusion protein. GFP-Aplnr fusion protein was found to be localized on the cell surface at 0 min. However, Apelin and ML-233 application initiated the intercellular localization at 30 min. Aplnr pathway was activated in both MEF and NIH-3T3 cell lines after Apelin and ML-233 application and a slight increase in cell proliferation was observed. However, a significant increase was observed in scratch closure and migration of MEF and NIH-3T3 cells after Apelin and ML-233 treatment. Additionally, knock down of Aplnr signaling resulted in significant decrease in cell migration ability of fibroblast cells. qPCR results demonstrated a noticeable increase in migration and cell proliferation related genes, such as AKT and COL1A1, in both of MEF and NIH-3T3 cells. Also, scarless wound healing related genes MMP2 and MMP9 was found to be overexpressed after the activation of Aplnr signaling pathway. Actin and Vimentin protein levels increased in Aplnr signaling activated fibroblasts and decreased in siRNA applied cells.

Discussion: Cell migration is an important event in several processes including developmental stages during gastrulation and neurogenesis, immune response, tissue regeneration, cancer and wound healing. Identification of underlying pathways is crucial to develop a novel therapeutic approaches for diseases. In current study, Aplnr pathway has been shown to be important in cell migration which could be a promising therapeutic target for future therapies.

Conclusion: Activation of Aplnr signaling pathway increased fibroblast migration via enhancement of regulatory protein and gene expressions in fibroblast cells.

TS003 - Pomegranate İle Desteklenen Yağ Doku Mezenkimal Kök Hücre Tedavisinin Deneysel Testis İskemik Hasarında Etkileri

Seçkin Karataş, Sarper Selimoğlu, İsa Emre Çetinkaya, Anıl Uyanıkoğlu,
Pınar Kılıçarslan Sönmez, İbrahim Mehmet Tuğlu

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı

Amaç: Testis hasarı erkek infertilitesi için önemli bir durumdur. Pomegranate (PG) antioksidan özelliği bilinen doğal bir üründür. Yağ doku mezenkimal kök hücre (YDMKH) klinik kullanımda olan etkili bir hücre tedavisidir. Bu çalışmada deneysel sıçan modelinde torsiyon ile oluşturulan hasarda PG ve YDMKH ile birlikte uygulamalarının oluşan hasara etkisi incelendi.

Gereç-Yöntem: Torsiyon/detorsiyon (TD) modeli sıçanların sol testisin 720 ° saat yönünün tersine döndürülmesi ile oluşturulup 4 saat sonra detorsiyon yapıldı. Tedaviler torsiyon sonrası ilk saatte yapıp örnekler detorsiyondan 24 saat sonra alındı. Hasarın değerlendirilmesinde sperm analizi, Johnson skoru, tübül çapı ve seminifer tübül epitelinin kalınlığı ile oksidatif stres parametreleri olarak endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve apoptoz için TUNEL ile apoptotik indeks kullanıldı. biyokimyasal analizde serum SOD ve MDA düzeyleri bakıldı.

Bulgular: TD ile azalan Johnson skoru, tübül çapı ve seminifer tübül epitelinin kalınlığının, artan eNOS tanımlamasının ve apoptotik indeksin, azalan SOD ve artan MDA düzeylerinin, PG, YDMKH ve özellikle birlikte kullanımlarında anlamlı bir şekilde geri döndürüldüğü bulundu.

Sonuç: Testisi hasarında PG ile desteklenen YDMKH uygulamasının infertilitenin önlenmesi açısından klinik kullanım potansiyelinin olacağı düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Testis iskemisi, Pomegranate, Yağ dokusu mezenkimal kök hücre, oksidatif stres, apoptoz

TS004 - Kök Hücre ile Tedavi Edilen Gonartrozlu Vakalarda Klinik Sonuçlarımız

Ahmet Özyazgan¹, Kutsi Tuncer², Güngör Akyüz³, Kadri Yıldız⁴, Ferdi Sarı⁵, Hakkı Yıldırım⁶,
Atakan Güvendiren⁶, Ferhat Avcı⁷

¹Özel kolan hastanesi

²Atatürk üniversitesi ortopedi a.b.d

³İstanbul esenyurt üniversitesi

⁴Kars kaşkas üniversitesi

⁵Beylikdüzü devlet hastanesi

⁶İstinye devlet hastanesi

⁷Haseki eğitim araştırma

2012-2019 yılları arasında kemik iliği ve adipoz dokudan elde edilen numuneler kök hücre haline dönüştürülüp dizlere steril koşullarda enjekte edildi. işlem öncesi skorları ve klinik bulguları kaydedildi. İşlem sonrası klinik bulgular ve yürüme skorları anlamlı derecede iyi olduğu görüldü.

İşlem standardiize olarak aynı kit ve cihaz kullanılarak eşit ortamlarda yapıldı hastalar steril ortamlarda görüldü ve uygulama yapıldı hastalar orta uzun dönemde stem cell uygulamasından anlamlı derecede fayda gördüler.

Anahtar Kelimeler: stem cell, kök hücre, svf

TS005 - Successful treatment of a 20-year nonhealing venous leg ulcer in a patient with systemic lupus erythematosus

Cenk Eray Yıldız

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Kardiyoloji Enstitüsü, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul

Chronic relapsing ulcerative wounds affecting the lower extremities are frequently associated with venous insufficiency leading to edema. It is a vicious circle unless leg edema is resolved with additional care; otherwise the size and depth of the ulcer as well as symptoms of the patients increase devastatingly [1–3].

Systemic lupus erythematosus is a chronic autoimmune multisystemic, inflammatory disorder without an identified etiology, affecting skin, kidneys, lungs, liver, the nervous system, heart and circulation [4, 5]. Vascular disorders involving the arteries and veins during the course of the disease are common and may lead to significant morbidity and even mortality [6].

Here, we present successful treatment of a leg ulcer, which had existed for over 20 years, in 3 months with a 3-step treatment protocol including treatment of venous reflux, negative pressure wound treatment followed by thrombin-enriched thrombocyte concentrate in a 45-year-old patient with systemic lupus erythematosus.

A 45-year-old male patient was admitted to our institution with a 10 × 12 cm in diameter pretibial leg ulcer. His body surface area was 2.5 m² and his body mass index was 38 kg/m². The history revealed being followed irregularly with the diagnosis of systemic lupus erythematosus and use of prednisolone 4 mg daily. The ulcer started 20 years ago after a traffic accident and never healed. He had depressive symptoms such feeling hopeless, irregular and inadequate feeling, and loss of joy of life.

The ulcer was dirty, infected and smelled bad (Figure 1 A). Laboratory work-up indicated increased an erythrocyte sedimentation rate of 103 mm at 1 h (normal: 1–10), C-reactive protein (CRP) of 53 mg/l (normal: 1–10), white blood cell count of 12,000 g/l and $\alpha 1$, $\beta 1$ and $\beta 2$ and γ levels in protein electrophoresis. Cultures were taken immediately and microscopic evaluation showed *Pseudomonas aeruginosa* colonization. Ciprofloxacin 750 mg twice daily was initiated according to the antibiogram results.



Figure 1

A – Leg and ulcer before RF ablation, B – leg and ulcer after RF ablation

The nonhealing ulcer was investigated multifactorially. The prednisolone that he had been on for many years was discontinued. An exercise program was started and a protein-rich, low-carbohydrate diet was advised. Lower extremity Doppler ultrasonography revealed grade 4 reflux in the superficial veins of sizes reaching up to 6–10 mm. Further hematologic tests for coagulopathies including protein C and S deficiency, factor 5 Leiden mutation, and homocysteinemia were negative. Rheumatologic tests indicated homogeneous strong positive anti-nuclear antibodies and an anti-ds-DNA value of 204 IU/ml, confirming the diagnosis of systemic lupus erythematosus. Hydroxychloroquine 200 mg/day was prescribed.

We decided to proceed with a three-step treatment protocol starting with endovenous radiofrequency ablation (Venefit, VNUS Closure, Covidien, NY, USA) of bilateral great and lesser saphenous veins ([Figure 1 B](#)). His legs were covered with elastic bandages after the procedure and he was discharged home the next day with compression stockings for at least 2 months and medications of aspirin 100 mg daily and micronized purified flavonoid fraction (Daflon 500) two times per day. In the meantime wound care was provided with Pico IFU (Global Excl. USA Sterile Product), a miniaturized single use 80 mm Hg negative pressure wound treatment system ([Figures 2 A, B](#)). As the last step, an autologous thrombocyte concentrate was prepared with a combination of 6 ml of ACD-A solution (citric acid, sodium citrate, dextrose combination) with 54 ml of autologous blood. The red blood cells were removed from the solution, enriched with undifferentiated multipotent CD34+ cells, and 10 ml of solution was obtained in the end. 4 ml of solution was injected around the ulcer, and the remaining 6 ml was saved for wound closure after combining with thrombin. Autologous thrombin was combined with 6 ml of blood in a tube containing 1 ml of ACD-A and 1.7 ml of calcium to make 10 ml of solution and incubated at room temperature for 45 min. At the end, the mixture of thrombin and platelets at a range of 1/3 revealed a rather solid gel-membrane in 5 min, indicating that the platelets were sufficiently active [[7](#), [8](#)]. This gel was used as a wound dressing in our patient, and the wound was closed for 7 days. On the third day, the wound was checked for infection and it was left for a natural course after the 8th day ([Figures 3 A, B](#)). Regular wound care was performed then after and at the end of the 6th month the size of the wound decreased by 70% without signs of infection ([Figure 4](#)).

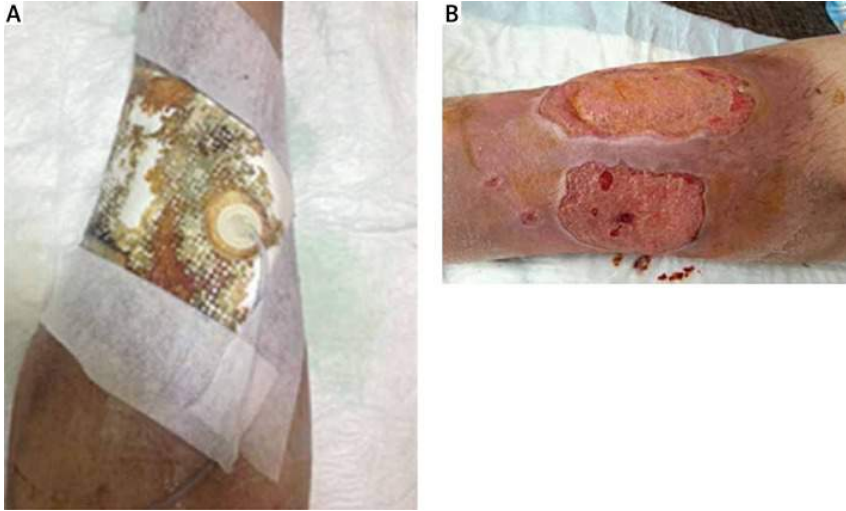


Figure 2 A, B
Pico IFU negative pressure aspiration therapy



Figure 3 A, B
Status of the ulcer after cell injection – note the tissue hypertrophy

ys. On the third day, the wound was checked for infection and it was left for a natural course after the 8th day ([Figures 3 A, B](#)). Regular wound care was performed then after and at the end of the 6th month the size of the wound decreased by 70% without signs of infection ([Figure 4](#)).



Figure 4

Normal twice daily wound care with isotonic solution – note the status of the wound after 2 months

Many factors contribute to the pathogenesis of leg ulcers. Most patients have venous stasis due to chronic venous insufficiency. Chronic venous hypertension either due to primary or secondary venous disease and incompetence resulting in reflux is the underlying pathology in most cases; however, inflammatory reactions, leucocyte infiltration, platelet adhesion, pericapillary fibrin accumulation, and macrophages filling the tissues result in hypoxia, cell death and eventually ulceration. The diagnosis of leg ulcer can be made based on medical history, inspection, palpation of the skin, comparison of the temperature of the ulcerated leg, palpation of arteries, fascia holes, presence and degree of edema, firm-painful lymphatic channels, and functional testing to assess peripheral occlusive arterial disease or identify superficial and deep venous reflux of the legs. Other causes of chronic leg ulcers may be hematologic diseases, autoimmune diseases, genetic defects, infectious diseases, primary skin diseases, cutaneous malignant states, use of intradermal medications and therapeutic procedures, and numerous exogenous factors [1, 2]. At this point, a clear history and differential diagnosis are crucial.

Vascular pathologies are common in the course of systemic lupus erythematosus [5, 6]. They either occur as direct complications of the disease or develop as comorbidities due to the hematologic disturbances and side effects of the immunosuppressive medications used for the treatment of systemic lupus erythematosus. Vasculopathy in the presence of an inflammatory environment is very common [6]. It is also associated with increased thrombotic events occurring at younger ages. Especially in systemic lupus erythematosus, unlike other autoimmune disorders or vasculitis syndromes, vascular pathologies may occur in combination of atherosclerotic and thrombotic disease as well as autoimmune vessel wall degeneration mediated with antiendothelial cell antibodies.

Venous ulcers are long lasting, frequently complicated with infections, and costly to treat. Healing requires patience and patient compliance, with a high risk of recurrence after healing disorders leading to severe debilitating symptoms in patients and causing increased loss of young, working age people from the economy. Although venous hypertension plays the major role in the etiology, treatment is more complicated than only relief of the venous stasis with interventional therapies and external compression. Ulcers usually require combination treatment and proper care, otherwise they may get infected, leading to gangrene and in extreme cases eventually amputation [9, 10]. When necessary, a home wound care team may be installed.

Venous ulcers are chronic disorders. They not only lead to a physical and economical burden to the healthcare systems but also cause a serious psychological reaction due to restrictions, ill feeling, and increasing and/or relapsing symptoms despite therapeutic attempts. The patients may end up experiencing anxiety or depression requiring therapy. The causes of emotional changes are also due to additional soft (skin and muscle) and hard tissue (joint and bone) changes. The consequences of depressive symptoms such as weight gain, immobilization, and inadequate alimentation may also negatively affect the venous insufficiency and the ulcer [11].

Our patient had depressive symptoms, and he was persuaded about a possible treatment of his nonhealing stasis ulcer with multimodality approaches. Following the treatment of venous reflux, the wound of our patient was stabilized with Pico IFU negative pressure application, which was followed by autologous platelet concentration injection as well as a platelet-rich gel-membrane dressing applied at the end of the process to facilitate healing [12].

In conclusion, venous ulcer is an important health problem, and treatment is quite burdensome and usually lasts long. Despite advances in medicine, cure is not very likely and ulcers may relapse if precautions are not taken. Treatment has to be multifactorial, combining the treatment of insufficiency of the venous system and wound care.

