

**AMNİOTİK MEMBRAN KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİ
ÜZERİNE TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN ETKİSİ**

**A. S. M. GOLAM KİBRİA
VETERİNER HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Artay YAĞCI
İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Jale ÖNER**

**Tez No: 2018-001
2018-AFYONKARAHİSAR**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AMNİOTİK MEMBRAN KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİ
ÜZERİNE TROMBOSİTTEN ZENGİN
PLAZMANIN ETKİSİ**

A. S. M. GOLAM KİBRİA

**VETERİNER HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Artay YAĞCI**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Jale ÖNER**

**Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından 17.SAĞ.BİL.09 proje numarası ile desteklenmiştir.**

Tez No: 2018-001

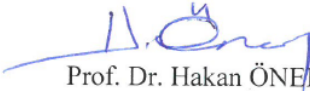
2018 - AFYONKARAHİSAR

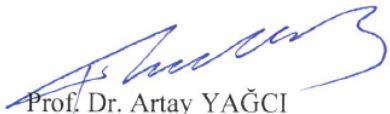
KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki Jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir

Tez Savunma Tarihi: 29/12/2017


Prof. Dr. Berrin ZIK
Uludağ Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Hakan ÖNER
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri


Prof. Dr. Artay YAĞCI
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri


Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri


Prof. Dr. Aysun ÇEVİK DEMİRKAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri

Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Ortak Doktora Programı öğrencisi A.S.M Golam KİBRİA'nın "Amniotik Membran Kaynaklı Kök Hücreleri Üzerine Trombositten Zengin Plazmanın Etkisi" başlıklı tezi.....günü saat.....'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özal ÖZCAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bana bu tez çalışmasını başarılı bir şekilde sonlandırmayı nasip eden yüce Allah'a şükürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve destek olan değerli danışman hocam, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Artay YAĞCI'ya çalışmamdaki yol göstericiliği, desteği ve takdirlerinden dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez yardımcı danışmanım Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Jale ÖNER'e ve Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ'a çalışmamdaki önerileri, yapıcı eleştirileri ve bu çalışmayı yapmam konusunda beni cesaretlendirdikleri için en içten şükranlarımı ve saygılarımı iletmek isterim.

Çalışmadaki analizlerde sağladıkları büyük yardımları için Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden hocalarım Doç. Dr. Metin ERDOĞAN, Doç. Dr. Aziz BÜLBÜL ve Dr. İlkay DOĞAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Dr. Özlem ÖZDEN AKKAYA, Dr. M. Volkan YAPRAKÇI, Öğr. Grv. Dr. Halit Buğra KOCA, Türkan TÜRKMEN, Shah NAWAZ, Tayfun DİKMEN, Elif Ece AKGÜN ve Ender Deniz ASMAZ'a destekleri ve yardımları ile benim için bu süreci kolaylaştırdıklarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. TİGEM, Anadolu Tarım işletmeleri Müdürlüğü yönetimi ve çalışanları ile Afyon Atlı Spor Kulübü'ne örneklerin toplanmasındaki yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca yüksek öğrenimim süresince bana burs sağlayan TÜBİTAK 2215 programına teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bana iyi dileklerini sunan ve bana ilham ve moral veren tüm arkadaşlarıma; annem Umme Habiba'ya ve kardeşlerime bu süreçteki yıllar süren fedakarlıkları ve koşulsuz desteklerinden dolayı tüm kalbimle teşekkür ederim.

A.S.M. Golam KİBRİA

Aralık 2017

Afyonkarahisar

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay.....	iii
Önsöz.....	iv
İçindekiler.....	v
Kısaltmalar.....	ix
Şekiller.....	x
Tablolar.....	xii
.....	
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kök Hücreler.....	1
1.2. Kök Hücre Kaynakları.....	1
1.3. Kök Hücre Tedavisinin Avantaj ve Dezavantajları.....	2
1.3.1. Kök Hücre Tedavisinin Avantajları.....	2
1.3.2. Kök Hücre Tedavisinin Dezavantajları.....	3
1.4. Kök Hücre Tedavisi.....	3
1.5. Atlarda Amniotik Membran Histolojisi.....	4
1.6. Kök Hücre Tedavisinin Büyük Hayvanlarda Kullanımı.....	5
1.6.1. Tendinit.....	5
1.6.2. Kıkırdak Yaralanmaları / Osteoartritis.....	6
1.7. Trombositten Zengin Plazma.....	6
1.8. PRP'nin Tanımlanması.....	7
1.9. PRP'nin Hazırlanışı ve Aktivasyonu.....	8
1.10. Atlarda PRP.....	9
1.11. PRP'nin Uygulanması	9
1.12. PRP'nin Mekanizması.....	10
1.13. PRP ve Kök Hücreler.....	11

	<u>Sayfa</u>
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
2.1. At Amniotik Dokularının Toplanması.....	14
2.2. At Amniotik Membran Kaynaklı Epitel ve Mezenkimal Kökenli Hücrelerin Elde Edilmesi.....	14
2.3. At Amniotik Membran Kaynaklı Kök Hücrelerin Kültürü.....	16
2.4. İkiye Katlanma Süresinin (Doubling Time) Hesaplanması.....	16
2.5. AMH ve AEH’lerde Büyüme Eğrisinin (Growth Curve) Belirlenmesi...	17
2.6. Koloni Oluşturma Potansiyeli.....	17
2.7. AMH ve AEH’lerin Yapışma Profili.....	17
2.8. Atlarda Yüksek Sayıda Trombosit Elde Etme Yönteminin Belirlenmesi.....	18
2.9. PRP’de PDGF ve EGF Konsantrasyonunun Ölçümü.....	18
2.9.1. PDGF ELİSA Protokolü.....	18
2.9.2. EGF ELİSA Protokolü.....	19
2.10. At Kanından PRP Hazırlanması.....	20
2.11. MTT ile Karşılaştırmalı Hücre Çoğalması Analizi.....	22
2.12. Amniotik Membran Kaynaklı Kök Hücrelere Farklı Konsantrasyonlarda PRP Uygulamasının Hücre Proliferasyonuna Etkisi.....	23
2.13. AEC ve AMC’lerin Osteojenik Farklılaşması.....	23
2.13.1. Alizarin Red Boyama Protokü.....	24
2.14. AEH ve AMH’lerin Yağ Dokusuna Farklılaşması.....	24
2.14.1. Oil Red O Boya Solüsyonunun Hazırlanışı.....	25
2.14.2. Oil Red O Boyama Protokolü.....	25
2.15. AEH ve AMH’lerin Kondrojenik Farklılaşması.....	26
2.15.1. Alsian Mavisi Solüsyonunun Hazırlanması.....	27
2.15.2. Alsian Mavisi Boyama Protokolü.....	27
2.16. Nörosfer Eldesi.....	27
2.17. RNA İzolasyonu.....	28
2.18. RNA Saflaştırma.....	29
2.19. cDNA Sentezi.....	29
2.20. Jel Elektroforez.....	30

	<u>Sayfa</u>
2.21. İstatistiksel Analiz.....	30
3. BULGULAR.....	31
3.1. Morfolojik Bulgular.....	31
3.2. İkiye Katlanma Süresi (Doubling Time)	36
3.3. Büyüme Eğrisi (Growth Curve)	37
3.4. Koloni Oluşturan Birim Analizi (Colony Forming Unit Assay)	40
3. 5. Yapışma Profili (Adhesion profile)	42
3.6. Osteojenik Farklılaşma.....	43
3.7. Adipojenik Farklılaşma.....	46
3.8. Kondrojenik Farklılaşma	48
3.9. Nörosfere Farklılaştırma.....	49
3.10. PCR.....	51
3.11. At Kanı için En Fazla Sayıda Trombosit Elde Etme Protokolünün Seçimi	52
3.12. Büyüme Faktörlerinin Ölçümü.....	54
3.12.1. EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) Konsantrasyonu.....	54
3.12.2. PDGF (Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü) Konsantrasyonu.....	55
3.13. MTT ile Karşılaştırmalı Hücre Proliferasyonu.....	56
3.14. Hücre Sayımı ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi.....	59
.....	
4. TARTIŞMA.....	64
4.1. Amniotik Membran Kaynaklı Epitel ve Mezenkimal Kök Hücreler....	64
4.2. İki Katına Çıkma Süresi.....	64
4.3. Büyüme Eğrisi.....	65
4.4. Koloni Oluşturabilen Birim Analizi.....	65
4.5. Yapışma Profili.....	66
4.6. Çok Yönlü farklılaşma.....	67
4.7. Nörosfer Oluşumu.....	67
4.8. PCR Analizi.....	68