Nonhealing leg ulcers have a complex etiology and lead to important socioeconomic problems throughout the world. Usually the patients are unfortunately neglected. Together with our 3-step treatment protocol applied in one of our patients, we wanted to stress the successful therapy of long-lasting venous ulcers with patients and careful care.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. National Clinical Guideline Centre (UK) London: National Institute for Health and Care Excellence (UK); 2013. Varicose Veins in the Legs: The Diagnosis and Management of Varicose Veins.
2. Green J, Jester R, McKinley R, Pooler A. The impact of chronic venous leg ulcers: a systematic review. *J Wound Care*. 2014;23:601–12. [[PubMed](#)]
3. Dowsett C, Grothier L, Henderson V, et al. Venous leg ulcer management: single use negative pressure wound therapy. *Br J Community Nurs*. 2013;(Suppl):S6, S8–10.S12-5. [[PubMed](#)]
4. Banys A, Kazmierski J, Jaszewski R. Psychiatric manifestations in a patient after surgical management of aortic stenosis of systemic lupus erythematosus. *Arch Med Sci*. 2011;7:342–4. [[PMC free article](#)][[PubMed](#)]
5. Kang SC, Hwang SJ, Chang YS, Chou CT, Tsai CY. Characteristics of comorbidities and costs among patients who died from systemic lupus erythematosus in Taiwan. *Arch Med Sci*. 2012;8:690–6. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
6. Pырpasopoulou A, Chatzimichailidou S, Aslanidis S. Vascular disease in systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis*. 2012;2012:876456. [[PMC free article](#)][[PubMed](#)]
7. Martinez-Zapata MJ, Martí-Carvajal AJ, Solà I, et al. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;10:CD006899. [[PubMed](#)]
8. Carter MJ, Fylling CP, Parnell LK. Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis. *Eplasty*. 2011;11:e38. [[PMC free article](#)][[PubMed](#)]
9. Snyder RJ. Treatment of nonhealing ulcers with allografts. *Clin Dermatol*. 2005;23:388–95. [[PubMed](#)]
10. Brem H, Kirsner RS, Falanga V. Protocol for the successful non-surgical treatment of venous ulcers. *Am J Surg*. 2004;188(1A Suppl.):1–8. [[PubMed](#)]
11. Jawien A, Szewczyk MT, Kedziora-Kornatowska K, et al. Functional and biopsychosocial restrictions among patients with a venous ulcer. *Arch Med Sci*. 2006;2:36–41.
12. Hudson DA, Adams KG, Huyssteen AV, Martin R, Huddleston EM. Simplified negative pressure wound therapy: clinical evaluation of an ultraportable, no-canister system. *Int Wound J*. 2013;12:195–201. [[PubMed](#)]

TS006 - Characterization of Treg Cells Generated in The Presence of Group 3 Innate Lymphoid Cells

Ahmet Eken

Medical Biology, Faculty of Medicine, Betül Ziya Eren genome and Stem Cell Center, Erciyes University, Kayseri, Turkey

Objective: CD4⁺ Foxp3⁺ Treg cells are a heterogeneous population of suppressive helper T cell lineage and are utilized for therapeutic purposes in autoimmune disease models. Rorγt⁺ group 3 innate lymphoid cells (ILC3s) were shown to express MHCII and interact with CD4⁺ T cells, however, if and how ILC3s regulate Treg cell functions has not yet been addressed. In our study, we characterized the molecular features of Treg cells generated from naive CD4⁺ T cells in the presence or absence of ILC3s ex vivo.

Materials-Methods: CD4⁺ Foxp3⁻ T cells were sorted from Foxp3YFP reporter mice. ILC3s were purified from IL-23 receptor GFP reporter mice. Treg differentiation was performed with TGF-β, IL-2 and CD3/CD28 stimulation with or without addition of ILC3s. Foxp3YFP⁺ Treg cells were surface stained for CD25, CTLA-4, LAG3, KLRG1, ICOS, GITR. IL-10 production was tested via intracellular cytokine staining.

Results: Murine Treg cell differentiation in the presence of ILC3s were reduced significantly. Surface expression of CTLA-4 and LAG3 in Treg cells was elevated whereas GITR, CD25, ICOS, CD25, LAP levels remained comparable in the presence of ILC3s compared to those differentiated in its absence. Human Treg generation in the presence of ILC3s was comparable to the condition without ILC3s. Importantly ILC1 addition significantly improved the yield. Presence of human of ILC3s in the Treg cultures augmented KLRG1 expression by Treg cells.

Conclusions: Presence of ILC3s during Treg cell generation impacts the expression of surface proteins associated with the suppressive machinery of Treg cells in humans and mice.

Keywords: Treg, ILC3, Foxp3, Rorγt

TS007 - Donör Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Çevresel Stres Altında Gösterdikleri Hücrel Yanıtın Fonksiyonel Analizi

Günay Balta¹, Sema Aygar², Betül Çelebi Saltık², Emine Kılıç³, Duygu Uçkan Çetinkaya²

¹Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Pediatrik Hematoloji BD, Ankara

²Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Ankara

³Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Kırıkkale

Amaç: Son yıllarda, mikroçevrenin kritik elemanı olan mezenkimal kök hücreler(MKH) rejeneratif amaçlı hücrel tedavilerde artan düzeyde kullanılmaktadır. Uygulamalarının çoğunda MKH'ler dokularda uzun süre fonksiyonel/canlı kalamamakta, bu durum etkinliği kısıtlayan faktörler arasında yerleşmektedir. Aktarım sonrası hücreden/mikroçevreden kaynaklanan çeşitli stres uyarıları MKH'lerin yaşlanmalarına, yaşamlarının kısalmasına, fonksiyonlarının kaybına, ölümlerine veya malign transformasyonuna neden olmakta, böylece hücrel tedavi kapasiteleri azalmakta, yok olmaktadır. Hasar mekanizmalarının anlaşılması hastaya özel terapötik stratejiler geliştirilmesine katkı sağlayabilecektir. Bu çalışmada, seçilmiş hücrel stres uyarılarına donör kemik-iliği(dKI) kaynaklı MKH'lerin verdiği metabolik yanıtın fonksiyonel olarak araştırılması hedeflenmiştir.

Gereç-Yöntem: dKİMKH'leri; oksidatif-stres indükleyicisi hidrojen-peroksit(H₂O₂), mitokondri-elektron-transport-sistemi-kompleks-1 inhibitörü Rotenon(ROT), genotoksik etidyum-bromürün(EtBr) artan dozlarında gerçek-zamanlı xCELLigence sisteminde 72s izlenmiştir. Duraklama fazında sabitlenmeleri nedeniyle yeterince hücrel stres oluştuğu anlaşılan H₂O₂_ROT_EtBr'nin sırasıyla 400µM_500µM_1µM sabit dozlarında 1,5s_24s_48s_72s sürelerle inkübasyon sonrası, MKH'ler aktif mitokondri(Mitotracker), ROS, ATP, Sitokrom-C-Oksidaz(CytC) düzeyleri açısından fonksiyon analizlerine alınmıştır.

Bulgular: Çalışılan her uyarının artan maruziyet sürelerinin bazılarında, bakılan parametreler açısından değerlendirildiğinde, hücre fonksiyonlarının değişik düzeylerde etkilendiği; H₂O₂ ve EtBr'le 24s inkübasyon sonrası mitotraker, ATP, CytC düzeylerinde azalma, EtBr'le 72s inkübasyon sonrasında azalmış mitotraker, CytC, artmış ROS düzeyleri gözlenmiştir. ROT'la 72s inkübasyon sonrası tüm parametreler etkilenmiş, mitotracker, ATP, CytC'de düşüş, ROS'da artış gözlenmiştir.

Sonuç: Primer dKİMKH'ler; uygulanan kimyasalların ancak yüksek dozlarında duraklama fazına giren, metabolik aktivitelerinde dramatik değişiklik göstermeyen oldukça dirençli hücrelerdir. Heterojen popülasyon olmaları, aynı şartlarda yapılan deney tekrarlarından elde edilen sonuçları etkilemektedir.dKİMKH'leri yüksek sitotoksik çevresel baskıya dayanabilen, canlılıkları devam ettiği sürece hücrel tedavi uygulamalarında zorlu şartlarda dahi fonksiyonlarını devam ettirebilecek nadir terapötik ajanlardır. Ancak, MKH uygulamaları sonrasında sayılarının hızla azalması konusunda daha ayrıntılı araştırmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır. HÜ BAP(#8178)desteklemiştir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre (MKH), hücrel stres uyarıları, hidrojen peroksit, rotenon, etidyum bromür

TS008 - Hematopoetik Kök Hücre (HKH) Regülasyonunda Nöropeptid Y (NPY)'in Rolünün İncelenmesi

Barış Ulum¹, Aynura Mammadova², Özgür Özyüncü³, Duygu Uçkan Çetinkaya⁴, Tülin Yanık¹, Fatima Aerts Kaya²

¹Middle East Technical University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biological Sciences, Biology/Molecular Biology & Genetics, Ankara

²Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Department of Stem Cell Sciences, Ankara, Turkey

³Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Ankara, Turkey

⁴Hacettepe University, Center for Stem Cell Research and Development, 06100 Ankara, Turkey

Amaç: Nöropeptid Y (NPY) merkezi veya periferik sinir sisteminde sempatik sinirler tarafından salınan bir nörotransmitterdir. NPY; kemik iliğinde bulunan makrofajlar, osteoblastlar (OB) ve endotel hücreler tarafından salgılanmakta ve immün hücrelerin homeostazını düzenlemektedir. NPY reseptör/lerinin varlığı; makrofajlar, OB ve Mezenkimal Kök Hücre (MKH)'lerde gösterilmiştir. NPY yokluğunda, HKH'lerin sayıları azaldığı ve kemik iliği rejenerasyonunda bozulma olmasına rağmen, HKH'lerin NPY reseptörü ifadeleri araştırılmamıştır. Bu çalışmada, HKH'lerin regülasyonunda NPY'nin etkileri ve NPY reseptörün ifadeleri değerlendirildi.

Gereç-Yöntem: NPY'nin, HKH'ler üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla 0-300 nM arasındaki farklı NPY dozları 4 veya 7 gün sürecinde SCF, TPO, Flt3-ligand (STF) içeren serumsuz medyumda insan HKH hücre kültürüne uygulandı. NPY reseptörleri Y1-Y5 ekspresyonu değerlendirildi. NPY'nin HKH proliferasyonu üzerindeki etkisi WST-1 hücre proliferasyon ajanı (Roche) ve hücre döngüsündeki aktivitesi BrdU/7-AAD (Biolegend) ile test edildi.

Bulgular: NPY reseptörü Y1 oranları kültür öncesi hücrelerde yüksekken, hücre kültürünün 4. ve 7. günlerinde hızla azaldı; NPY-Y2, Y4 ve Y5 ifadeleri de hücre kültürünün ilerleyen günlerinde düştü. Tam tersine, HKH'lerin homingi için görevli en önemli reseptör olan CXCR4 (NPY-Y3) ifadeleri kültürde zaman içerisinde arttı. WST-1 proliferasyon testlerinde; hücre kültürlerinde 300 nM NPY HKH'lerin proliferasyonunun baskılandığı belirlendi ve hücre döngüsünün G0/G1 (sessiz) fazındaki HKH sayılarında önemli bir artış, S ve G2/M fazındaki HKH sayılarında bir azalma olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Taze insan HKH'lerinde tüm NPY reseptörleri farklı oranlarda ifade edilmektedir. HKH'ler hücre kültürüne maruz bırakıldığında, NPY-Y3 ifadelerinde bir artış, diğer reseptör ifadelerinde bir azalma gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, yüksek doz NPY HKH'lerin proliferasyonu baskılamakta ve sessiz fazındaki HKH'lerin sayılarını artırmaktadır.

Bu proje HÜ-BAP THD-2018-17209 tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hematopoetik Kök Hücreler, Nöropeptid Y, hücre döngüsü

TS009 - MicroRNA-let-7a functions as a tumor suppressor and inhibits cancer stem cell growth in triple negative breast cancer by targeting *PIK3CA*.

Havva Tezcan¹, Gulsah Cecener¹, Berrin Tunca¹, Unal Egeli¹

¹Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Bursa Uludag University, Bursa, Turkey

Triple-negative breast cancer (TNBC) is an aggressive disease with poor outcome and lacks targeted therapy. Recent studies have shown that breast cancer stem cells (BCSCs) are responsible for tumor initiation, progression, relapse, metastasis and drug resistance. Targeting cancer stem cells may also be a promising, novel strategy for the treatment of TNBC. Increasing evidence has shown that let-7a plays an important role in human cancer progression. Although, the PI3K/AKT/mTOR pathway is frequently activated in various human cancers. The purpose of this study is to demonstrate the interaction between 3'UTR sites of *PIK3CA* gene that are potential target for let-7a in MDA MB 231 cell lines. In this study, to explore the function of let-7a, two computational algorithms TargetScan and miRDB, were used to search for potential let-7a target genes and a large number of different target genes. Among these candidate target genes *PIK3CA*, which was predicted by all two algorithms, attracted our attention. BCSCs in MDA MB 231 cell line were labeled according to their *CD44+*/*CD24-* characteristics and isolated by fluorescence-activated cell sorting. Then, let-7a and *PIK3CA* 3'UTR groups were transfected into *CD44+*/*CD24-* MDA MB 231 cells and 48 hours after transfection; luciferase activities, cell proliferation and viability were measured. Also, after the transfection, the expression levels of *PIK3CA* gene in *CD44+*/*CD24-* MDA MB 231 cells were examined by RT-PCR. Expression of each gene was quantified by measuring cycle threshold (Ct) values and normalized using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method relative to *ACTB*. Student's unpaired t-tests were used to evaluate statistical significance. Spearman's correlation tests were used to evaluate the pair-wise expression correlation between let-7a and *PIK3CA*. Data are expressed as means \pm s.e.m. * $P < 0.05$; *** $P < 0.0001$ was considered statistically significant. The *PIK3CA* 3'UTR was confirmed as a direct target of let-7a by using the luciferase assay for the reporter gene expressing let-7a/*PIK3CA* 3'UTR binding sites ($p = 0,0151$). A significant decrease in *PIK3CA* gene expression ($p = 0,0435$) was detected with let-7a transfection in *CD44+*/*CD24-* MDA MB 231 cells. However, in these cells, significant cell death 25,63% ($p = 0,0001$) was also detected with WST-1 cell proliferation assay. Our results showed for the first time that let-7a functions as a tumor suppressor by targeting *PIK3CA* in BCSCs in TNBC.

TS010 - hsa-miR-128-1-5p Regulates Expression of NR3C2 mRNA Expression in Human Adrenal Gland Carcinoma

Serdar KARAKURT, Husamettin VATANSEV

Faculty of Science, Department of Biochemistry, Selcuk University Konya, TURKEY

Abstract: Nuclear receptor subfamily 3 group C member 2 (NR3C2) encodes the mineralocorticoid receptor for both mineralocorticoids (MC) such as aldosterone and glucocorticoids (GC) such as corticosterone or cortisol (Yang et al. 2018). MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs (~22 nucleotides in length) that function as guide molecules in RNA silencing and like many genes they affect aldosterone metabolism (Sober et al. 2010). The aim of this study is to clarify the effects of microRNAs on NR3C2 mRNA expressions. NCI-H295R cells, Human Adrenal Gland Carcinoma cells, were grown in DMEM/F12 medium supplemented with 2.5% Nu-Serum, 1% of ITS+ Premix and 2 mM glutamine. 3×10^4 of NCI-h295R cells were seeded into 24 well and incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 h. Cells were treated hsa-miR-128-1-5p mimic and inhibitors for 48 h and cell viability and proliferation was determined with Alamar Blue reagent. Inhibition of hsa-miR-128-1-5p expression with 5 nM of miRNA inhibitor increased NR3C2 mRNA expression as 10-fold ($p < 0.0001$), and treatment with 50 nM of hsa-miR-128-1-5p mimic leads the 2-fold inhibition of NR3C2 mRNA expression ($p < 0.005$).

Introduction: The renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) plays a critical role in the regulation of blood pressure (BP) homeostasis. The renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) plays a critical role in the regulation of blood pressure (BP) homeostasis. The loss of function variants in NR3C2 can cause pseudohypoaldosteronism type 1 (Riepe et al. 2006).

Material and Method

Determination of Cell proliferation

Human Adrenal Gland Carcinoma cells, were grown in DMEM/F12 medium supplemented with 2.5% Nu-Serum, 1% of ITS+ Premix and 2 mM glutamine. 3×10^4 of NCI-h295R cells were seeded into 24 well and incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 h. Cells were treated hsa-miR-128-1-5p mimic and inhibitors for 48 h and cell viability and proliferation was determined with Alamar Blue reagent (Karakurt & Adali 2016).

miRNA mimic and Inhibitor Transfection Studies

hsa-miR-128-1-5p expression was inhibited with 5 nM of miRNA inhibitor and increased and treatment with 50 nM of hsa-miR-128-1-5p mimic.

mRNA Expression Studies

NR3C2 mRNA expression was determined with qRT-PCR technique

Result:

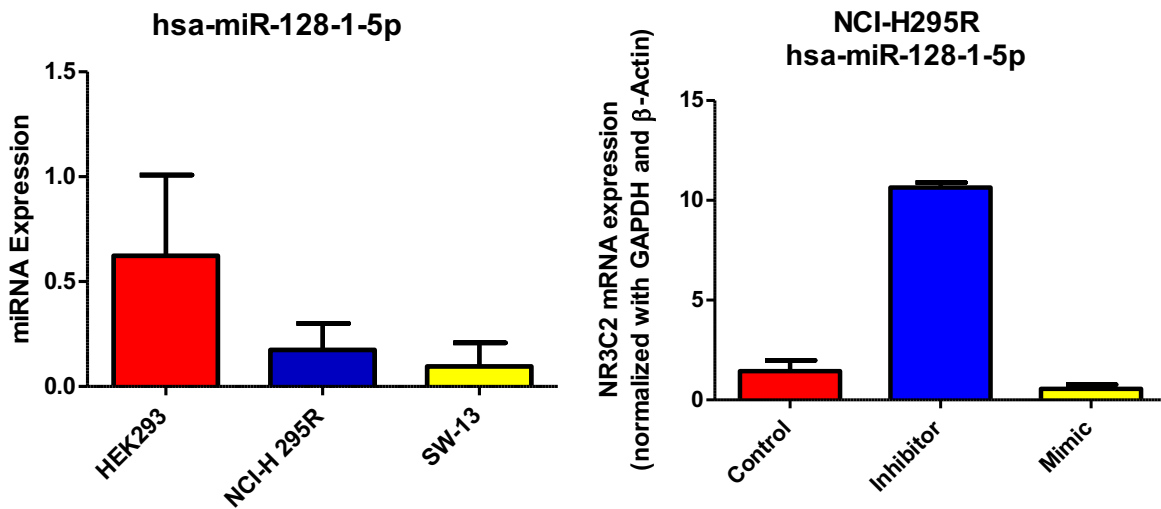


Fig.1 a) hsa-miR-128-1-5p expression of human adrenal gland carcinoma cells and human kidney epithelial cells. B) Effects of hsa-miR-128-1-5p on NR3C2 mRNA expression of human adrenal gland carcinoma cells

Conclusion: In conclusion, Since MR is a potential target for treatment in EH and other cardiovascular diseases, further research is needed to confirm the association between NR3C2 and the response to clinical treatment of cardiovascular disease. miRNAs are potent regulators of steroidogenesis and apoptosis in adrenocortical cells. hsa-miR-128-1-5p modulates NR3C2 expression and alters aldosterone and cortisol metabolism in Human Adrenal Gland Carcinoma cells. This project was supported by TUBITAK (114Z734).

References

- Karakurt S, Adali O (2016): Tannic Acid Inhibits Proliferation, Migration, Invasion of Prostate Cancer and Modulates Drug Metabolizing and Antioxidant Enzymes. *Anti-Cancer Agent Me* 16, 781-789
- Riepe FG, Finkeldei J, de Sanctis L, Einaudi S, Testa A, Karges B, Peter M, Viemann M, Grotzinger J, Sippell WG, Fejes-Toth G, Krone N (2006): Elucidating the underlying molecular pathogenesis of NR3C2 mutants causing autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type 1. *J Clin Endocr Metab* 91, 4552-4561
- Sober S, Laan M, Annilo T (2010): MicroRNAs miR-124 and miR-135a are potential regulators of the mineralocorticoid receptor gene (NR3C2) expression. *Biochem Bioph Res Co* 391, 727-732
- Yang YZ, Xu J, Tang F, Ga Q, Li YH, Guan W, Ge RL (2018): NR3C2 Gene is Associated with Susceptibility to High-Altitude Pulmonary Edema in Han Chinese. *Wild Environ Med* 29, 488-492

TS011 - Doğal Biyoaktif Timokinon, Kafeik Asit Fenetil Ester Ve Fukoidan Bileşenleri Anti-meme Kanseri Aktivitelerinin Triple-negatif MDA-MB-231 Hücrelerinde Araştırılması

Esra Eroğlu Köksal¹, Günay Balta², Fatima Aerts Kaya³

¹Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Pediatrik Hematoloji BD, Ankara

³Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Bilimleri AD, Ankara

Meme kanseri hücresel kompozisyon ve klinik sonuçlarıyla kompleks ve heterojen karakterde olan, kadınlarda en sık görülen ve en öldürücü kanser türüdür. Triple-negatif meme kanseri (TNMK, ER-/PR-/HER2-), diğer moleküler alt tiplere göre (ER+/PR+) çok daha agresif ve mortalite oranı çok daha yüksektir. Bu nedenle, TNMK için yeni hedef/ajanlara veya destek tedavilerine gereksinim duyulmaktadır. Yan etkileri bulunmayan, antioksidatif, anti-enflamatuar, antikanser özellikler gösteren, çörekotu, balırsı-propolis ve kahverengi yosun *Fucus vesiculosus* gibi farklı kaynaklardan izole edilen sırasıyla Timokinon (TK), Kafeik Asit Fenetil Ester (KAFE) ve Fukoidan (FK) son yıllarda kanser araştırmalarının popüler konusunu oluşturmuştur. Ancak, bu doğal biyoaktif bileşenlerden hangisinin daha üstün antikanser özellik taşıdığı bilinmemektedir. Bu çalışmada, TK, KAFE ve FK'nın insan TNMK hücre hattı (MDA-MB-231) üzerine sitotoksik etkilerinin karşılaştırmalı araştırılması hedeflenmiştir.

MDA-MB-231 meme adenokarsinoma hücreleri, 48s(saat) inkübasyonu takiben, periyodik artan TK, KAFE (50nM-150µM) ve FK (150ng/ml-500µg/ml) dozlarına 3 tekrarlı olarak, 24s, 48s, 72s maruz bırakılmış ve hücre canlılığı XTT analiziyle değerlendirilmiştir.

TK 1.5µM üzerindeki dozlarda 24s'te %20-30, 48-72s'te %40-50 öldürücü etki göstermiştir. KAFE 24s'te 5µM üzerinde tersine %50-100 proliferatif etkili, 48s'te tüm dozlarda etkisiz, ancak 72s'te 15µM üzerinde maksimum %20 sitotoksiktir. FK sadece 48-72s'te yüksek konsantrasyonda (500µg/ml) %40 öldürücü etkili, diğer uygulamalarda etkisizdir.

Bu çalışmada, TK, KAFE ve FK'nın antikanser etkilerinin karşılaştırmalı analizi ilk kez yapılmış, TK'un MDA-MB-231 hücrelerinde diğerlerinden çok daha düşük konsantrasyonlarda ve zaman diliminde çok daha yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği anlaşılmıştır.

Agresif TNMK'yle mücadelede, TK, araştırmalarda başı çeken KAFE'den daha ümit verici fitoteröpotik molekül ve ilaç adayı olabilir. Bu çalışma Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi ve Hacettepe Üniversitesi (BAP#8178) tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, MDA-MB-231, Timokinon, KAFE, Fukoidan

TS012 - Multipl Miyelom Hücrelerine Karşı Otolog Kök Hücre ve Mononükleer Hücrelerinden Dendritik Hücre Üretilmesi (Tümör Aşısı Üretilmesi)

Gülşen BUĞDAY¹, Ali ÜNAL², Mustafa Yavuz KÖKER³

¹Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Bilimleri, Kayseri

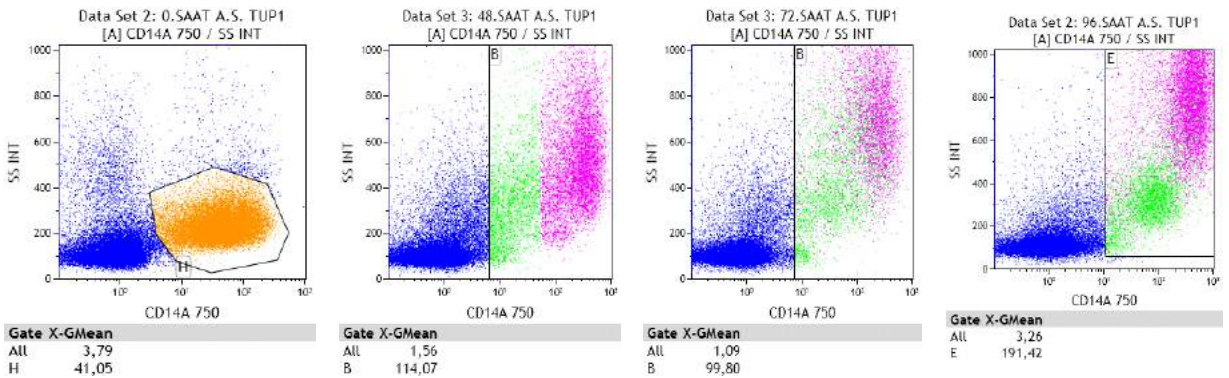
²Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri, Kayseri

³Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Kayseri

Amaç: Malin plazma hücrelerini ortadan kaldırılması için miyeloma spesifik immun cevabı sağlayacak tedavi ve günümüzde yeni yeni geliştirilen, maliyetli ancak uygulanabilir alternatif bir yöntem olan tümör aşısı üretimi için gereken hücrelerin elde edilmeye çalışıldı. Böylece antijen sunan hücre olan dendritik hücreye, miyelom hücrelerinin antijenik yapıları tanıtılarak tümör spesifik lenfositlerin oluşturulması hedeflenmiştir. Çünkü tümör aşısı hem tümöre karşı spesifik olmasından dolayı konvansiyonel tedavilere göre yan etkisi daha az hem de hafıza özelliğine sahip olmasından dolayı daha uzun koruma özelliğine sahiptir.

Gereç ve Yöntem: Multipl miyelom hastasından toplanmış kemik iliği numunesi ile otolog nakil olacak multipl miyelom hastadan toplanan kök hücre ve mononükleer hücrelerden alınan numune kültüre ekim işlemi için birleştirildi. Bu karışıma IL-4+GM-CSF sitokin kombinasyonu eklenerek hazırlanan flasklar en uygun kültür şartları olarak belirlenen %5'lik CO₂'li, 37°C sıcaklıkta ve nemli ortama sahip inkübatörde analizlerin yapılacağı saate kadar bekletildi. Daha sonra akım sitometri laboratuvarında 48, 72 ve 96. saatlerinde ekim ürününden alınan numunedeki hücrelerin tanımlanması ve bu hücrelerin canlılıklarının tespiti yapıldı.

Bulgular: CD14, CD34, CD45, CD80, CD83, CD86 ve CD209 antikorlarındaki değişimler akım sitometri cihazı ile 0, 48, 72 ve 96. saatlerdeki kök hücre ve mononükleer hücrelerin dendritik hücreye dönüşümünün olup olmadığı tespit edildi ve Annexin-V kiti ile kültür ortamında bulunan dendritik hücrelerin ne kadarının canlı olduğu belirlendi.



Şekil 1. Uygulamanın kültür öncesi ve kültür sonrası akım sitometrik analizi

Tablo 1. Kültür öncesi ve kültür sonrası antikorların ekspresyon düzeyleri

Yüzey Markerları	Kültür Saatleri	0. SAAT	48. SAAT	72. SAAT	96. SAAT
CD14		40,06	80,70	77,72	220,57
CD34		0,14	0,21	0,16	0,25
CD45		16,85	49,02	51,74	57,53
CD80		0,32	4,65	4,72	9,95
CB83		0,48	5,68	3,10	6,02
CD86		1,14	7,31	10,74	15,43
CD209		2,70	47,65	92,38	89,32
HLA-DR		0,37	6,96	13,52	13,26

(Açıklaması: Hücre kültür işleminin 0, 48, 72 ve 96. saatlerde alınan numunelerdeki akım sitometrik analizlere bağlı yüzey markerların (antikorların) ekspresyon düzeyindeki değişimler)

Sonuç: IL-4+GM-CSF sitokin kombinasyonunun in vitro kültür ortamlarına eklenmesi ve hücre kültür için 37°C sıcaklığa, %5 CO₂'li ve nemli bir ortama sahip inkübatör kullanılması dendritik hücre matürasyon gelişimini olumlu etkilediği tespit edildi. Multiple miyelom hastalarına uygulanabilir bir dendritik hücre bazlı otolog tümör aşısı eldesi için ilk basamakta gerekli olan dendritik hücre üretimi sağlandı.