	<u>Sayfa</u>
4.9. Atlarda Yüksek Sayıda Trombosit Elde Etme Protokolünün Belirlenmesi.....	68
4.10. MTT ile Karşılaştırmalı Hücre Proliferasyon Analizi.....	69
4.11. Hücre Sayımı ile Karşılaştırmalı Hücre Proliferasyonu.....	71
4.12. Farklı Yöntemlerle Hazırlanan PRP'lerde EGF Değerleri.....	72
4.13. Farklı Yöntemlerle Hazırlanan PRP'lerde PDGF Değerleri.....	72
.....	
5. SONUÇ.....	74
ÖZET.....	77
SUMMARY.....	79
KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ.....	97

KISALTMALAR

AEH	Amniotik epitel hücreleri
AKÜ	Afyon Kocatepe Üniversitesi
AMH	Amniotik mezenkimal hücreler
CFU	Colony Forming Unit Assay
DMEM	Delbuco minimum essential medium
DNA	Deoxyribo nucleic acid
DNase	Deoxyribo nuclease
DT	Doubling Time/ İkiye Katlanma Süresi
EGF	Epidermal growth factor/ Epidermal büyüme faktörü
FGF	Fibroblast growth factor/ Fibroblast büyüme faktörü
H & E	Hematoxylin and eosin
HBSS	Hank's balanced salt solution
HGMEM	High glucose minimum essential medium
IBMX	3-isobutyl -1- methyl xanthyn/ 3-izobütil-1-metilksantin-
IGF	Insulin-like growth factor/ insülin benzeri büyüme faktörü
ITS	Insulin transferrin selinium
KGF	Keratinocyte growth factor/ keratinosit büyüme faktörü
KOB	Koloni oluşturan birim
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerized chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factors/ Trombosit kökenli büyüme faktörü
PRP	Platelet rich plasma /Trombositten zengin plazma
RNA	Riboxynucleic acid
TGF	Transforming growth factors/ Değişirici büyüme faktörü
VEGF	Vascular endothelial growth factor/ Vasküler endotelial büyüme faktörü

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Amniotik membran histolojisi.....	5
Şekil 2.1. Kısrak amniotik membranının elde edilmesi.....	15
Şekil 2.2. Atlarda PRP'nin hazırlanması.....	21
Şekil 3.1. AEH ve AMH'lerin P0 ve P1'de morfolojik yapıları.	32
Şekil 3.2. AEH ve AMH'lerin P2, P3 ve P4'de morfolojik yapıları.....	33
Şekil 3.3. AEH ve AMH'lerin P5, P6 ve P7'de morfolojik yapıları.....	34
Şekil 3.4. AEH ve AMH'lerin P8, P9 ve P10'da morfolojik yapıları.....	35
Şekil 3.5. AEH ve AMH'lerin P1'den P10'a kadar ikiye katlanma süresi grafığı.....	37
Şekil 3.6. AMH'lerin P3, P5 ve P7'de büyüme eğrisi.	38
Şekil 3.7. AEH'lerin P3, P5 ve P7'de büyüme eğrisi.	39
Şekil 3.8. P3'te AEH ve AMH'lerin kolonileri.....	41
Şekil 3.9. P1, P3 ve P5'te AEH ve AMH'lerin koloni oluşturan birim grafığı.....	41
Şekil 3.10. P1, P3 ve P5'te AEH ve AMH'lerin yapışma oranı grafığı.....	43
Şekil 3.11. AEH'lerde P3, P5 ve P7'de 21. günde osteojenik farklılaşma.....	44
Şekil 3.12. AMH'lerde P3, P5 ve P7'de 21. günde osteojenik farklılaşma.....	45
Şekil 3.13. P3, P5 ve P7'de AEH'lerde adipojenik farklılaşma.....	46
Şekil 3.14. P3, P5 ve P7'de AEH'lerde adipojenik farklılaşma.....	47
Şekil 3.15. AEH ve AMH'lerde kondrojenik farklılaşma.....	48
Şekil 3.16. AEH ve AMH'lerde 3. pasajda oluşan nörosferler.....	49
Şekil 3.17. AEH ve AMH'lerde 7. pasajda oluşan nörosferler.....	50
Şekil 3.18. AEH ve AMH'lerin PCR analizi.....	51
Şekil 3.19. 4 farklı protokole göre elde edilen trombosit miktarları	53
Şekil 3.20. PRP gruplarında EGF konsantrasyonları.....	55

	<u>Sayfa</u>
Şekil:3.21. PRP gruplarında PDGF konsantrasyonları.....	56
Şekil 3.22. Farklı konsantrasyonlardaki PRP'nin AEH'lerin proliferasyonu üzerine etkileri.	57
Şekil 3.23. Farklı konsantrasyonlardaki PRP'nin AMH'lerin proliferasyonu üzerine etkileri..	59
Şekil 3.24. AMH'lerde farklı konsantrasyonlardaki PRP'nin canlı hücrelerin proliferasyonu üzerine etkisi.....	60
Şekil 3.25. AEH'lerde farklı konsantrasyonlardaki PRP'nin canlı hücrelerin proliferasyonu üzerine etkisi.....	62
Şekil 3.26. PRP-4 grubunda, farklı konsantrasyonların AMH proliferasyonuna etkisi.....	63
Şekil 3.27. PRP-4 grubunda, farklı konsantrasyonların AEH proliferasyonu üzerine etkisi.....	63

TABLOLAR

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. MTT'de kullanılan PRP grupları.....	22
Tablo 2.2. Proliferasyonu belirlemek amacıyla canlı hücre çoğalmasında kullanılan PRP grupları.....	23
Tablo 3.1. AEH ve AMH'lerin ikiye katlanma süresi.....	36
Tablo 3.2. AMH'lerin P3, P5 ve P7'de büyüme eğrisi.....	38
Table 3.3. AEH'lerin P3, P5 ve P7'de büyüme eğrisi.....	39
Table 3.3. P1, P3 ve P5'te AEH ve AMH'lerde koloni oluşturan birim (KOB) analizi.....	40
Tablo 3.4. P1, P3 ve P5'te AEH ve AMH'lerin yapışma oranı.....	42
Tablo 3.5. Farklı protokoller kullanılarak elde edilen trombosit sayısı.....	52
Tablo 3.6. Kan ve PRP'de eritrosit, lökosit ve trombosit miktarları.....	53
Tablo 3.8. PRP gruplarında EGF konsantrasyonu.....	54
Tablo 3.9. PRP gruplarında PDGF konsantrasyonu.....	55
Table 3.10. Farklı konsantrasyonlardaki PRP'nin AEH'ler üzerine etkileri. MTT ile proliferasyon ölçümü.....	57
Table 3.11. Farklı konsantrasyonlardaki PRP'nin AMH'ler üzerine etkileri. MTT ile proliferasyon ölçümü.....	58
Table 3.12. AMH'lerde farklı konsantrasyonlardaki PRP'nin hücre proliferasyonu üzerine etkisi.....	60
Table 3.13. AEH'lerde farklı konsantrasyonlardaki PRP'nin hücre proliferasyonu üzerine etkisi.....	61

1. GİRİŞ

1.1. Kök Hücreler

Kök hücreler, kendilerine özgü yenilenme ve yeni kök hücre üretiminde sınırsız mitoz bölünme yeteneğine sahip olup farklı vücut dokularını oluşturmak üzere kontrollü ortamlarda çok yönlü farklılaşma karakterine sahip olan hücrelerdir. Kök hücrelerin farklılaşma aşamaları gen ekspresyon analizi ile gösterilmektedir. Halen gelişmekte olan bir bilim dalı olması nedeniyle kök hücrelerin tanımlanmasında kullanılan belirteçler bu hücreleri değerlendirme kriterleri için henüz tam olarak yeterli değildir. Hücrelerin elde edildiği türler, kök hücre popülasyonları arasındaki benzerlikler ve farklılaşma safhalarındaki farklılıklar bu durumu daha karmaşık hale getirmektedir (Hodgkiss-Geere, 2012).