Anahtar Kelimeler: Akım sitometri, Dendritik hücre, Hücre kültürü, Multipl miyelom, Tümör aşısı

TS013 - Nötropenik farelerde karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* sepsis modelinde mezenkimal kök hücre tedavisinin etkinliği

Gökçen Dinc¹, Esmâ Eren², Olgun Kontaş³, Mehmet Doğanay²

¹Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. ; Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri

²Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Kayseri

³Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Ana Bilim Dalı, Kayseri

Genel bilgi ve amaç: Sepsis hayatı tehdit eden progresif enfeksiyöz bir hastalıktır. Sepsis tedavisinde son yıllarda en önemli sorun; dirençli bakteriyel enfeksiyonların varlığıdır. Bu enfeksiyonlarda rol alan *K. pneumoniae* nozokomiyal pnömoni, yara enfeksiyonu, idrar yolu enfeksiyonu, invaziv alet ilişkili enfeksiyonlar, menenjit, peritonit ve biliyer sistem enfeksiyonlarına da yol açar (1, 2, 3). *K. pneumoniae* türlerinde gelişen karbapenem direnci nedeniyle tedavide son seçenek antibiyotik olarak kolistin tercih edilmiş fakat bu antibiyotiğe karşı da *K. pneumoniae* türleri direnç geliştirmeye başlamıştır. Yeni bir antibiyotik seçeneğinin olmadığı günümüzde hücrel tedavi seçenekleri gündeme gelmiştir (3,4). Bu seçeneklerden birisi de mezenkimal kök hücrelerin (MKH) kullanımındır (5, 6, 7). Bu çalışmada nötropeni modeli oluşturulan farelerde geliştirilen karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* sepsisinde, MKH uygulamasının tedavideki etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, Balb-c fareler intraperitoneal (*ip*) iki doz siklofosfomid verilerek nötropenik hale getirildikten sonra kontrol grubu (pozitif ve negatif) ve tedavi grupları (kolistin, kolistin-MKH, MKH) olarak ayrıldılar. Negatif kontrol grubu hariç tüm gruplarda sepsis geliştirmek için 3×10^7 cfu/ml karbapenem dirençli *K. pneumoniae* süspansiyonundan 0.1 ml *ip* enjekte edildi. Tedavi gruplarında bakteri verildikten 3 saat sonra *ip* antibiyotik ve MKH başlandı. Kolistin dozu 5 mg/kg yükleme dozu ve sonrasında 5 mg/kg/gün ikiye bölünmüş olarak 12 saat aralıkla uygulandı. Bakteri inokülasyonundan 3 saat sonra ve 48 saat sonra MKH 2×10^6 /kg dozda *ip* yolla uygulandı. Antibiyotik enjeksiyonu her 12 saatte bir tekrarlanırken, MKH 48 saat sonra 2.doz olarak uygulandı. Tüm fareler 48 ve 96 saat sonunda sakrifiye edilerek kalp, akciğer, karaciğer, periton ve dalaktan ekim yapıldı. Farelerin sağ akciğeri ve karaciğerin yarısından kantitatif kültür yapılarak bakteri yükü cfu/gr olarak hesaplandı. Sol akciğer, karaciğer dokusunun diğer yarısı ve her iki böbrek histopatolojik olarak değerlendirildi. Fare serumlarında IL-6 ve TNF- α sitokin düzeyleri ELISA ile belirlendi.

Bulgular: Deneyde 80 fare kullanıldı. Nötropenik fareler pozitif ve negatif kontrol grupları ile her bir tedavi grubunda 16 fare, bunların alt grubunda da 8'er fare olacak şekilde deneye alındı. 48 saatte grupların akciğer ve karaciğer dokusundaki bakteriyel yükleri değerlendirildiğinde; kolistin+MKH tedavi grubunda koloni sayısı tüm gruplara kıyasla önemli ölçüde düşüktü. 96 saatte ise tüm grupların akciğer ve karaciğer dokularında bakteri yükü kontrole göre anlamlı ölçüde azalmıştı ($p > 0,05$). Kolistin+MKH tedavi grubunda karaciğerde bakteri yükü diğer gruplardan düşük olmasına rağmen tedavi grupları arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Kolistin+MKH tedavi grubu ile kolistin tedavi grubu arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlı değil iken ($p=0,30$) kolistin+MKH tedavi grubu ile MKH tedavi grubu arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlı ($p=0,045$) bulundu. Ayrıca, kolistin+MKH kombinasyonunun 48. saatten itibaren akciğer ve karaciğer dokusundan bakteriyel yükü eradike etmeye başladığı, kolistin tedavisinin ise 96. saatte bakteriyel yükü eradike etmeye başladığı saptandı. Gruplar arasında sitokin seviyelerinde istatistiki olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

Tartışma: Sepsiste şimdiye kadar yapılan çeşitli deneysel hayvan çalışmalarında MKH'ler uygulanmış ve MKH hepsinde sağ kalım üzerine etkin bulunmuştur. Bu çalışmalarda MKH'lerin antiinflamatuvar ve immunomodulator etkisi ile sağ kalıma katkı sağladığı gösterilmiştir (6, 8, 9, 10). Ancak bu çalışmalar sağlıklı farelerde ve duyarlı mikroorganizmalara bağlı gelişen pnömoni veya sepsis modellerinde yapılmıştır. Bu çalışma ise nötropenik farelerde karbapenem dirençli *K. pneumoniae* ile sepsis oluşturularak gerçekleştirilmiş ve MKH'lerin etkinliği değerlendirilmiştir. Daha önce immunsuprese farelerde karbapenem dirençli *K. pneumoniae* ile oluşturduğumuz deneysel sepsis çalışmasında (11), tigesiklin ile kolistin kombine tedavisinin monoteraplere göre bir üstünlük sağlamadığı saptanmıştı. Bu çalışmada ise MKH ile kombine edilen kolistin tedavisinin, monoteraplere göre 48 ve 96. saatlerde karaciğer ve akciğerdeki bakteri yükünü önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi.

Sonuç: Sonuç olarak, nötropenik farelerde enfeksiyonun 48. ve 96. saatlerinde MKH+kolistin uygulanan grupta akciğer ve karaciğer dokularında bakteri yükünün, kolistin ve MKH monoterapi gruplarına kıyasla daha düşük olduğu ve hatta bakteriyel eradikasyonun en erken yalnızca bu grupta başladığı belirlendi. MKH'lerin *in vivo* sepsis modeli üzerinde kolistinle kombine edildiğinde kolistin veya MKH monoterapilerine göre iyileştirilmiş terapötik etkiler sağladığı görüşüne varıldı.

Anahtar sözcükler: Deneysel nötropeni, *K. pneumoniae*, mezenkimal kök hücre, sepsis

(Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 216S893 no'lu proje olarak desteklenmiştir.)

Kaynaklar

- 1- **Bishara, J., Leibovici, L., Huminer, D, Drucker, M., Samra, Z., Konisberger, H., Pitlik, S. 1997.** "Five-year prospective study of bacteraemic urinary tract infection in a single institution." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*, 16, 563-7.
- 2- **Genga, K.A., Russell, J.A. 2017.** "Update of Sepsis in the Intensive Care Unit." *Journal of Innate Immunology*, 9, 441-455.
- 3- **Donnenberg, M.S. 2015.** Pages 2503. Enterobacteriaceae. In: *The Principles and Practice of Infectious Diseases*. Editors: Bennett JE, Dolin R and Blaser MJ, 8th ed. Elsevier Saunders.
- 4- **Giamarellou, H., Poulakou G. 2009.** "Multidrug-resistant Gram-negative infections: what are the treatment options?" *Drugs*, 69(14), 1879-1901.
- 5- **Saeedi, P., Halabian, R., Fooladi, A.A.I. 2018.** "Antimicrobial effects of mesenchymal stem cells primed by modified LPS on bacterial clearance in sepsis." *Journal of Cellular Physiology*, doi: 10.1002/jcp.27298.
- 6- **Bouglé, A., Rocheteau, P., Hivelin, M., Haroche, A., Briand, D., Tremolada, C., Mantz, J., Chrétien, F. 2018.** "Micro-fragmented fat injection reduces sepsis-induced acute inflammatory response in a mouse model." *British Journal of Anaesthesia*, 121(6), 1249-1259.
- 7- **Ko, H.F., Tsui, S.S., Tse, J.W., Kwong, W.Y., Chan, O.Y., Wong, G.C. 2015.** "Improving the emergency department management of post-chemotherapy sepsis in haematological malignancy patients." *Hong Kong Medical Journal*, 21(1), 10-5.
- 8- **Mei S, Wang S, Jin S, Zhao X, Shao Z, Zhang R, Yu X, Tong Y, Chen S, Chen Z, Li Q. 2018.** "Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Attenuate the Multiple Organ Injuries Induced by Sepsis and Mechanical Ventilation in Mice." *Inflammation*. doi: 10.1007/s10753-018-0905-5.
- 9- **Saeedi, P., Halabian, R., Fooladi, A.A.I. 2018a** "Mesenchymal stem cells preconditioned by staphylococcal enterotoxin B enhance survival and bacterial clearance in murine sepsis model." *Cytotherapy*, 23. doi: 10.1016/j.jcyt.11.002.
- 10- **Kim, H., Darwish, I., Monroy, M.F, Prockop, D.J., Liles, W.C., Kain, K.C. 2014.** "Mesenchymal stromal (stem) cells suppress pro-inflammatory cytokine production but fail to improve survival in experimental staphylococcal toxic shock syndrome." *BMC Immunology*, 14 (15), 1. doi: 10.1186/1471-2172-15-111-Shirley ve ark., 2010).
- 11- **Demiraslan, H., Dinc G., Ahmed, S.S., Elmali, F., Metan, G., Alp, E., Doganay, M. 2014.** "Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* sepsis in corticosteroid receipt mice: tigecycline or colistin monotherapy versus tigecycline/colistin combination." *Journal of Chemotherapy*, 26(5), 276-281.

TS014 - Kültürde Mezenkimal Kök Hücreden Farklanan Osteoblastlar İle Oluşturulan Diyabetik Osteoporoz Kırık Taklidinde Kök Hücre Ve Nar Ekstraktının İyileşme Üzerine Etkileri

Sude Tuğlu², Doğa Özden Gülsün², Seher Seher², Pınar Kılıçarslan Sönmez¹,
İbrahim Mehmet Tuğlu¹

¹Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı
²İzmir Türk Koleji

Amaç: Diyabetik osteoporozlularda kemik kırıkları tedavileri zor durumlar olup yan etkileri azaltmak ve tedavi etkinliğini arttırmak amaçlı bitkisel ürün kullanımı yararlı olabilmektedir. Punica granatum (PG) nar çiçeği ürünü olup bu anlamda potansiyeli olan şifalı bitkidir. Bu çalışmada yağ kökenli mezenkimal kök hücreden (YDMKH) farkedandırılan osteoblastlar ile kültür ortamında oluşturulan kemiksi dokuda çizik yöntemi yara modelinde MKH ve PG etkisi incelendi.

Gereç-Yöntem: YDMKH ile osteojenik besiyerine eklenen 17β-estradiol (E2) ortamında kemiksi doku yapılarak Alizarin kırmızısı, Vonkossa ve osteonektin ile karakterize edildi. Diyabet yüksek glikozlu besiyeri ile osteoporoz E2 besiyerinden uzaklaştırılması ile taklit edildi. Pipet ucu ile standart çizik yapılarak kırık yara modeli oluşturuldu. Yaranın kapanması sürecinde MKH, PG ve birliktelklerini etkisi değerlendirildi.

Bulgular: YDMKH belirteçleri üzerinden karakterize oldular. Farklanan osteblastların klonik kemiksi adacıklar yaparak mineralize oldukları gösterildi. Yüksek glikozlu besiyerinde E2 uzaklaştırılması ile belirginleşen iyileşmedeki gecikmede, MKH ve PG birlikteliğinin anlamlı bir tedavi edici etkisi bulundu.

Sonuç: Zor iyileşen bir durum olan diyabetik osteoporoz için kültür ortamında oluşturulan modelin tedavi etkinliği için kullanılabilir bir yöntem olduğu düşünüldü. Maliyeti düşük, etkinliği yüksek ve yan etkilerin azalmasını sağlayabilecek bir uygulama olarak MKH ve PG birlikteliğinin in vivo deneysel modelde denenebileceği ve klinik kullanım bulabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: diyabetik osteoporoz, kırık, invitro model, kök hücre, nar ekşisi ekstraktı

TS015 - Diş Pulpası, Yağ ve Umbilikal Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Hücresel Özellikler Açısından Karşılaştırılması

Zeynep Burçin Gönen¹, Gökçen Dinç^{1,2}, Buket Banu Özkan¹, Nesime Öner Bulut¹,
Mustafa Çetin^{1,3}

¹ Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK), Kayseri

² Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji A.D., Kayseri

³ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları A.D, Hematoloji Bölümü

Giriş: Mezenkimal kök hücreler (MKH), kendi kendini yenileyebilen ve farklı hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeline sahip multipotent stromal hücrelerdir. MKH'ler; kemik iliği (1), yağ dokusu (2), amniyon sıvısı (3), diş pulpası (4), umbilikal kord ve wharton jeli (5) gibi vücuttaki birçok dokudan elde edilebilmektedir.

Amaç: Bu çalışmada amaç; insan vücudundaki üç farklı dokudan İyi Üretim Uygulamaları (GMP) Laboratuvarında aynı üretim koşullarında elde edilmiş MKH'lerin (yağ dokusu kaynaklı MKH (AD-MKH), umbilikal kord kaynaklı MKH (UK-MKH) ve diş pulpası kaynaklı MKH (DP-MKH)) hücresel özelliklerini karşılaştırmaktır.

Yöntem: Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi GMP Laboratuvarında kayıtlı, AD-MKH (n:10); UK-MKH (n:10) ve DP-MKH (n:10) verilerinin retrospektif taranması ile veriler elde edildi. Üç farklı kaynaktan elde edilen MKH'lerin morfolojik özellikleri, adipojenik ve osteojenik farklılaşma yetenekleri, gün cinsinden primer kültürden çıkma süresi, relatif telomeraz aktivitesi (RTA), dondurma-çözme canlılıkları ve bunlar arasındaki fark, akım sitometri ile belirlenen yüzey belirteçlerinin ekspresyon farklılığı açısından karşılaştırılmıştır. Gruplar arası istatistiksel analiz, ANOVA testi kullanılarak gerçekleştirildi. $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Sonuç: Hücrelerin içi yapıdaki fibroblast benzeri morfolojisinin tüm gruplarda birbirine benzer özellikte olduğu, adipojenik ve osteojenik olarak eşit derecede farklılaşma yeteneğine sahip olduğu bulundu. Flow sitometri bakımından karşılaştırıldığında negatif yüzey belirteç ekspresyonları AD-MKH $0,16 \pm 0,1$; UK-MKH $0,31 \pm 0,1$ ve DP-MKH $0,14 \pm 0,0$; CD105 yüzey belirteç ekspresyonları AD-MKH $99,8 \pm 0,1$; UK-MKH $98,3 \pm 1,2$ ve DP-MKH $99,1 \pm 1,7$; CD73 yüzey belirteç ekspresyonları AD-MKH $98,6 \pm 2,2$; UK-MKH $96,5 \pm 2,2$ ve DP-MKH $98,4 \pm 1,5$; CD90 yüzey belirteç ekspresyonları AD-MKH $99,8 \pm 0,1$; UK-MKH $99,1 \pm 1,9$ ve DP-MKH $99,6 \pm 0,3$; CD44 yüzey belirteç ekspresyonları ise AD-MKH $99,6 \pm 0,4$; UK-MKH $95,6 \pm 1,8$ ve DP-MKH $97,3 \pm 3,4$ bulunmuştur. Negatif yüzey belirteç ekspresyonunda UK-MKH, DP-MKH' e ($p=0,01$) göre ve AD-MKH' e ($p=0,03$) göre istatistiksel olarak yüksek bulundu. UK-MKH, AT-MKH' a göre istatistiksel olarak CD105 yüzey belirteç ekspresyonu ($p=0,03$) ve CD44 yüzey belirteç ekspresyonu ($p=0,00$) açısından düşük değerde bulundu. Primer kültürden çıkma süreleri; AD-MKH $10 \pm 1,2$; UK-MKH $13,3 \pm 2,6$ ve DP-MKH $13,1 \pm 3,1$ gündür. DP-MKH ($p=0,02$) ve UK-MKH ($p=0,01$), AD-MKH' ye göre daha uzun süre primer kültürde kalmıştır.

Hücrelerin RTA değeri AD-MKH $1,33 \pm 1,0$; UK-MKH $0,65 \pm 0,5$ ve DP-MKH $0,96 \pm 0,4$ olarak bulundu. Telomeraz değerleri ile gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark yoktu. Dondurma işlemi sırasında bakılan canlılık oranları AD-MKH $\%94,1 \pm 6,3$; UK-MKH $\%92,2 \pm 1,5$; DP-MKH $\%95,1 \pm 1,9$ iken çözme canlılıkları AD-MKH $\%83,3 \pm 7,3$; UK-MKH $\%85,6 \pm 4,2$; DP-MKH $\%92,5 \pm 1,7$ bulundu. Dondurma ve çözme işleminde başlangıca göre hücre kaybının AD-MKH $10,8 \pm 6,3$; UK-MKH $6,6 \pm 4,6$; DP-MKH $2,6 \pm 1,8$ olduğu belirlendi. Dondurma canlılıkları açısından her 3 grup arasında istatistiksel bir fark bulunmazken çözme canlılığında DP-MKH, AD-MKH' a ($p < 0,001$) göre ve UK-MKH' a ($p = 0,01$) göre daha yüksek canlılıkta çözdürüldü. Dondurma-çözme arasındaki hücre canlılığı farkı açısından UK-MKH ile diğer gruplar arasında herhangi bir farkı bulunmazken, AD-MKH' daki canlılık kaybının DP-MKH' ye göre istatistiksel olarak anlamlı ve yüksek olduğu bulundu ($p = 0,00$).

Tartışma: UK-MKH en genç MKH kaynağı olsa da hücreyel özellikler açısından DP-MKH VE AD-MKH ile morfoloji, adipojenik ve osteojenik farklılaşma, RTA değerleri, dondurma canlılığı, CD73 ve CD90 yüzey belirteç ekspresyonları özellikleri açısından farklılık göstermemiştir. AD-MKH' de bir avantaj olarak diğer gruplardan daha kısa sürede primer kültürden çıkarken, dezavantaj olarak DP-MKH' ya göre daha fazla dondurma-çözme esnasında canlılık kaybı göstermiştir. Üç farklı kaynak da benzer özellikleri ile klinik üretim açısından elverişli kaynaklardır. Üretim esnasındaki farklılıklar klinik cevabı etkilemektedir (9). Klinik başarı ile hücre kaynaklarının karşılaştırıldığı ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Hücre izolasyonu; Kök hücre kaynağı; Mezenkimal kök hücre.

Kaynaklar

1. 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. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–7. doi: 10.1126/science.284.5411.143.
2. Wagner W., Wein F., Seckinger A., Frankhauser M., Wirkner U., Krause U., Blake J., Schwager C., Eckstein V., Ansorge W., Ho A.D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* 2005;33:1402–16. doi: 10.1016/j.exphem.2005.07.003.
3. In 't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg-van der Keur C., Noort W.A., Claas F.H., Willemze R., Fibbe W.E., Kanhai H.H. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. 2003;102:1548–9. doi: 10.1182/blood-2003-04-1291.
4. Masako Miura, Stan Gronthos Mingrui Zhao, Bai Lu, Larry W. Fisher, Pamela Gehron Robey, Songtao Shi. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(10): 5807–5812. doi: 10.1073/pnas.0937635100.
5. Hou T., Xu J., Wu X., Xie Z., Luo F., Zhang Z., Zeng L. Umbilical cord Wharton's Jelly: a new potential cell source of mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng. Part A*. 2009;15:2325–34. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0402.
6. Bahr L., Sundberg B., Lönnies L., Sander B., Karbach H., Hägglund H., Ljungman P., Gustafsson B., Karlsson H., Le Blanc K., Ringdén O. Long-Term Complications, Immunologic Effects, and Role of Passage for Outcome in Mesenchymal Stromal Cell Therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2012; 18(4):557-64. doi: 10.1016/j.bbmt.2011.07.023.

TS016 - Dondurulmuş Mezenkimal Kök Hücrelerin Enflamatuar Sitokin Ekspresyon Seviyelerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Zeynep Burçin Gönen¹, Nur Seda Şahin², Ahmet Eken^{2,3}

¹Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi, Genom ve Kök Hücre Merkezi, Erciyes Üniversitesi Kayseri, Türkiye

²Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi

³Tıbbi Biyoloji A.D., Tıp Fakültesi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, Türkiye

Mezenkimal kök hücreler (MKH); kendini yenileme potansiyeli olan, osteoblast, kondrosit ve adiposit gibi özelleşmiş hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahip, erişkin, multipotent, progenitör ve klonal hücrelerdir. MKH' ler heterojendir ve karakterizasyonu için belirlenmiş tek bir biyobelirteç mevcut değildir. Bu nedenle, 2006 yılında Uluslararası Hücrel Tedavi Derneği tarafından bildirilen bir dizi özellik ile tanımlanması sağlanır (1). Yaygın olarak kabul gören bu kriterlere göre MKH' lerin; i) kendini yenileme yeteneği (self-renewal) ii) Yüzeylerinde CD73, CD90 ve CD105 belirteçlerini eksprese ederken CD45, CD34, CD14 ve HLA-DR gibi yüzey belirteçlerini eksprese etmemeleri iii) *In-vitro* koşullarda kemik, yağ ve kıvrıkdağa dönüşebilme (diferensiyasyon) özellikleri mevcuttur. MKH' ler stromal kökenleri, fibroblast benzeri morfolojilerinin yanı sıra kültürde plastik yüzeye hızlı adhezyonu ile karakterize edilir. Mezenkimal kök hücreler (MKH) immünomodülatör etkileri nedeniyle, farklı immün ve hücrel terapi seçenekleri için dikkat çekici bir kaynaktır (2). MKH'lerin hem *in vivo* hem de *in vitro* doğal ve adaptif immün yanıtlara müdahale ederek pro-enflamatuar veya anti-enflamatuar sitokinleri salgılamasıyla inflamasyonu engellediği düşünülmektedir (3).

Mezenkimal kök hücrelerin hücrel terapi, rejeneratif tıp ve doku mühendisliği gibi alanlarda kullanım potansiyelleri nedeniyle, erişimlerini ve kullanılabilirliklerini arttırmak için kriyoprezervasyon ve bankacılık fikri odak noktası haline gelmiştir. Bu çalışmada ise amaç uzun süreli dondurulmuş kök hücrelerin kullanımları öncesi kültüre edilmesi veya direkt kullanılmasının immünomodülatör mRNA ekspresyon seviyelerine olan etkisini değerlendirmektir.

Çalışmada Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi' nden temin edilen, 2015 yılında dondurulmuş diş pulpası kaynaklı MKH' ler kullanılmıştır. Grup 1 (n:6) 'de hücreler çözdürülerek kültüre alınmış ve %80 yoğunluğa ulaştığında tripsinizasyon yöntemi ile hücreler kaldırılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Grup 2 (n:6) 'de ise dondurulmuş örneklerden direkt çözdürme sonrası RNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından her iki örnek için cDNA sentezi Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) protokolüne göre yapılmıştır. Çalışmada TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-17a, TGF- β_1 ekspresyon seviyeleri 18S'e normalize edilerek değerlendirilmiş ve RT-PCR (Lightcycler 480 II, Roche) cihazındaki amplifikasyon değerleri ile analiz edilmiştir. 6 tekrarlı çalışılan değerlerde istatistiksel olarak dondulmuş ve kültüre edilmiş gruplar arası karşılaştırma, student-T testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Turcosa). $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Dondulmuş ve kültüre edilmiş TNF- α , IL-10, IL-6 ve IL-17a ekspresyon seviyeleri gruplar arasında anlamlı derecede farklı ve dondulmuş grupta yüksek olarak bulunmuştur ($p_{\text{TNF-}\alpha, \text{IL-10, IL-17a}} < 0,001$; $p_{\text{IL-6}} = 0,008$). IFN- γ ve TGF- β ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

MKH 'lerin dondurularak saklanması; taze dokulara duyulan sürekli ihtiyacı azaltmayı, kalite kontrol testlerini doğrulamak için kullanılabilir bir referans MKH kaynağı sağlayabilmeyi hedeflemektedir (4). Doku ve hücre bankaları, nakil için kullanıma hazır hücre tedarikinin yanı sıra tedavinin daha iyi zamanlanmasına olanak sağlayacaktır. Sağlıklı bir nakil için, etkili hücre rezervini korumak ve hücreleri erken pasajda dondurmamak esastır çünkü MKH'ların sayısı ve farklılaşma potansiyelleri artan pasaj sayısı ile azalmaktadır (3). Protokollerin optimize edilmesi, ortam kompozisyonunun dondurulması, soğutma cihazları ve saklama kaplarının yanı sıra [iyi üretim uygulamaları](#) (GMP) geliştirmek için çok sayıda araştırma yapılmıştır. Ancak mezenkimal kök hücrelerin kriyoprezervasyon süresince klinik kullanım için güvenli olması ve terapötik özelliklerini de koruması gerekmektedir. Bu nedenlerle hücrelerin hastaya en hızlı şekilde ulaşmasını sağlamak için dondurulmuş örnek düşünülebilir. Ancak hücreler ve dokuların donma işlemi sırasında meydana gelen fiziksel değişikliklere verdiği tepkilerin anlaşılması, donma hasarını en aza indirecek ve hastaya uygulanabilir fonksiyonel hücrelerin maksimum geri kazanımını sağlayacak olan protokollerin hazırlanması kriyoprezervasyon işlemi için önemlidir.

Bu enflamatuar sitokinlerin ekspresyon seviyelerindeki artış, özellikle allojenik transplanta dondurulmuş hücrelerin direkt kullanımını kısıtlamaktadır. Dondurma ve çözme immüsupresyonu etkilediğinden dolayı hastaya uygulama öncesi tekrar kültüre alınması enflamatuar sitokin ekspresyonunu düzenler ve tedavi yanıtını değiştirebilir. İmmünmodülatör etkinin rejeneratif cevaba olan etkisi üzerine yeni çalışmalar planlanmaktadır.

1. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315–317
2. Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymalstemcells: Immunomodulatorycapabilityandclinicalpotential in immunediseases. *J Cell Immunother.* 2016;2(1):3–20.
3. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymalstromalcells: sensorsandswitchers of inflammation. *Cell Stem Cell.* 2013;13(4):392–402.
4. S. Viswanathan, A. Keating, R. Deans, P. Hematti, D. Prockop, D.F. Storncek, *et al.* Soliciting strategies for developing cell-based reference materials to advance mesenchymal stromal cell research and clinical translation *StemCells Dev.*, 23 (2014), pp. 1157-1167

TS017 - 32 İmmünoterapi Ürünü Sitokin İle İndüklenmiş Öldürücü Hücrelerin Karakterizasyonundaki Farklılıkların Sebepleri

Fatma Eyüboğlu Ünüvar¹, Utku Seyis¹, Muhammet Yılanç¹, Bulut Yurtsever¹, Gözde Sır Karakuş¹, Ömür Selin Günaydın¹, Rengim Vural¹, Raife Dilek Turan²

*Acıbadem Labcell Hücre Laboratuvarı ve Kordon Kanı Bankası
Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Medical Biyoteknoloji*

Sitokin ile indüklenmiş katil (CIK) hücreler, periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerin (PBMC'ler) cGMP kültür koşullarında sitokinler ile uyarılmasıyla elde edilen heterojen hücre popülasyonudur. Bu heterojen hücre popülasyonu sitotoksik T, yardımcı T, NKT, NK lenfosit hücrelerinden meydana gelir. Heterojen hücre popülasyonunun çoğunluğunu NK (CD16+, CD56+), NKT (CD3+ CD56+) ve sitotoksik T lenfosit (CD3+ CD8+) hücreleri oluşturmaktadır. Herhangi bir antijen tanıtımı yapılmadan üretilen CIK hücreleri hedefe spesifik değildir ancak antijen tanıtımı yapılarak üretildiğinde antijen spesifik CIK hücreleri olarak adlandırılırlar. Üretimin her aşamasında kalite kontrolü prensip olarak standartlara uygunluğunu belirleyen süreci proses kontrolü olarak adlandırıyoruz. Proses kontrolünde değerlendirme için yeterlilik analizi yönteminden faydalanılır. Proses yetenek indeksi (Cpk) değerleri hesaplanarak prosesin yeterliliği ölçülür. Bu çalışmada Acıbadem Labcell olarak 2014 – 2017 yılları arasında üretilen CIK ürünü için yapılan proses kontrol sonuçları yıllara göre değerlendirilmiştir. Prosesin belli parametreler için yeterlilik analizlerinin beklenenin dışında olduğu tespit edilmiştir. İlk etapta sorunun üretim metoduna bağlı olduğu düşünölmüş ve metod değişikliğine gidilmiştir. Ancak her ne kadar yapılan validasyonlarda uygun sonuçlar alınsa da hastalar için üretilen ürünlerin sonuçlarının belli parametrelerde sapmalara sahip olduğu görölmüştür. Sebepleri araştırıldığında prosesde sapmalara yol açan şeyin hastaların bireysel farklılıkları ve tedavi süreçlerinde uygulanan metodların etken olduğu sonucuna varılmıştır. Gerçekten de yapılan analizler giriş hücre oranları ile çıkış oranları arasında belirgin bir bağ olduğu ve hastaların aldığı tedavi hastalığın çeşidi, evresi ile ilgili değişkenliklerin bu konuda rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır. Nitekim henüz yeni yayınlanan immünoterapi çalışmaları analizinde hastaların son bir ayda kullandıkları antibiyotikler ile klinik yanıtlar arasında belirgin ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple mevcut datanın hastanın yaşı ve cinsiyetinin yanı sıra hastalığın evresi tipi ve antibiyotik kullanımı ile ilişkisine dair bir takip mekanizması kurularak yeterli vaka sayısına ulaşıldığında yeniden analiz edilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Sitokinler, Sitokin ile indüklenmiş hücreler, Proses kontrolü, Validasyon, Hücresel Tedavi

TS018 - Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (AD-SCS) Kültürasyonunda ve Adipositlere Farklılaştırılmasında Trombositten Zengin Plazmanın (PRP) Etkinliği

Şükran Noyan Savaş¹, Afroz Rashnonejad², Burcu Denizlioğlu¹, Yiğit Özer Tiftikçioğlu³,
Gülinnaz Ercan^{1,2}

¹Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, İzmir

²Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Ana Bilim Dalı, İzmir

³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Ana Bilim Dalı, İzmir

Amaç: PRP, tam kanın santrifüj edilmesi ile elde edilir. Büyüme faktörlerini yoğun içermesi nedeniyle son yıllarda birçok tedavi alanında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İnsanın otolog olarak kendi kanından alınıp elde edilebildiği için PRP uygulaması alerjik etkilerin oluşmasını da engellemektedir.