1.2. Kök Hücre Kaynakları

Zigottan veya blastomerden elde edilen kök hücreler totipotent olarak kabul edilmekte ve her üç germ tabakasına da farklılaşma kabiliyetleriyle bir birey oluşturabilme kapasitesine sahiptirler. Embriyonun iç hücre kütlesi de her üç germ tabakasına farklılaşabilmekte, fakat plasentaya farklılaşmamaktadır. Bu hücrelerde pluripotent hücreler olarak sınıflandırılmaktadır (Dattena ve ark., 2009; Gade ve ark., 2012). Embriyonik kök hücreler ilk olarak fareden elde edilmiştir. Daha sonrasında hamster, tavşan, sıçan, maymun, tavuk, insan, köpek, kedi, at, domuz, inek, koyun, keçi ve mandadan embriyonik kök hücre elde edilmiştir. Embriyonik kök hücreler insanlarda genellikle beş ila yedi günlük embriyolardan elde edilmektedir. Embriyonik kök hücrelerin izolasyonu embriyonun ölümü ile sonuçlanmakta olduğundan bu yöntemin kullanımı etik değildir. Bunların yanı sıra fötustan da kök hücre eldesi yapılabilmekte ve bu işlem için abort edilen fötuslar kullanılabilir. (Friedenstein ve ark., 1970; Gade ve ark., 2012). Yetişkin kök hücreler ise elde edildikleri kaynağa göre mezenkimal kök hücreler, hematopoetik kök hücreler, nöral kök hücreler, deri kök hücreleri, retinal kök hücreler gibi farklı

tiplerdedir. Mezenkimal kök hücreler genellikle kemik iliği, yağ doku, göbek kordonu kanı (UCB), amniotik sıvı, plasenta, diş pulpası, tendon, sinovial membran ve iskelet kası gibi dokulardan elde edilmektedir (Quimby ve Dow, 2015; Toghraie ve ark., 2011). Multipotent olarak sınıflandırılan bu hücreler fibroblastlar, kas, kemik, tendon, ligament ve yağ doku gibi hücre ve dokulara farklılaşabilme potansiyeline sahiptir. Fare kemik iliğinden mezenkimal kök hücreler ilk olarak Friedenstein ve arkadaşları (1970) tarafından koloni birimleri oluşturan fibroblastlar olarak izole edilmiş ve daha sonrasında Caplan (1971) tarafından bu terim literatüre eklenmiştir. İnsan, at, sıçan, fare, köpek, koyun, sığır gibi birçok farklı türden mezenkimal kök hücre izolasyonu yapılmıştır (Eslaminejad ve Fagihi, 2011; Gade ve ark., 2012). Mezenkimal kök hücreler, rejeneratif tıpta hücre sel tedavi uygulamaları için oldukça kullanışlıdır. Birçok farklı dokudan mezenkimal kök hücre izolasyonu yapılmakla birlikte, çoğunlukla kemik iliği ve yağ dokudan elde edilen hücreler kullanılmaktadır. Kök hücreler allojenik, otolog veya zenojenik olarak insan ve hayvanlara uygulanabilmektedir.

1.3. Kök Hücre Tedavisinin Avantaj ve Dezavantajları

1.3.1. Kök Hücre Tedavisinin Avantajları

Embriyonik kök hücreler, bütün hücre tiplerine farklılaşabilmekte ve bu hücrelerin sonsuz mitoz kapasiteleri bulunmaktadır. Bu mitoz kapasiteleri ile embriyonik kök hücreler sınırsız hücre kaynağı olabilme potansiyelindedir. Kök hücre izole edilecek dokular in vitro fertilizasyon kliniklerinden elde edilebilmektedir (Brederlau ve ark., 2006).

Yetişkin kök hücreler de embriyonik kök hücreler kadar olmasa da çok sayıda dokuya farklılaşabilmektedir. Ayrıca otolog kullanıma imkan vermesi dolayısıyla immunojeniteleri oldukça düşük olan bu hücreler birçok dokudan kolayca elde edilebilmektedir. Yetişkin kök hücrelerde tümör oluşma riski son derece düşüktür. Bu hücreler genelde çok az invazif yöntemlerle donörden toplanabilmektedir (Lin ve ark., 2012).

1.3.2. Kök Hücre Tedavisinin Dezavantajları

Kök hücre tedavisi halen gelişme sürecinde olup başarılı sonuçlar için henüz yeterli güveni kazanamamıştır. İnsanlar, kök hücre tedavileri gibi bir seçeneği kabul etmek için henüz yeterli bilince sahip değildir. Hücresel tedavi, son derece gelişmiş araç gereçleri ve büyük bir harcama isteyen en son teknolojiyi gerektirmektedir (Frisbie ve Smith, 2010).

Embriyonik kök hücrelerin izolasyonu, hücrelerin elde edildiği embriyoyu yok etmek anlamına gelmektedir. Bu nedenle etik olarak uygun görülmemektedir. Bununla birlikte bu hücrelerin transplantasyonu sonrasında immunolojik reaksiyonların gözlenmesi olasılığı yüksektir. Embriyonik kök hücrelerin uniform olarak tek bir hedef dokuya farklılaştırılabilmesi de yüksek farklılaşma potansiyelleri nedeniyle daha zordur. Ayrıca embriyonik kök hücreler tümör oluşumuna sebep olabilmektedir (Brederlau ve ark., 2006).

Yetişkin kök hücreler, embriyonik kök hücrelere nazaran daha düşük bir farklılaşma kapasitesine sahiptir ve daha az çoğalıp, daha kısa ömürlü olmaktadır. Bunun yanı sıra bazı durumlarda gerekli sayıda hücreyi elde etmek mümkün olamamaktadır (Lin ve ark., 2012).

1.4. Kök Hücre Tedavisi

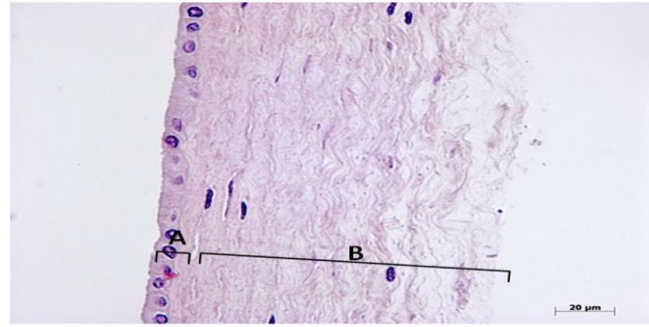
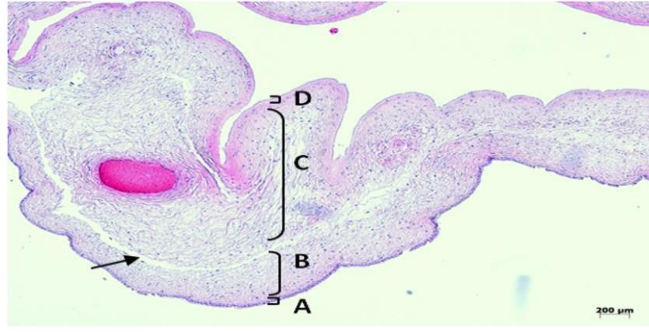
Kök hücre tedavisi, bir hastalığın tedavisinde veya önlenmesinde herhangi bir biçimde kök hücrelerin uygulanmasıdır. Bu tedavi yöntemi hem insan, hem de veteriner hekimlik alanlarında büyük katkı sağlamaktadır. Kök hücre uygulamaları atlar, kediler ve köpeklerde birçok araştırmada kullanılmış olmakla beraber, bu alandaki çalışmaların hala geliştirilmesi gerekmektedir. Hayvanlarda özellikle myokard infarktüsü, osteoartritis, tendinitis, osteokondrozis, kas distrofilileri, inme

gibi birçok hastalıkta rejeneratif tedavinin popülarlığı giderek artmaktadır (Gade ve ark., 2012).