Gereç-Yöntem: Çalışmamızda Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniğine liposakşın işlemi için başvuran gönüllü vericilerden etik komiteden onay alınarak alınan lipoaspirat/lipektomi materyalinden adipoz doku kök hücreleri (AD-SCs) saflaştırılmıştır. Hücreler kültüre edildikten sonra adipositlere farklılaştırılmıştır. Ayrıca, aynı vericilerden alınan periferik kan örneklerinden PRP de elde edilmiştir.

Bulgular: AD-SCs'in kültürasyonu ve adipositlere farklılaştırılması esnasında gereksinim duyduğu büyüme faktörlerinin temininde hayvansal kaynaklı fetal bovine serum (FBS) veya fetal calf serum (FCS) yerine insan vericilerden otolog olarak elde edilen PRP kullanılmıştır. Böylece hayvansal kaynaklı materyalden meydana gelebilecek immün red ya da alerjik reaksiyonun engellenmesi ya da azaltılması hedeflenmiştir. Ayrıca AD-SCs'in adipositlere farklılaştırılması esnasında hayvansal FBS yerine PRP kullanılması farklılaşma sürecini yaklaşık iki kat kısaltmıştır. Aynı zamanda, kültürasyonunda PRP kullanılan ortamdaki hücre miktarının FBS kullanılan ortamdaki hücrelere göre yaklaşık 2 kat fazla olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin %20 PRP kullanılan kültürde dt (doubling time, ikilenme süresi, hücrelerin sayısal olarak ikiye katlanma süresi) 20.087 saat iken, %20 FBS kullanılan hücrelerde dt 35.99 saat olarak saptanmıştır.

Sonuç: Sonuç olarak MKH'in kültürasyonunda FBS yerine PRP kullanılmasının daha etkin olduğu belirlenmiştir. Klinik çalışmalarda MKH'in kültürasyonu ya da diferansiyasyonu prosedürlerinde gereksinim duyulduğunda hayvan kaynaklı FBS ya da FCS yerine insan kaynaklı otolog PRP kullanımı immün reddi de önleyebileceğinden ya da azaltabileceğinden rahatlıkla önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: AD-SCs, Büyüme Faktörleri, Mezenkimal kök hücreler, PRP

TS019 – 3-Deazaneplanocin A (DZNep) kills proliferating cells and increases expression of midbrain dopaminergic genes in hESC-derived neural progenitors

Mehmet Oktar Gülođlu¹, Nicolaj Stroeyer Christophersen²

¹*İstinye Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, İstanbul*

²*Novo Nordisk A/A Denmark*

Polycomb group (PcG) proteins have been shown to regulate the epigenetic state of ESCs by histone methylation. The small molecule S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor 3-Deazaneplanocin A (DZNep) is one of the most potent inhibitors of PcG activity. It has been shown that DZNep selectively induces apoptosis in cancer cells, but not in normal cells.

In this study, we hypothesized that repressing the PcG protein expression using DZNep may kill the undifferentiated and highly proliferating cells in our hESC-derived NP culture, leading to a safer cell population for transplantation in PD.

We tested different concentrations of DZNep and observed cell death in our NPs upon treatment with DZNep concentrations ranging from 5 to 50 μ M.

To study if DZNep selectively kills proliferating cells in our NP culture, we immunostained the cells for the proliferation marker Ki67 after 5 μ M DZNep treatment. Our results revealed that the percentage of Ki67+ cells significantly decreased from 69,1% for untreated cells to 30,7% for DZNep treated cells.

To identify if DZNep has any effects on the expression of DA neuron-related genes, we then screened the gene expression of Nurr1 and TH. Surprisingly, DZNep treatment increased the expression of both genes, with the most significant increase observed after treatment with 50 μ M DZNep for Nurr1, and 1 to 10 μ M DZNep for TH ($p < 0.01$, $n = 4$).

We then differentiated DZNep treated neural progenitors to dopaminergic neurons to address whether the effects seen at gene expression level will also affect the percentage of cells that exhibited features of DA neurons after the full differentiation protocol. A concentration of 50 μ M DZNep treatment significantly reduced the percent of proliferating cells to 9%; however, administering this concentration also killed most of the DA neurons decreasing the proportion of TH positive cells in the cultures from 11% to 6%. Our results showed that 10 μ M DZNep treatment is the optimal concentration for decreasing the percent of Ki67+ cells whereas increasing the percent of TH+ neurons.

DZNep selectively kills highly proliferating NPs, but the cell death-inducing pathway is unknown. Therefore, we examined the gene expression of key apoptosis pathways using PCR Array after 3, 6 and 12 hours of 10 μ M DZNep treatment. Our results revealed that Ezh2 inhibition by DZNep administration is associated with increased TNFRSF10B transcript levels in NPs by time. TNFRSF10B is one of the two transmembrane receptors that are associated with TRAIL-induced apoptosis. cells.

Retinoic acid (RA) has widely been used in clinical trials for several cancer types. PcG proteins were previously identified as downstream targets of RA signaling in ESCs. In ESCs, RA treatment results in a decrease of H3K27me3, a marker of active PcG transcriptional repression. RA has also been shown and used to differentiate neural progenitors into dopaminergic neurons. Considering the similar mechanism RA and DZNep have on these cells, it is reasonable to think increased DA differentiation after DZNep treatment is the consequence of similar mechanisms.

DZNep treatment also increased Nurr1 expression in NPs. Nurr1 is not only involved in dopaminergic differentiation but also protects against apoptosis. It should be further analyzed whether innately expressed Nurr1 selectively protects dopaminergic progenitors from apoptotic effects of DZNep, or the increased anti-apoptotic expression of Nurr1 after the administration of DZNep primes NPs into midbrain dopaminergic fate.

In summary, our results show that DZNep treatment of neural progenitors significantly decreased the proportion of cells that proliferate in the culture. DZNep treatment caused these cells to undergo apoptosis via the TRAIL pathway. Moreover, it significantly increased the expression of midbrain dopaminergic genes, and increased the percentage of the dopaminergic neurons after full differentiation, while decreasing the percent of the proliferating cells.

TS020 – Sodium Pentaborate Pentahydrate in Combination With F68 Pluronic Block Polymer Represses Adipogenic Differentiation From Human Adipocyte Stem Cells and Thereby Restricts Fat Accumulation

Nezaket Türkel Sesli

Yeditepe University, Faculty of Engineering, Department of Genetics and Bioengineering, Kayışdağı, Istanbul 34755, Turkey

Abstract: Obesity is an important public health problem worldwide and the major risk factor for certain diseases including cardiovascular disease, diabetes, cancer and depression. Unfortunately, currently available anti-obesity drugs have failed in the long-term maintenance of weight control. It has been a challenge to design new types of drugs that could potentially treat obesity or prevent gaining weight leading to it. Since it is a consequence of the formation of new mature adipocytes from undifferentiated precursors, drugs that might control adipogenesis could be beneficial for the treatment of obesity. In the current study, combined effect of sodium pentaborate pentahydrate (NaB) and pluronic F68 on adipogenic differentiation was examined by using human adipose stem cells (hASC) *in vitro*. Immunocytochemistry and quantitative RT-PCR were performed to evaluate the levels of adipogenesis-promoting genes; peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ), fatty acid binding protein (FABP4) and adiponectin. Results indicated that expressions of all these three genes were restrained. Furthermore, Oil Red O staining revealed that lipid vesicle formation was reduced in hASC treated with NaB/F68 complemented differentiation medium. Herein, we showed that combination of NaB and F68 curtails adipocyte differentiation by inhibiting the adipogenic transcriptional program leading to a decrease in lipid accumulation in the cell even at very low doses, thereby uncovered striking opportunity to use this combination in obesity treatment.
Keywords: sodium borate, F68, adipose stem cell, Hippo pathway, adipogenic differentiation, obesity

Introduction: During adipogenic differentiation, a number of genes have to be expressed in coordinated fashion to determine the different stages of adipogenesis. PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) is the master regulator of adipogenesis and regulates the expression of genes involved in generating and maintaining adipocytes including fatty acid binding protein(FABP4)(1). Adiponectin(ADPN) is an adipokine hormone secreted from adipose tissue and functions in carbohydrate metabolism to increase insulin sensitivity and boost glucose metabolism(2).

Boron is essential to maintain health in rats and other mammals by playing an important role in embryogenesis, bone growth and immune response. Previous studies suggested that boron deprivation in the diet significantly affects both bone and teeth growth, and impaired development(3-5). Recent studies showed that sodium pentaborate pentahydrate (NaB) is a good alternative as boron source in the regeneration studies(6).

F68 is a pluronic block co-polymer and can be used to protect cells against toxic conditions and for drug delivery purposes(7,8).

Here, we investigated the effects of sodium pentaborate pentahydrate (NaB) combined with poloxamer F68 on adipogenesis of hASCs, *in vitro*. In here, we demonstrated that NaB and F68 combination prevented adipocyte differentiation by inhibiting the adipogenic transcriptional program leading to the reduction of lipid accumulation into the cell.

Material and Methods

Primary human ADSCs used were isolated from subcutaneous adipose tissue samples harvested from the abdomen and upper inner thighs of two healthy adult female donors undergoing liposuction procedure. Characterization of hADSCs were conducted and effects of pluronics F68 and NaB were tested on the cell viability. Then hADSCs were induced to differentiate into adipocytes using an adipogenic differentiation medium. Immunohistochemistry assay was performed at the end of the differentiation procedures by incubating cells with primary antibodies of PPAR- γ , FABP4 and adiponectin. Total RNA isolation after differentiation and qRT-PCR were performed in triplicate using primers of PPAR- γ , FABP4 and adiponectin genes. Further validation of adipogenic differentiation parameters was carried out by performing Oil Red O staining to visualize the intracellular lipid vesicles.

Results : In our study, real time PCR showed that hASCs treated with F68 and NaB complemented differentiation medium had significantly lowest mRNA expressions of the marker genes for adipogenesis compared to positive control (differentiation medium only). In contrast, only NaB addition to differentiation medium altered the hASCs to increase the expression of these genes compared to positive control. Interestingly, F68 complementation to differentiation medium did not alter the expression levels of PPAR γ and FABP4, but significantly increased the adiponectin gene expression level. Furthermore, immunocytochemical analysis also indicated that the expression of these markers were reduced substantially in NaB-F68 combination group while the positive control group exhibited higher expressions of adiponectin, FABP4 and PPAR- γ . Interestingly, Oil red O staining demonstrated that addition of NaB to differentiation medium uplift the differentiation potential of hASCs and generated more lipid vesicles. In terms of obesity aspect it is not desired as more lipid vesicles mean more mature adipocytes. But when same amount of NaB was applied in the presence of F68, results were strikingly opposite that differentiation of hASCs was perturbed.

Discussion and Conclusion: Consequently, this is the first study demonstrating that NaB in combination with F68 reveals an anti-obesity property when administered to primary hADSCs isolated from human adipose tissue. Inhibition of the differentiation programming in these cells was underscored through the down-regulation of the key adipogenic transcription factor-PPAR γ . The reduction in previously suggested dose of NaB by using F68 may offer more advantages when evaluating the potential of this combination in the treatment and management of obesity. Further extensive experiments are still required to improve our understanding of working principle of this combination and to evaluate its anti-obesity effect *in vivo*.

References

1. E. D. Rosen, C. J. Walkey, P. Puigserver, and B. M. Spiegelman, "Transcriptional regulation of adipogenesis," *Genes Dev*, vol. 14, no. 11, pp. 1293–1307, 2000.
2. E. E. Kershaw and J. S. Flier, "Adipose tissue as an endocrine organ," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 89, no. 6, pp. 2548–2556, 2004.
3. S. S. Hakki *et al.*, "Boron enhances strength and alters mineral composition of bone in rabbits fed a high energy diet," *J Trace Elem Med Biol*, vol. 27, no. 2, pp. 148–153, 2013.
4. F. H. Nielsen, "Dietary fat composition modifies the effect of boron on bone characteristics and plasma lipids in rats," *Biofactors*, vol. 20, no. 3, pp. 161–171, 2004.
5. H. M. Wu, Q. Wang, C. N. Gao, and X. L. Wei, "[Effect of boron and fluoride on the expression of enamelin in rat incisor]," *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, vol. 26, no. 3, pp. 244–247, 2008.
6. P. N. D. Tasli A. Demirci, S. Sahin, F., "Boron enhances odontogenic and osteogenic differentiation of human tooth germ stem cells (hTGSCs) in vitro," *Biol Trace Elem Res*, vol. 153, no. 1–3, pp. 419–427, 2013.
7. BASF Performance Chemicals, "BASF, Ludwigshafen, Germany.," 1988.
8. BASF Technical Information, "Pluronic PE types," *BASF, Ludwigshafen, Ger.*, 1989.