Kök hücreler trasnplante edildiklerinde, doku yenilenmesi direkt ve indirekt olmak üzere iki muhtemel mekanizma ile gerçekleşmektedir. Dokuya özel hücrelere farklılaşmak suretiyle direkt olarak; yangıyı azaltan, hücre ölümünü durduran ve dokunun rejenerasyonu olmasını sağlayan proteinleri sentezlemek suretiyle de indirekt olarak bu etkiler ortaya çıkmaktadır (Yagi ve ark., 2010). Veteriner hekimlikte kök hücrelerin klinik uygulaması, hücrelerin kökeni, izolasyon teknikleri, karakterizasyon, çoğaltma, uygulama ve dozaj konularında standardizasyonun henüz yapılamamış olması nedeniyle halen araştırma aşamasındadır (Lopez ve Jarazo, 2015).

1.5. Atlarda Amniotik Membran Histolojisi

Amniotik membran kalın bir bazal membrana sahip epitel katman ve altındaki bağ dokudan oluşmaktadır. Bu membran amniyon kesesinin duvarını oluşturur. Kısıraklar diffuz tip epiteliokorial plasentaya sahiptir (Banks, 1993) ve amniotik membran epiteli, tek katlı prizmatik epiteldir. Bu epitel katman avasküler bir bağ dokusu tarafından desteklenmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Amniotik membran histolojisi. A: Amniotik epitel katman; B: Amniotik mezenkimal katman; C: Allantoik mezenkimal katman; D: Allantoik epitel katman. Ok: Amniyon ve allantois arası sınır bölge. (H & E) (Lange-Consiglio ve ark., 2012).

1.6. Kök Hücre Tedavisinin Büyük Hayvanlarda Kullanımı

1.6.1. Tendinit

Vücuttaki diğer dokulardan farklı olarak tendon ve ligamentlerin iyileşme süreci zordur ve özel tedavi seçenekleri gerekmektedir. Mezenkimal kök hücreler 2010'da Crovace ve arkadaşları tarafından atlarda tendinit tedavisinde başarı ile uygulanmıştır. Atlarda deneysel olarak fleksör süperfisiyal tendonda oluşturulan tendinit vakalarında mezenkimal kök hücreler ve IGF'nin birlikte kullanımı ile iyileşmede belirgin bir gelişme görülmüştür. Mezenkimal kök hücre uygulamasının doku organizasyonunda, kompozisyonunda ve mekanik özelliklerini geri kazanmasında iyi sonuçlar sağladığı bildirilmiştir (Smith ve ark., 2003). Digital süperfisiyal fleksör tendon yaralanmaları sonrasında tedavi edilen hayvanların yaklaşık % 90 oranında atletik fonksiyonlarını tamamen geri kazandıkları ve

herhangi bir nüks olayı olmadığı gözlenmiştir (Pacini ve ark., 2007). Ayrıca yağ dokudan elde edilen stromal vasküler fraksiyon tedavisinin, atlarda tendinitte belirgin bir iyileşme sağladığı bildirilmiştir (Nixon ve ark., 2008). Yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre tedavisi de atlarda deneysel olarak oluşturulan tendinit modellerinde iyileşmeyi arttırmıştır (de Mattos Carvalho ve ark., 2011). Bunların dışında kök hücrelerin klinik uygulamaları ile atlarda tendinopatiler ve ortopedik hasarlarda elde edilmiş başarılı sonuçlar da bulunmaktadır (Frisbie ve Smith, 2010; Koch ve ark., 2009).

1.6.2. Kıkırdak Yaralanmaları / Osteoartrit

Lateral trohlear çıkıntıda 15 mm çapında eklem kıkırdağı defekti olan 12 ata, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile tedavi uygulandığında, otuz gün sonra yapılan muayenede hastaların durumlarının iyiye gittiği gözlenmiştir (Wilke ve ark., 2007). Dahası prelinik araştırmalar insanlarda kök hücre tedavisinin menisküs ve kıkırdak yenilenmesinde tatmin edici sonuçlar alındığını göstermiştir (Najar ve ark., 2010; Yagi ve ark., 2010). Kemik iliği konsantresi de atlarda kıkırdak iyileşmesinde kullanılmıştır (Fortier ve ark., 2010). Tavşan, fare, sıçan gibi küçük hayvanlarda mezenkimal kök hücrelerin otolog kullanımı ile deneysel olarak oluşturulan kıkırdak defektlerinde rejenerasyonun daha iyi geliştiği gözlenmiştir (Chu ve ark., 2010). Hidaka ve arkadaşları (2003) da atlarda oluşturulan kıkırdak defektlerinde hyalin benzeri doku iyileşmesinin hızlandığını belirtmiştir.

1.7. Trombositten Zengin Plazma (PRP)

Trombositten zengin plazma (PRP) ilk olarak 1914'te Dimond ve arkadaşları tarafından bulundu. 1974'e kadar trombositlerin sadece kan ve kan dolaşımı ile ilgili olduğu düşünülüyordu. 1974'te Ross ve arkadaşları düz kas hücre kültürü medyumuna trombosit ve kalsiyum verilmesiyle mitoz bölünmesinin ve hücrel

proliferasyonun arttığını göstermişlerdir. Bu araştırma trombositlerin sadece hemopoetik sistemde rol oynadığı fikrini yıkan devrimsel bir buluş olmuştur ve bilimsel alanda bu konu büyük bir ilgi çekmiştir. Takip eden dönemde yapılan araştırmalarda büyüme faktörlerinin keşifleri gerçekleşmiş ve sırasıyla, PDGF, TGF- β , IGF-1, VEGF büyüme faktörlerinin varlığı gösterilmiştir (Witte ve ark., 1978; Assoian ve ark., 1983; Karey ve Sirbasku, 1989; Banks ve ark., 1998). 1987'de PRP'nin ilk otolog kullanımı yapılmış ve uygulamanın gerçekleştirildiği kalp operasyonu sonrasında herhangi bir post operatif komplikasyon bildirilmemiştir (Ferrari ve ark., 1987). Zamanla birlikte PRP uygulamaları ameliyatlarda ve topikal uygulamalarda düşük maliyeti, kolay kullanımı ve içerdiği büyüme faktörlerinin etkileri sayesinde sıkça kullanılan popüler bir tıbbi ürün haline gelmiştir (Elder ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2005). Günümüzde PRP, düşük maliyeti, bol miktarlarda elde edilebiliyor olması, immun red reaksiyonun düşük olması, uzun süre depolanabilme ve geniş uygulama yelpazesi gibi özellikleri ile tedavilerde tercih edilmektedir (Rodriguez ve ark., 2014).