TS021 – Kök Hücre Bağışçılığı Farkındalığının Değerlendirilmesi

Yasemin Oyacı¹, Çiğdem K. Çınar¹, Ayşe Emel Önal², Hülya Gül², Nilgün Bozbuğa³,
Fatma S. Oğuz¹

¹İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

²İstanbul Üniversitesi Toplum Hekimliği Uygulama Araştırma Merkezi

³İstanbul Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahi Anabilim Dalı

Hematopoetik kök hücre nakli (HKHN), kemik iliği kanserleri (ALL,AML vb), lenfomalar, kalıtsal anemiler ve immün yetersizlikler gibi birçok hastalığın tedavi seçeneğidir. Hastalara uygun doku tipine sahip vericiler öncelikle kişinin kardeşleri, anne-babası ve yakın akraba içi bireylerden taranır. Uygun verici aile içerisinde bulunamaz ise tarama, akraba olmayan gönüllü bağışçılar arasında yapılmaya başlanır.

Gönüllü bağışçıları bir havuzda toplayan HKH bankaları kurulmuştur. 33 milyon kök hücre bağışçısı ile Dünya Donör Bankaları Birliği (WMDA)'ne üye 134 banka birbirleriyle entegre olarak çalışmaktadır. Bu bankalar tamamen gönüllülük esaslı ile bağışçıların doku gruplarını havuzda toplayıp başvuran hastaların doku grupları ile karşılaştırarak hastaya en uygun kök hücre vericisini bulmayı hedefler.

Hematopoetik kök hücreler, kemik iliği, kan ve göbek kordonundan elde edilirler. Damar yolu ile verildiğinde kemik iliğine yerleşir ve hematopoezi (kan hücrelerinin oluşumu) başlatırlar. Bu çalışmadaki amacımız İstanbul Tıp Fakültesi 5. Sınıf öğrencileri ile toplumdan rastlantısal seçilmiş erişkin bireylerin kök hücre bağışçılığı ile ilgili bilgi ve tutumunu belirlemektir. Çalışmaya 285 öğrenci (Grup I, yaş ort:24.2, K/E:136/149) ve 168 erişkin birey (Grup II, yaş ort:45.4, K/E:113/55) dahil edildi. Her iki gruba da 21 adet sorudan oluşan anket formu gözlem altında görüşme yöntemi ile doldurtuldu.

Öğrenci ve toplumdan bireylerin kök hücre bağışı farkındalığı açısından istatistiksel olarak karşılaştırılmasında öğrencilerin farkındalığının halktan çok ileri derecede anlamlı olacak şekilde yüksek olduğu saptandı ($\chi^2= 46,963$; $p<0,001$). Farkındalık kazanma yolu olarak öğrenci grubunda okul, rastlantısal seçilmiş bireylerde ise yazılı/görsel basın öne çıkmaktaydı. Her iki grupta ister kan ister kök hücre bağışı yapanlar %24 öğrenciler, %26 toplumdan bireyler şeklindeydi.

Anahtar Kelimeler: gönüllü bağışçılık, kök hücre, kök hücre nakli

TS022 – Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPKH) Bankacılığında Kullanıma Yönelik, Besiyeri Tabanlı Karşılaştırma Çalışması

Sema Aygar¹, İnci Cevher Zeytin¹, Berna Alkan¹, Emine Kılıç², Fatma Visal Okur³, Duygu Uçkan Çetinkaya³

¹Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Ankara

²Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Kırıkkale

³Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Pediatrik Hematoloji BD, Ankara

uPKH (iPSC)'ler, hastalık modelleme, ilaç araştırmaları ve tedavi denemelerine yönelik sahip oldukları potansiyel ile gereksinimi hızla artan hücrelerdir. Vücuttan alınan herhangi bir hücreye in-vitro ortamda pluripotent özellik kazandırılması sonucu elde edilen uPKH'ler, istenilen hücre tipine farklılaştırılarak kişiye özel incelemeler/uygulamalar yapılmasına izin vermektedir. Bu özellikleriyle, uPKH'lerin bankalanması, biyoteknolojik alanının en ilgi çeken konuları arasında yer almış, ilaç endüstrisi ve sağlık alanında gelişim için değerli hale gelmiştir. Çalışmamızda, çok aşamalı ve her aşaması değişken barındıran bir süreç olan uPKH üretiminin bankalama için en uygun (seri/ucuz/kolay) hale getirilmesi amacıyla, farklı besiyerleri temelli karşılaştırma yapılmış, karakterizasyon dışında metabolik özellikleri incelenmiştir.

Sağlıklı bireylerden elde edilen mezenkimal kök hücrelere Sendai virüs ile Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc genlerinin aktarımı sonucu laboratuvarımızda geliştirilen uPKH'ler, dondurulmuş olarak saklanmakta iken, erken ve geç pasajlara ait örnekler çözülerek, dondurulduğu besiyeri olan E8 içerisinde matrijel kaplı plaklara ekilmiştir. İki grup oluşturularak hergün (E8_besiyeri) veya üç günde bir besleme (E8 flex_besiyeri) yapılmıştır. Hücrelerin morfolojileri günlük takip edilirken, ilerletilmiş pasajlarda belirli yoğunluğa ulaştıklarında, pluripotensite ve köklülük belirteci ifadeleri ile mitokondriyal yoğunluk ve ROS düzeyleri ölçülmüştür.

uPKH üretim sürecinde hergün değişim gerektiren E8 besiyeri ile kıyaslandığında, üç günde bir beslemeye olanak veren E8 flex besiyerindeki sonuçlar olumlu bulunmuş; hücrelerin karakterizasyonu ve metabolik özelliklerinin günlük besleme yapılan besiyerindeki sonuçlar ile benzer olduğu gözlenmiştir. Edinilen bu ön verilerin ileri genetik/epigenetik incelemelerle desteklenmesi halinde hafta sonu dahil her gün besleme gerektirerek paha ve zaman ihtiyacını arttıran ve bankalama sürecinde iş ve maliyet yükü anlamına gelen E8_kültür sistemi yerine E8 flex içeren kültür sisteminin, ülkemizde bir ilk olarak oluşturulması planlanan uPKH bankacılığında tercih edilmek üzere uygun bir alternatif olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH ya da IPS hücreleri), uPKH bankacılığı, E8 besiyeri, E8 flex besiyeri

TS023 – Dental Folikül Mezenkimal Kök Hücrelerin Pemphigus Vulgarisli Hastaların Dendritik Hücre ve Lenfositleri Üzerindeki İmmünregülasyon Etkilerinin Araştırılması

Yazgül Duran¹, Züleyha Özgen², Tülin Ergun², Kamil Göker³, Tunç Akkoç¹.

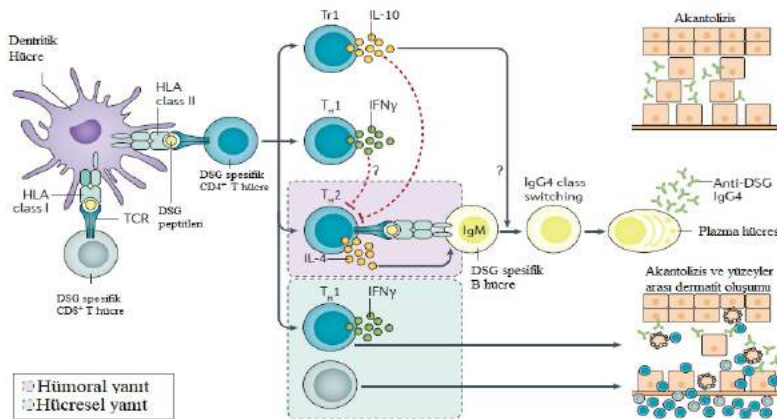
¹Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, İstanbul.

²Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dermatoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul.

³Marmara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız ve Çene Cerrahi Ana Bilim Dalı, İstanbul

Amaç: Pemfigus Vulgaris (PV), deride ve mukozada su dolu kabarcıklar ve ülserlerle karakterize, dezmozomal kaderin proteinleri (dezmozoglein-1, dezmozoglein-3) hedef alan antikor aracılı otoimmün kronik bir deri hastalığıdır. Hastalık patogenezinde başlıca IgG tipi oto antikorların dezmozomal proteinlere bağlanarak keratinosit-keratinosit bağlantısını bozması ve sonucunda intraepitelyal ayrışma oluşması ile karakterizedir. Hem genetik faktörler hem de çevresel faktörler PV hastalığını tetikleyebilir. PV' in ana tedavisi uzun dönem yüksek doz steroid tedavidir. Ek olarak bağışıklık sistemini baskılayan immünsupresif tedavi ve ajanları kullanılmaktadır. Hem steroidlerin hem de immünsupresif ajanların ciddi yan etkilere sebep olması nedeniyle etkinliği yüksek, yan etkisi yok/çok az tedavi seçenekleri arayışı devam etmektedir. Bu amaçla yapılmış *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarda kök hücre tedavisi umut vadetmektedir.

Dendritik hücreler, edinsel immün yanıtın başlangıcında ve düzenlenmesinde temel rol oynayan antijen sunan hücrelerdir. Bu hücreler aynı zamanda doğal ve edinsel immün yanıt arasında önemli bir köprü görevi görür. Dendritik hücreler CD34⁺ kemik iliği öncül hücrelerinden veya CD14⁺ monositlerden gelişir. Olgunlaşmamış Dendritik hücrelerin antijen alım kapasitesi en yüksektir. Yapılan çalışmalarda PV hastalarının patogenezinde dezmozoglein antijenlerinin T hücreye sunumu ve ardından B hücrenin antikor üretiminde dendritik hücrelerin önemli rol oynadığı gösterilmiştir.



Şekil 1: Pemfigus Vulgaris hastalık patogenezinin ve dendritik hücrenin rolünün şematik gösterimi (Michael Kasperkiewicz ve ark. Nature Reviews Disease Primers. Article number: 17026 doi:10.1038/nrdp.2017.26. 11 May 2017).

MKH'lar immünomodulator ve rejeneratif özellikleri, *in-vitro* proliferatif kapasitleri ile tedavi yaklaşımlarında etkili hücreler olmaktadır. Güncel olarak IBH, GVHD, multiple sekleroz, otoimmün romatoid hastalıklar ve otoimmün diyabette MKH'lar 300'den fazla klinik çalışmada tedavi seçeneği olarak denenmektedir (clinicaltrials.gov). MKH'ler kemik iliği, adipoz doku, kordon kanı, dental folikül ve plasenta gibi farklı dokulardan izole edilebilmektedir.

MKH'lerin klinik uygulamalar için öne çıkan özellikleri arasında 1-IFN- γ ve TNF- α sitokinlerine yanıt vermesi, 2- immün uyarımlarda indoleamine 2,3dioxigenase (IDO) salgılamaları, 3- MKH'lerin ksenotransplantasyon modellerinde başarılı olması, 4- MKH uygulamalarında düzenleyici immün yanıt oluşması sayılabilir. Bu özellikler MKH'lerin prelinik çalışmalarda hayvan modellerinde doku hasarlarında ve inflamatuvar hastalıklarda kullanımına ve çalışmaların kliniğe aktarılmasına imkan sağlamaktadır.

Mezenkimal kök hücre (MKH) ile hücresele tedavi birçok otoimmün hastalığın tedavisinde immünojenitesinin düşük olması, doku reddine yol açmaması ve inflamasyonun baskılanmasında başarılı olması nedeniyle iyi bir tedavi seçeneği olarak görülmektedir.

Uluslararası Kök Hücre Kriterlerine göre MKH'lar Plastik yüzeye yapışabilen, Osteojenik, Kondrojenik ve Adipojenik farklılaşabilen ve Yüzeyinde CD73, CD90, CD146, CD105, CD146' ı %95'in üzerinde ifade eden, CD45, HLA-DR, CD34, CD14 ifade etmeyen hücreler olarak tanımlanır.

Çalışmamızda Dental Folikül Mezenkimal Kök Hücrelerin (DF-MKH), PV'li hastalardan izole edilen Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PKMH) ve dentritik hücreleri üzerindeki (DH) immünomodulator özelliklerinin *in vitro* ortamda incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Molar diş çekimi esnasında çıkarılan DF-MKH'ler üçüncü pasaja kadar çoğaltıldıktan sonra MKH kriterlerine uygunluğunu analiz etmek için akım sitometrik yöntemle karakterizasyonu ve osteojenik, kondrojenik, adipojenik farklılaşma kültürleri gerçekleştirildi. PV tanısı almış hastalar (n=5) ve sağlıklı bireyler (n=5) çalışmaya dahil edilmiştir. 10cc venöz kandan PKMH izolasyonu yapıldı; uyaransız/antiCD3-antiCD28(CDmix) uyarımlı ortamda; MKH'li ve MKH'siz 3gün kültürleri yapıldı. Kültür sonrası akım sitometri cihazında lenfosit apoptozu, Tregulator hücre oranı, DH kostimülasyonu ve naive, efektör, efektör bellek ve merkez bellek CD4+ T lenfosit oranları bakıldı.

Bulgular: PV hastalarının CDmix uyarımlı mononükleer hücreler ile DF-MKH birlikte kültürlerinde CD4+T lenfosit apoptozu (6,7 \pm 1,7) kök hücresele kültürlerine göre (23,6 \pm 2.1) istatistiksel anlamlı azaldı (p<0,05). PV hastalarının CDmix uyarımlı mononükleer hücreler ile DF-MKH birlikte kültürlerinde CD4+CD25+FoxP3+ Tregulator hücre oranları (3,6 \pm 0,3) kök hücresele kültürlerine göre (1,8 \pm 0,4) istatistiksel anlamlı arttı (p<0,05). PV hastalarının CD11b+ hücrelerde CD83, CD86 ifadesi CDmix uyarımlı kültürlerde sağlıklı bireylere göre anlamlı yüksektir (p<0,05). DF-MKH'ler PV hastalarının efektör ve efektör bellek CD4+ T lenfosit oranlarını anlamlı azaltırken, naive CD4+ T lenfosit oranlarını istatistiksel olarak anlamlı arttırmıştır (p<0,05).

Sonuç: Bu sonuçlar doğrultusunda Elde ettiğimiz bu sonuçlar PV hastalığının hem patogenezini aydınlatacak hem de yeni bir tedavi yaklaşımı olarak planladığımız Mezenkimal Kök Hücre çalışmalarına öncülük edecektir.

TS024 – Evaluation of Superoxide Dismutase Enzyme Levels in Patients with Degenerative Lumbar Spine

Erek Öztürk¹, Eyüp Can Savrunlu², Murat Kahraman², Selçuk Özdoğan³, Erdinç Civelek², Serdar Kabataş²

¹Dr. Nafiz Körez Sincan State Hospital, Department of Neurosurgery, Ankara, Turkey

²Gaziosmanpaşa Taksim Training and Research Hospital, Department of Neurosurgery, Istanbul, Turkey

³Sancaktepe Şehit Prof. Dr. İlhan Varank Training and Research Hospital, Department of Neurosurgery, Istanbul, Turkey

Objective: In this study, patients who underwent surgery due to lumbar degenerative spine were evaluated together with superoxide dismutase levels and compared with the control group.