1.8. PRP'nin Tanımlanması

Trombositten zengin plazma, az miktardaki plazma içerisinde, granüllerinde bol miktarda büyüme faktörleri içeren trombositlerin toplanmasıyla elde edilen, anti enflamatuar, analjezik ve anabolik özelliklere sahip bir üründür. Trombosit konsantrasyonu, lökosit sayıları, büyüme faktörü miktarları gibi parametrelerdeki sayısal değişiklikler ve hazırlama metodları arasındaki farklılıklar sebebiyle ne beşeri hekimlikte ne de veteriner hekimlikte PRP için üzerinde uzlaşmış bir yöntem ve tanımlama bulunmamaktadır. PRP'de trombosit sayısı ile birlikte, lökositlerin optimal konsantrasyonu da tartışmalı konular arasındadır (Castillo ve ark., 2011; Dohan Ehrenfest ve ark., 2009; McLellan ve pelvin, 2011). Birçok araştırmada PRP, topikal veya intralezyonel kullanım için uygun bir ürün olarak tanımlanmaktadır (Anitua ve ark., 2004; Argüelles ve ark., 2006; Marx, 2004; Textor, 2011). Beşeri tıpta PRP'nin hazırlanmasında kullanılan yöntemler hakkında daha kapsamlı çalışmalar bulunmaktadır (Yazawa ve ark., 2003). Boswell ve arkadaşları (2003),

insanda PRP için en az $200 \times 10^9/L$ trombosit içeren plazmanın PRP sayılabileceğini öne sürmüşlerdir. Bazı bilim insanları trombosit konsantrasyonunun tedavi amaçlı kullanımda etkili olabilmesi için 300×10^9 trombosit/L ile 1500×10^9 trombosit/L arası konsantrasyonda olması gerektiğini bildirmişlerdir (Anitua ve ark., 2004; Giusti ve ark., 2009; Textor, 2011). Diğer yandan bazı araştırmacılar veteriner hekimlikte de PRP terminolojisini kullansalar da atlarda PRP için güvenilir bir tanımlama hala yapılmamıştır (Jean-Claude Ionita, 2014; Textor, 2011). PRP tam kanın santrifüjlenmesi ile elde edilir. PRP'yi elde etmek kolay ve hızlı bir işlemdir. Santrifüj işleminden sonra elde edilen trombositlerdeki granüllerde bol miktarda bulunan büyüme faktörleri, aktivasyon sonrasında bu granüllerden salgılanırlar. Bu sayede farklı dokuların tedavisinde, hastanın kendi kanı bir büyüme faktörü kaynağı olarak otolog uygulama ile kullanılabilir (Alsousou ve ark., 2009; Borrione ve ark., 2010; Lee ve ark., 2011; Nguyen ve ark., 2011; Soomekh, 2011).

1.9. PRP'nin Hazırlanışı ve Aktivasyonu

PRP hazırlanması ile ilgili ilk detaylı veriler Mehta tarafından 1970'te bildirilmiştir (Mehta, 2010). Sonrasında bilim insanları bu protokolü zamanla süre, hız ve mesafe gibi santrifüj fiziği ve mekanikleri ile geliştirmişlerdir. PRP hazırlanması ile ilgili iki önemli protokol bulunmaktadır. Bunlar tek adımlı ve iki adımlı PRP hazırlama olarak adlandırılmaktadır. Fakat tartışmaların ötesine geçebilen kesin ve somut bir protokol henüz bulunmamaktadır. Aynı zamanda PRP hazırlanışı ile ilgili ticari preparatlar da piyasada satılmaktadır (Gao ve ark., 2009; Grageda, 2004; Griffin ve ark., 2009). Büyüme faktörlerinin granüllerden salgılanması aktivasyona bağlıdır. PRP aktivasyonu ekzojen veya endojen yollarla yapılabilir. Tekrarlayan dondurup çözme tekniği trombositleri parçalayarak endojen aktivasyonu sağlamaktadır. PRP aktivasyonunda diğer yaygın metod ise PRP'ye kalsiyum klorid ve/veya trombin eklenmesidir (Roh ve ark., 2016). PRP aktivasyonunda kalsiyum klorid ve/veya trombin eklenmesi ile yapılan aktivasyonlar arasında bir fark gözlenmediği bildirilmiştir. Trombinin pıhtılaştırıcı etkisi ve istenmeyen

reaksiyonlara sebebiyet verebilmesi nedeni ile tercih edilmemektedir (Textor ve Tablin, 2012).

1.10. Atlarda PRP

Atlarda trombosit konsantrasyonunun belirlenmesinde insan PRP'sine ait parametreler baz alınmıştır. Fakat iki tür arasında normal trombosit konsantrasyonunda ve fizyolojilerinde farklılıklar vardır. 142000/ml trombosit konsantrasyonu ile atlar, memeliler arasında en düşük trombosit konsantrasyonuna sahiptir (Boudreaux ve Ebbe, 1998). Genellikle PRP'de trombosit konsantrasyonu normal kanın 3 ila 5 katı arasında olmaktadır. Bazı çalışmalarda atlarda, PRP'de trombosit konsantrasyonu $310.4 \pm 164.5 \times 10^9$ trombosit/L olarak belirlenmiştir (Hessel ve ark., 2015).

1.11. PRP'nin Uygulanması

Trombosit granüllerinde bulunan ve aktivasyon sonrasında varlığı saptanan en az yedi önemli büyüme faktörü vardır. Bunlar epidermal büyüme faktörü (EGF), değiştirici büyüme faktörü β (TGF- β), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve keratinosit büyüme faktörüdür (KGF). Normal kan plazması ile karşılaştırıldığında PRP yukarıda bahsedilen büyüme faktörlerini oldukça yüksek konsantrasyonlarda içermekte ve rejeneratif tıpta arzulanan terapötik etkileri bu sayede göstermektedir (Borrione ve ark., 2010; Yoshida ve ark., 2013; Yu ve ark., 2011). Mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonu ve farklılaştırılması epidermal büyüme faktörü (EGF) ile uyarılmaktadır. EGF, mezenkimal kök hücrelerle yapılan in vivo deneylerde erken ve geç osteojenik belirteçlerin ekspresyonunu arttırmaktadır (Liu ve ark., 2013). PDGF, TGF, VEGF, IGF, EGF ve FGF'nin tendon iyileşme sürecini hızlandırıcı etkileri vardır (Wang ve Nirmala, 2016).

Veteriner hekimlikte, PRP'nin yara iyileşmesi, tendon ve ligament yaralanmaları gibi durumlarda, özellikle atların tedavisinde kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (Bosch ve ark., 2010b, DeRossi ve ark., 2009, Schnabel ve ark., 2007). PRP'nin atlarda tendon yaralanmalarında otolog olarak lokal veya topikal yolla başarılı bir şekilde uygulandığı ve olumlu sonuçlar alındığı çalışmalar bulunmaktadır (Argüelles ve ark., 2008; Bosch ve ark., 2010b, Castelijns ve ark., 2011; Geburek ve Stadler, 2011; Georg ve ark., 2010; Waselau ve ark., 2008).

1.12. PRP'nin Mekanizması

PRP'nin çalışma mekanizması ile ilgili kesin bir bilgi olmaması ile birlikte trombositlerin degranülasyonu ile açığa çıkan yüksek konsantrasyondaki büyüme faktörlerinin dokulardaki iyileşme ve yenilenme sürecinde önemli bir etkisi olduğu düşünülmektedir (Anitua ve ark., 2004; Marx, 2004). Bu faktörler, yara iyileşmesi, doku yenilenmesi ve hücre farklılaşması ile yakından ilişkilidir. Bazı araştırmacılar, bu büyüme faktörlerinin doku iyileşmelerindeki pozitif etkilerini bildirmişlerdir (Eppley ve ark., 2004; Schnabel ve ark., 2007; Sutter ve ark., 2004). Bu büyüme faktörlerinin aynı zamanda potansiyel antienflamatuar, anabolik ve anjiogenik etkilerinin olduğu da bilinmektedir (Fortier ve ark., 2011). Dermal fibroblast kültüründe PRP'nin etkisi ile tip-1 kollajen ve matriks metalloproteinaz-1 ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir (Kim ve ark., 2011). Doku yenilenmesi hücrel mitoz döngüsü ile doğrudan ilişkilidir. Tip-1 kollajen ve matriks metalloproteinaz-1'de G1 fazının pozitif regülatörleridir. G1 fazı regülatörlerindeki artış doku rejenerasyonunu arttırmakta ve böylelikle yara iyileşmesi hızlanmaktadır (Cho ve ark., 2012; van Pham ve ark., 2013).

Trombosit aktivasyonu ile salgılanan büyüme faktörlerinin arasında yakın ilişki mevcuttur (Zimmermann ve ark., 2001). PRP'nin içerisinde intraselüler granüller (çoğunlukla alfa granüller) sahip trombositler, daha az miktarda lökositler ve plazma bulunur. Lökositler de trombositler gibi kendi intraselüler granüllerini taşımaktadırlar ve bu granüllerde bazı mikro ve makro moleküller bulunmaktadır. Plazmada yine

birçok makro ve mikro partikül kaynağıdır. Bu bağlamda trombosit ve lökosit sayısının ve büyüme faktörü konsantrasyonlarının PRP'nin klinik etkisini arttırmada ana parametreler olduğunu bazı bilim insanları öne sürmektedir (DeLong ve ark., 2012). Bu biyomoleküller, aktivasyon esnasında trombosit reseptörlerine kollajen, trombin, trombosit aktive edici faktör, serotonin, kalsiyum, magnezyum, tromboksan A2 ve adenosin difosfat gibi moleküllerin bağlanması sonucu açığa çıkmaktadır (Evans, 2013). Trombositlerin mekanik yıkımı da PRP'yi aktive etme yöntemlerinden biridir ve bu yolla hücresel içerik açığa çıkarılabilmektedir. PRP'nin aktifleştirilmesinden hemen sonra büyüme faktörlerinin salınımı gerçekleşir (El Backly ve ark., 2012).

Ancak, PRP içerisinde bulunan lökositler, doku onarımı sırasında büyüme faktörlerinin aktivitesini etkileyebilmektedir. Lökosit granülleri içerisinde, kendi enflamatuar sitokinlerini içerir ve eğer bu granüller yeterli miktarda enflamatuar sitokin içeriyorsa, PRP içerisindeki bu lökositler bazı transfüzyon sonrası komplikasyonlara neden olabilmektedir (Bordin ve ark., 1994; Davenport ve Kunkel, 1994). Dolayısıyla PRP içerisindeki lökositlerin azaltılması veya uzaklaştırılması enflamatuar sitokinlerin etkilerinden kaçınmak adına önemlidir (Muyllle ve Peetermans, 1994; Palmer ve ark., 1998).

1.13. PRP ve Kök Hücreler

Kök hücrelerin PRP ile kombine uygulanması daha iyi sonuçlar verip vermediği hala araştırılmakta olan bir konudur. PRP'lerin mezenkimal kök hücreler ile in vitro ortamda birlikte kullanımı birkaç makalede bildirilmiştir. Roubelakis ve arkadaşları (2014), in vitro ortamda mezenkimal kök hücreler ile birlikte PRP kullanımının hücre proliferasyonunu arttırdığını fakat osteojenik farklılaşma potansiyelini azalttığını bildirmiştir. Bunun yanı sıra hücre proliferasyonundaki artışa rağmen alkalik fosfataz aktivitesinin PRP tarafından baskılandığı görülmüştür (Mishra ve ark., 2009). Osteojenik farklılaşmadaki bu düşüşün, hücresel proliferasyondaki artıştan dolayı hücre morfolojisinin değişmesi ve kemik üreten pre-osteoblastik

hücrelerin oluşumunun modifiye olması ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (Xie ve ark., 2014). Az sayıda bilim insanı, mezenkimal kök hücrelerin in vitro olarak kemik dokuya farklılaştırılması için %2 ila %5 PRP oranının ideal konsantrasyon olduğunu önermektedir. Yüksek veya az PRP konsantrasyonlarının mezenkimal kök hücrelerin osteojenik potansiyellerini baskıladığı bildirilmiştir (Yamada ve ark., 2004). Fakat klinik uygulamalar için optimum PRP ve mezenkimal kök hücre konsantrasyonu henüz bilinmemektedir. Bu nedenle klinik uygulama yöntemlerine yönelik optimizasyon çalışmaları artarak devam etmektedir. Fakat bazı çalışmalar mezenkimal kök hücrelerin in vitro ortamda 7 gün PRP ile muamele edilmesinden sonra kondrojenik ve osteojenik gen belirteçlerinde artış olduğunu da göstermiştir. Çalışmada Sox 9 gibi kondrojenik biyobelirteçlerin ekspresyonu 10 kattan fazla artarken, erken osteojenik farklılaşma biyobelirteci olan RUNX2 ekspresyonunun 2 kat daha az eksprese olduğu görülmüştür (Gobbi ve Fishmann, 2016). İskelet kası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin in vitro olarak PRP ile muamele edilmesi ile proliferasyonun, adhezyonun ve hücre göçünün belirgin bir şekilde arttığı saptanmıştır (Mifune ve ark., 2013). İn vitro ortamda insan subkondral hücrelerinde PRP, subkondral progenitör hücrelerin vertikal göçünü uyarmakta ve kıkırdak matriksinin birikimini arttırmaktadır (Kruger ve ark., 2012). Bu çalışmalar mezenkimal kök hücreler ile PRP'nin birlikte kullanımının özellikle kıkırdak defektlerinin rejenerasyonunda umud vaad ettiğini göstermektedir.

İnsanlarda PRP'nin hazırlanışı, karakterizasyonu (Yazawa ve ark., 2003), çok amaçlı kullanımı ve insan mezenkimal kök hücreleri üzerine etkileri bakımından birçok çalışma (Boswell ve ark., 2012) olmasına karşın, atlarda PRP'nin kök hücrelerle birlikte kullanılmasına yönelik çalışma sayısı oldukça azdır.

Hipotez: PRP'nin in vitro olarak amniotik membran kaynaklı kök hücrelerin proliferasyonunu arttıracakını varsaymaktayız.

Amaç: Atlarda, tendo ve ligament hasarlarının tedavisinde, PRP ve kök hücrelerin birlikte kullanılabilmesi etkili bir yöntemin geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Hedef 1: Atların amniotik membranından epitel ve mezenkimal kaynaklı kök hücreleri izole etmek ve bu hücrelerin gen düzeyinde kök hücre markırlarının ekspresyonunu göstermek

Gerekçe: Önceki çalışmalar amniotik membran ve amniotik sıvı kaynaklı kök hücrelerin bazı pluripotent markırlar ile birçok multipotent markırları eksprese ettiklerini göstermiştir. Bu nedenle bu kök hücrelerin pluripotent ve multipotent arasında geçiş özelliğinde olduğu ve yetişkin kök hücrelerinden daha üstün özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir.

Hedef 2: Amniotik epitel ve mezenkimal kök hücrelerin çoğalma potansiyellerini, adipojenik, osteojenik, kondrojenik ve nörosferlere farklılaşmalarını göstermek.

Gerekçe: Atların amniotik membranından elde edilen kök hücrelerin yağ hücreleri, kemik hücreleri ve kıkırdak hücreleri gibi çoklu farklılaşma kapasitesine sahip olması bu hücrelerin tendon ve ligament yaralanmalarında tedavi amaçlı kullanım olasılığını güçlendirmektedir.

Hedef 3: Atlarda büyüme faktörlerinden zengin PRP metodunu belirlemek.

Gerekçe: Trombositin etkin bir şekilde aktivasyonu ile salgılanan büyüme faktörlerinin konsantrasyonu arasında yakın bir ilişki mevcuttur. Bu büyüme faktörlerinin, yara iyileşmesi, doku yenilenmesi ve hücre farklılaşması üzerindeki pozitif etkileri bilinmektedir. Uygun PRP hazırlama yöntemiyle optimum konsantrasyonda büyüme faktörü elde etmek, tedaviden beklenen faydayı arttıracaktır.

Hedef 4: Farklı şekillerde aktive edilen PRP gruplarının, amniotik epitel ve amniotik mezenkimal kök hücrelerinde proliferasyon üzerine etkisini göstermek ve uygun PRP konsantrasyonunu optimize etmek.