Materials-Methods: A control group of 94 patients with lumbar degenerative spine disease and 64 patients without lumbar degenerative spinal disease were enrolled in our clinic. Human Superoxide dismutase (SOD) ELISA Kit was used to measure the amount of SOD in the samples. For each standard, control and sample, double readings were averaged and average zero standard optical density was subtracted. Serum SOD enzyme levels were determined by Student-t and Mann Whitney-U test to determine differences between groups.

Results: No statistically significant difference in SOD levels was found between patient and control group. After this comparing, the patient group was divided according to the characteristics of the disease, clinical symptoms, VAS values, ODI scores and statistical significance was sought by looking at the SOD levels among these parameters. Based on these parameters, no statistically significant difference was found in the statistical calculations made within the patient groups themselves.

Conclusion: As a result, there was no statistically significant difference between the SOD levels, even though the patient-control groups and the many characteristics of the patients were compared within themselves. We are of the opinion that the results of our work to increase the number of patients in the light of this information and to try them with more specification

Keywords: Lumbar degenerative disc disease, Lumbar disc degeneration, Free oxygen radicals, Superoxide dismutase enzyme

TS025 – Using extracellular vesicles isolated from grapefruit as a wound healing agent

Hüseyin Abdik¹, Oğuz Kaan Kırbaş¹, Pakize Neslihan Taşlı¹, Ezgi Avşar Abdik¹, Yağız Savcı¹,
Fikretin Şahin¹

¹Department of Genetics and Bioengineering, Faculty of Engineering and Architecture, Yeditepe University,
Istanbul, Turkey

Abstract: Today, many studies are performed to explore novel wound healing agent. Extracellular vesicles (EVs) isolated from various plants are used as wound healing agents. Human keratinocyte HACAT cells can be used as model cell line for wound healing studies. In the current study, EVs obtained from grapefruit was selected because it has been previously proven that grapefruit increases cell proliferation of some cells. Firstly, EVs were isolated from the grapefruit and the effects of these vesicles on the cell viability of HACAT, cell migration ability of HACAT and expression of related genes were investigated. For cell viability, EVs isolated from grapefruit were applied for 72 hours at concentrations of 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and at the end of 72 hours, cell viability was increased in a dose-dependent manner except for the lowest dose. According to the cell viability experiments; the cell migration assay was performed with 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (low dose) and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (high dose). At the end of this assay, the cell migration ability of HACAT was increased in a dose-dependent manner. Then, the cells were collected from culture and total RNA was isolated for real time polymerase chain reaction. In gene expression analysis marker genes including collagen, laminin and fibronectin were selected. As a results, EVs isolated from grapefruit significantly increased in laminin and fibronectin gene expressions; it did not affect collagen expression. The results show that EVs isolated from grapefruit are a promising agent for wound healing studies.

Keywords: extracellular vesicles, grapefruit, wound healing

Introduction: Today, many studies have been performed to explore novel wound healing agent. Extracellular vesicles (EVs) play a crucial role in immune response, cancer development, tissue homeostasis, inflammation, and angiogenesis due to their function as major mediators of cell-to-cell communication^{1,2}. EVs isolated from various sources are used as wound healing agents^{3,4}. Cell proliferation, migration and angiogenesis capacities are very crucial for complete wound healing procedure⁵. Moreover extracellular elements including Collagen 1, Fibronectin and Laminin are also important for healing process⁶. Human keratinocyte HACAT cells can be used as model cell line in various wound healing studies. In the current study, EVs obtained from grapefruit was selected because it has been previously proven that grapefruit increases cell proliferation of several cells.

Methods: Firstly, for isolation EVs, grapefruit extract was centrifuged and supernatant was collected. The solution was filtered with 0.22 μm filter and washed with peg/dex solution three times. The concentration of extracellular vesicles was measured by BCA. The effects of these vesicles on the cell viability of HACAT was measured with MTS assay. Scratch assay was done for evaluation of migration capacity of HACAT with administration of 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ grapefruit EVs. Then, the cells were collected from culture and total RNA isolation was performed. cDNA was synthesized using cDNA synthesis kit and qPCR was done with SYBR Green master mix. As extracellular matrix elements, Collagen 1, Fibronectin and Laminin were used in qPCR. All data were normalized to GAPDH.

Results: For cell viability, EVs isolated from grapefruit were applied for 72 hours at concentrations of 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$, and cell viability was increased in 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$ administrations for 24 and 48h. At the end of the 72h, cell viability of HACAT cells significantly increased in 5, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$ administrations (Figure 1).

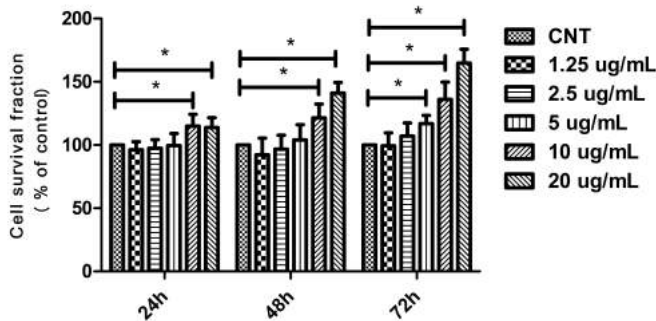


Figure 1 The effects of various concentrations of EVs isolated from grapefruit on cell viability of HACAT at 24, 48 and 72h.

According to the cell viability experiments; the cell migration assay was performed with 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (low dose) and 20 $\mu\text{g/mL}$ (high dose). At the end of this assay, the cell migration ability of HACAT was increased in a dose-dependent manner. While closure area rates were %60 in low dose and %80 in high dose, closure area rate was %40 in control group (Figure 2)

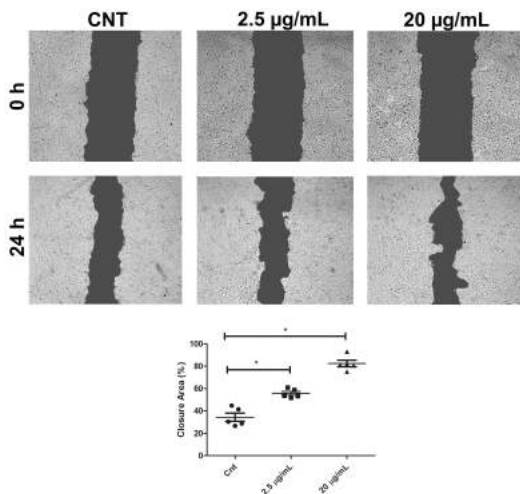


Figure 2 Scratch assay of HACAT after 24h EVs isolated from grapefruit treatment and closure rates of indicated experimental groups.

Then, the cells were collected from culture and total RNA was isolated for qPCR. For gene expression analysis, marker genes including Collagen 1, Laminin and Fibronectin were selected. As a results, EVs isolated from grapefruit significantly increased laminin and fibronectin gene expressions; it did not affect collagen expression compared to control group (Figure 3).

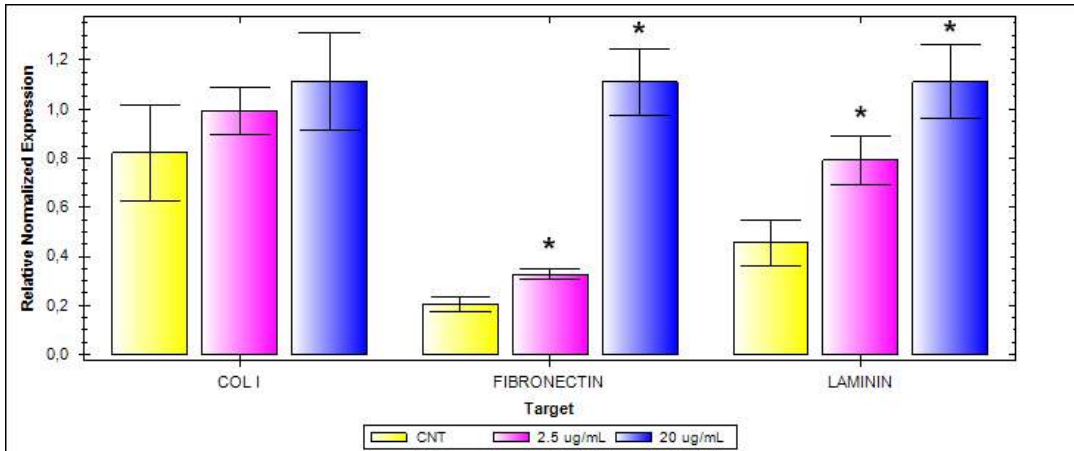


Figure 3 The effects of EVs isolated from grapefruit treatment on migration related gene expression levels in HACAT

Discussion: According to many studies, cell proliferation and cell migration are important for wound healing process⁵. Our data shown that EVs isolated from grapefruit increased proliferation of HACAT. Migration ability was tested with scratch assay which is model experiment. As result, migration capacity of HACAT was significantly increased in a dose dependent manner. Besides, extracellular elements including Collagen 1, fibronectin and Laminin expressions were evaluated. Because, these elements provide cell-to-cell communication and interact with growth factors during wound healing⁷. Administration of EVs isolated from grapefruit increased fibronectin and laminin expressions of HACAT. The results indicated that EVs isolated from grapefruit are a promising agent for wound healing studies.

References

1. Konala VBR, Mamidi MK, Bhonde R, Das AK, Pochampally R, Pal R. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: a new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy* 2016; 18 (1):13-24.
2. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; 200 (4):373-383.
3. Rani S, Ritter T. The Exosome-A Naturally Secreted Nanoparticle and its Application to Wound Healing. *Advanced materials* 2016; 28 (27):5542-5552.
4. Rani S, Ryan AE, Griffin MD, Ritter T. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications. *Molecular Therapy* 2015; 23 (5):812-823.
5. Hattori N, Mochizuki S, Kishi K, Nakajima T, Takaishi H, D'Armiento J, et al. MMP-13 plays a role in keratinocyte migration, angiogenesis, and contraction in mouse skin wound healing. *The American journal of pathology* 2009; 175 (2):533-546.
6. Abdik H, Abdik EA, Demirci S, Doğan A, Turan D, Şahin F. The effects of bisphosphonates on osteonecrosis of jaw bone: a stem cell perspective. *Molecular biology reports* 2018:1-14.
7. Agren MS, Werthen M. The extracellular matrix in wound healing: a closer look at therapeutics for chronic wounds. *The international journal of lower extremity wounds* 2007; 6 (2):82-97.

TS026 – The Effect of Exosomes Isolated from Human Foreskin Stem Cells on Wound Healing

Derya Sağraç¹, Safa Aydın¹, Fikrettin Şahin¹

¹Department of Genetics and Bioengineering, Faculty of Engineering and Architecture, Yeditepe University, Istanbul, Turkey

OBJECTIVE: Wound healing is a complex process where the skin and the sub-tissues repair themselves after damage. Various external substances are usually unfamiliar to the body, so they may trigger the immune system. To overcome this issue, exosomes are good candidates for the wound healing process. Due to the fact that they have the same cell surface antigens, exosomes can easily penetrate through the cell without any immune response. Human foreskin stem cells (hFSCs) are isolated from circumcised tissue normally discarded after surgery. Through embryonic development, the layer of hFSCs provides nutrients to the cells. Their potential can promote the wound healing process through proliferation, migration, and angiogenesis. In this study, it was aimed to evaluate the effect of exosomes derived from hFSCs on the wound healing.

MATERIALS & METHODS: Human foreskin stem cells (hFSCs) were used for exosome source while the immortalized human keratinocytes (HaCat) and human umbilical vein endothelial cells (Huvec) were used to mimic the wound healing model *in vitro*. The exosomes were isolated from hFSCs by two-phase fluid systems. To prove the presence of the exosomes, characterization procedure was performed by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) and Flow Cytometry. Effective exosome concentration was determined by MTS assay. The migration capability of cells was assessed with the scratch assay. To evaluate the effect of exosomes in angiogenesis, tube formation assay was done and changes in gene expression were measured by real-time PCR (qPCR).

RESULTS

a. Exosome Isolation & Characterization

Exosomes derived from human foreskin stem cells (EDFFSs) were observed clearly. Size of exosomes was close to 100nm and the exosomes expressed the exosome-specific surface markers such as CD81, CD9, CD63, and HSP70.

b. Cell Proliferation

The results of cell viability assay revealed that different doses of exosomes significantly increased the proliferation rates of HaCat and Huvec *in vitro*.

c. Cell Migration Analysis (Scratch Assay)

The scratch assay was performed to evaluate the inductive effect of exosomes on migration. HaCat and Huvec treated with different concentrations of EDFFS. After treatment of HaCat with 30µg/ml and 50µg/ml of EDFFS, wound closure rates were obtained as 73% and 77% after 18h; and gaps closed completely after 24h, while wound closure rate of the negative control was only 42%. Wound closure rates of Huvec cells were obtained as 82% and 95% after 24h; while the negative control wound closure rate was only 54%.

d. In vitro Angiogenesis Assay (Tube Formation Assay)

The angiogenic ability of Huvec cells was demonstrated with tube formation assay. 30µg exosome treated groups were remarkably significant after 7 hours when compared to the control group.

e. qPCR Analysis

Levels of important genes like vascular endothelial growth factor (*VEGF*), one of the first growth factors expressed during angiogenesis, for Huvec cell line and fibronectin which is expressed during cell proliferation for HaCat cell line were increased in treated groups when compared to the control group.

CONCLUSION: The results indicate that the EDFSCs might be a new potential candidate to accelerate the wound healing process. However, further studies are needed to explore the molecular mechanisms of exosomes during healing progression.

3 kök hücre
ve hücresel tedaviler
kongresi
Joint Meeting With ISSCA

12-14 Nisan 2019
Marmara Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi
Anadolu Hisarı Yerleşkesi
İstanbul

İnsanlar embriyondan geliyor.
Yani embriyo hücrelerinde her organımızın KÖK'ü var.

1960 - Ord. Prof. Dr. Süreyya Tahsin AYGÜN



Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Derneği
www.kokhucreseledavilerderneği.com

Prof. Dr. İbrahim Tuğlu
Bildiri Danışma Kurulu
mituglu@yahoo.com

conplus
M.I.C.E.

isteklerinize artılarımızı ekliyoruz...

ConPlus Kongre Organizasyon
Çubuklu Mah. Mera Çıkılmaz Sok. No:29
Beykoz / İstanbul
Tel: 0216 541 00 54 Fax: 0216 541 01 08
sekretarya@kokhucrekongresi.org