Gerekçe: Tendon yaralanmalarında spontan iyileşme hızı oldukça düşüktür. Nedbe dokusu oluşumu ve üçüncü tip kollajen miktarındaki artışla birlikte tendonun sağlamlığı azalmakta ve sakatlıklar nüks edebilmektedir. Uygun dozda uygulanan PRP ve kök hücre kombinasyonu daha hızlı bir şekilde proliferasyon sağlayarak tendon ve ligament iyileşmelerinde daha etkili sonuçlar alma potansiyeline sahiptir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. At Amniotik Dokularının Toplanması

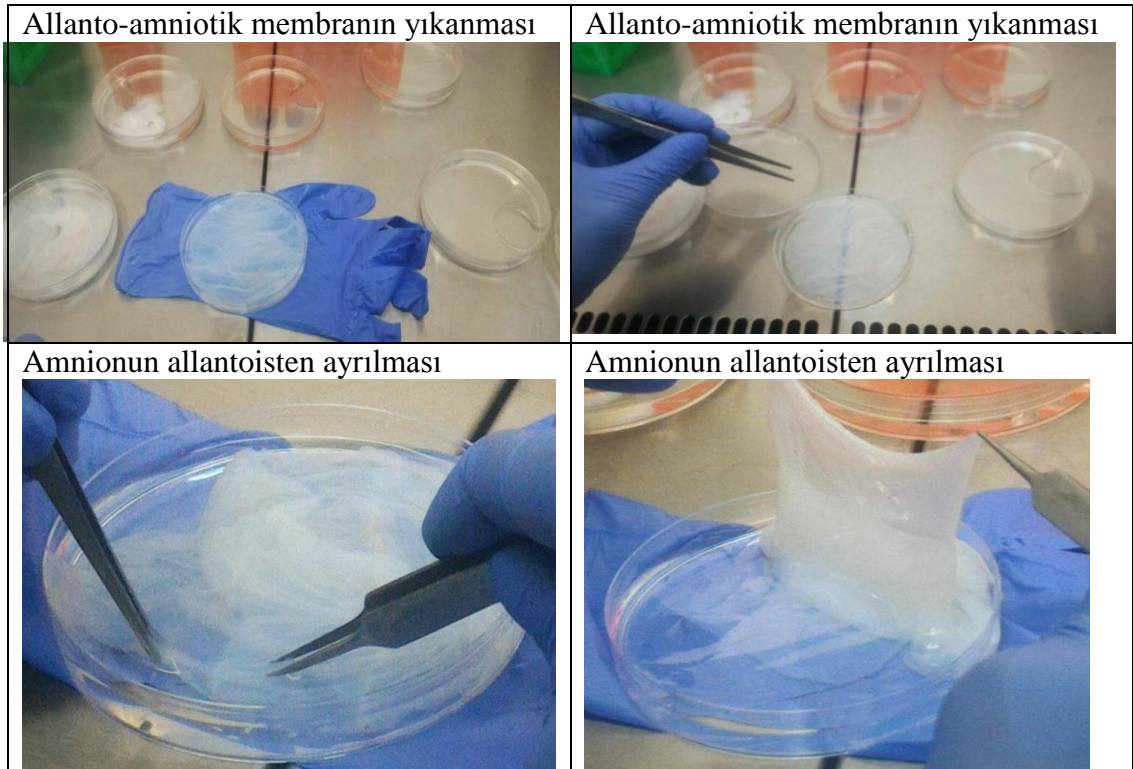
Hayvanlardan doğum sonrası amniotik doku ve sıvı örneklerinin toplanabilmesi için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulundan onay alındı (AKÜHADY-01-16 ve 28.01.2016). Amniotik membranlar, Anadolu Tarım İşletmesi Müdürlüğü Mahmudiye Harası'nda doğum yapan 6 adet kısraktan toplandı.

Gebe kısrakların doğum semptomları yakından takip edilerek izlendi. Doğumdan kısa bir süre önce kısrakın perineum bölgesi %70 alkol ile silinerek dezenfekte edildi. Fötusun çıkışı esnasında tayın kafası gözlenir gözlenmez, tayın baş ve boyun bölgesine denk gelen dorsal ve dorso-lateral bölgesinden allanto-amniotik membran doku parçaları steril makas ve pens yardımı ile alınarak penisilin-streptomisin (%2) ve amfoterisin-B (%0.2) içeren steril PBS içerisine konuldu. Allanto-amniotik membran doku parçaları antibiyotikli PBS solusyonunda 3-4 kez yıkandıktan sonra soğuk zincirde laboratuvara getirildi.

2.2. At Amniotik Membran Kaynaklı Epitel (AEH) ve Mezenkimal Kökenli Kök Hücrelerin (AMH) Elde Edilmesi

Hücrelerin izolasyonu ve kültür işlemleri Consiglio ve arkadaşları (2012) tarafından tarif edilen metodun kısmen modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Tüm hücre kültürü işlemleri sınıf II biyogüvenlik kabini içerisinde yapıldı. Laboratuvara getirilen allanto-amniotik membran doku örnekleri antibiyotikli PBS içeren petri kaplarına konuldu. 3-4 kez petri kapları içerisinde antibiyotikli PBS ile doku örnekleri yıkandı. Amniotik membran mekanik olarak allantoisten ayrıldı (Şekil 2.1). Amniotik membran doku örnekleri 2.4 U/ml konsantrasyonunda dispase-II (Roche, Japonya) içeren PBS ile 37°C'de 9 dakika inkübe edildi. High Glikoz DMEM (HGMEM), %10 FBS, 2mM glutamin, %1 antibiyotik, %0,1 amfoterisin-B içeren solüsyon içerisinde doku örnekleri 5-10 dakika bekletildikten sonra, 250 ng/mL DNase

(Roche, Almanya) 0,93 mg/mL kollajenaz tip IA (Gibco, A.B.D.) içeren enzim solusyonu ile 37°C'de 3 saat inkübe edildi. Doku örnekleri enzimatik olarak parçalandıktan sonra 100 µ'luk filtre süzgeçten (Grenier bio-one, A.B.D.) geçirildi ve 250 g'de 10 dakika santifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler HGMEM (Capricorn, A.B.D.), %15 FBS (Biochrom GmbH, Almanya), 2mM glutamin (Gibco, Birleşik Krallık), %1 pen-strep (Gibco, A.B.D.), 10 ng/mL EGF (Sigma, A.B.D.) içeren kültür medyumu ile 38,5°C'de ve %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edildi. Kültüre edilen bu hücreler amniotik mezenkimal hücreler olarak adlandırılmaktadır. Amniotik epitel kökenli kücreleri elde etmek için kollajenaz ve DNase içeren enzim solusyonu içerisinde parçalanmayan amniotik membran doku parçaları tekrar %0,25 Trypsin-EDTA (Gibco, Birleşik Krallık) ile 37°C'de 2 dakika boyunca inkübe edildi ve enzimatik olarak parçalanan doku parçalarının filtrasyonunu takiben 250 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen hücre peleti aynı kültür medyumu ile flasklara ekildi ve 38,5°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda kültüre edildi .



Şekil 2.1. Kısrak amniotik membranının elde edilmesi

2.3. At Amniotik Membran Kaynaklı Kök Hücrelerin Kültürü

Atların amniotik membranından elde edilen epitel ve mezenkimal kökenli hücreler 38.5°C, %5 CO₂'li ortamda HGMEM (Capricorn, A.B.D.), %15 FBS (Biochrom GmbH, Almanya), %1 L-Glutamin (Gibco, BK), 10ng/mL epidermal büyüme faktörü (EGF, Sigma, A.B.D.), %1 pen-strep (Gibco, BK) ve %0.1 amfoterisin-B (Biochrom GmbH, Almanya) içeren kültür medyumunda kültüre edildiler. Tutunamayan hücreleri uzaklaştırmak için 24 saat sonra kültür medyumunu değiştirildi. Yaklaşık %80-90 konfluense ulaşan hücreler tripsin-EDTA ile toplandı ve aynı kültür medyumunda pasajlandı. Hücreler 10. pasaja kadar çoğaltıldı. İlk pasajdan sonra kültür medyumunda %15 yerine %10 FBS kullanıldı. Kültür medyumunu üç günde bir değiştirildi. Üçüncü, beşinci ve yedinci pasajlarda büyüme eğrisi ve farklılaştırma çalışmaları yapıldı. Canlı ve ölü hücrelerin sayısı trypan mavisi (Sigma, A.B.D.) ile boyanarak belirlendi.

2.4. İkiye Katlanma Süresinin (Doubling Time) Hesaplanması

AMH ve AEH'lerin proliferasyon potansiyelleri ikiye katlanma süreleri hesaplanarak belirlendi. Herbir kuyucuğa santimetrekareye 10,000 hücre konsantrasyonunda olacak şekilde altı kuyucuklu plakaların 3 kuyucuğuna hücreler ekildi. Hücreler %90 konfluense ulaşana kadar her üç günde bir kültür medyumunu değiştirildi. %0,25 tripsin-EDTA (Gibco, Birleşik Krallık) kullanarak hücreler toplandı ve ölü-canlı hücre sayıları belirlendi. Yukarıda belirtilen konsantrasyonda 6 kuyucuklu plakalara hücre ekimi tekrar yapıldı. Bu işleme 10. pasaja kadar devam edildi. Aşağıdaki formüle göre ikiye katlanma süresi hesaplamaları yapıldı.

$$\text{Doubling Time} = \frac{\text{Süre} * \log(2)}{\log(\text{Son Konsantrasyon}) - \log(\text{Başlangıç Konsantrasyonu})}$$

2.5. AMH ve AEH'lerde Büyüme Eğrisinin (Growth Curve) Belirlenmesi

Büyüme eğrisi oluşturmak ve hücre proliferasyonunun davranışsal düzenini gösterebilmek amacıyla, üçüncü, beşinci ve yedinci pasajda santimetrekareye 8,000 hücre yoğunluğunda olacak şekilde 4 kuyucuklu plakalara (Thermo Scientific, Danimarka) amniotik mezenkimal hücreler ve amniotik epitel hücreleri ekildi. Her iki günde bir dört kuyucuktan hücreler toplanarak 14. güne kadar sayıldı. Bu işlem altı farklı attan elde edilen altışar örnekte tekrarlandı.

2.6. Koloni Oluşturma Potansiyeli

Birinci, üçüncü ve beşinci pasajlarda kök hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneklerini değerlendirmek için santimetrekareye sırasıyla 100, 250 ve 500 hücre olacak şekilde altı kuyucuklu plakalara hücreler ekildi ve ekilen hücreler 15 gün süre ile kültür medyumunda içerisinde kültüre edildi. Her üç günde bir kültür medyumunda değiştirildi. 15 günün sonunda plakalardaki hücreler %4 paraformaldehit ile 30 dakika tespit edildi. Distile su ile yıkandıktan sonra 15 dakika %0,02 kristal violet ile boyamaları gerçekleştirildi. Distile su ile 3 defa yıkandıktan sonra stereomikroskop altında incelendi. Değerlendirme aşamasında en az 16-20 hücre içeren koloniler dikkate alınarak koloni sayımı yapıldı (Lange-Consiglio ve ark., 2013).

2.7. AMH ve AEH'lerin Yapışma Profili (Adhezyon Profile)

Atlardan elde edilen AMH ve AEH'lerin yapışma profilleri şu şekilde saptandı; 96 kuyucuklu plakalara 100µl içerisinde 10,000 hücre olacak şekilde hücreler ekildi ve 38,5°C'de karbondioksitli inkübatörde 48 saat inkübe edildi. Kültür medyumunda uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklar 200 µl PBS ile yıkandı ve %1 gluteraldehit tespit solusyonunu ile hücreler 30 dakika tespit edildi. Tespit solusyonu uzaklaştırılıp PBS ile iki kez kuyucuklardaki hücreler yıkandıktan sonra, %0,02 kristal violet ile 15 dakika hücreler boyandı. Boyamadan sonra akarsu ile yıkama yapıldı ve 96

kuyucuklu plaka ters çevrilip hafifçe vurularak plakadan su uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 150 µl %70 etanol eklendi. Plastik koruyucu bant ile plakalar kaplandı ve plaka aliminyum folyo ile sarılarak karanlık ortamda çalkalayıcı üzerinde 1 saat oda ısısında bekletildi. Elisa okuyucuda 595nm’de absorbans değerleri ölçüldü.

2.8. Atlarda Yüksek Sayıda Trombosit Elde Etme Yönteminin Belirlenmesi

Yüksek sayıda trombosit konsantrasyonunu elde edebilmek için farklı yöntemlerle PRP elde edildi. Çift santrifüj metodu ile trombositler toplandı. Çalışmamızda daha önce başka türlerde denenilen dört farklı metodu seçtik. Dokuz adet sağlıklı attan antikoagülanlı kan torbaları ile (Birsell kan torbası CPDA-1, model#BB-01, Türkiye) kan alındı. Alınan kanlarda kan sayım cihazı (Mindray BC-2800Vet) ile tam kan sayımı gerçekleştirildi. Birinci protokolde 1500 rpm’de 15 dakika ilk santrifüjü takiben 3000 rpm’de 15 dakika ikinci santrifüj yapıldı. İkinci protokolde Hessel ve arkadaşlarının (2015) uyguladığı yöntemin modifiye edilmesi ile, ilk santrifüj 300 g’de 10 dakika; ikinci santrifüj ise 3000 g’de 12 dakika yapıldı. Üçüncü protokolde 1000 rpm’de 10 dakika ilk santrifüjü takiben 3000 rpm’de 15 dakika ikinci santrifüj yapıldı. Dördüncü protokolde ise 800 rpm’de ilk santrifüjün ardından 3000 rpm’de 15 dakika ikinci santrifüj yapıldı. Hazırlanan PRP’lerde tekrar tam kan sayımı gerçekleştirildi. Elde edilen trombosit konsantrasyonlarını baz alarak yapılan istatistiksel çalışma ile en iyi trombosit elde etme metodu belirlendi.

2.9. PRP’de PDGF ve EGF Konsantrasyonunun Ölçümü

2.9.1. PDGF ELİSA Protokolü

Çalışma üreticinin (Quantikine PDGF-BB, R&D Systems, ABD # DBB00) talimatlarını takip ederek yapıldı.

- Örnekler Calibrator Dikuent RD6-3 ile oda sıcaklığında 3 katı dilue edildi.

- PDGF-BB deiyonize su ile sulandırıldı. Sonrasında Calibrator Diluent RD6-3 kullanılarak standartlar hazırlandı. Calibrator Diluent sıfır standart olarak belirlendi. (0 pg/mL).
- Bütün kuyucuklara 100 µl Assay Diluent RD1X eklendi. Sonrasında 100 µL standart veya örnek eklendi. Plastik koruyucu ile plaka üzeri kapatıldıktan sonra 2 saat inkubasyona bırakıldı.
- Yıkama solüsyonu ile dört defa yıkama yapıldı. Yıkama solüsyonu 48 ml deiyonize suya 2 ml konsantre yıkama solüsyonu eklenerek hazırlandı.
- Kuyucuklara 200 µl insan PDGF-BB konjugatı eklendi. Plastik koruyucu ile kapatılan ve alüminyum folyo ile sarılan plaka, oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
- Yıkama solüsyonu ile aynı şekilde yıkama tekrarlandı ve kuyucuklara 200 µl substrat solüsyonu (100 µl Substrat solüsyonu A + 100 µl Substrat solüsyonu B) eklendi. Plaka oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.
- Kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendikten sonra 450 nm'de okuma yapıldı.

2.9.2. EGF ELİSA Protokolü

ELİSA testi ile PRP'lerdeki EGF konsantrasyonları belirlendi. Çalışma üreticinin (Bioassay Technology Laboratory# E0060Ho) belirlediği kullanım talimatlarını takip ederek yapıldı.

- Çalışmaya başlamadan yarım saat öncesinde 96 kuyucuklu plaka 4°C'den oda sıcaklığına alındı.
- 2 ml konsantre yıkama solüsyonunu 48 ml deiyonize suya ekleyerek yıkama solüsyonu hazırlandı.
- Standart solüsyonları aşağıdaki şekilde hazırlandı:

Orijinal standart = S6

200 µl standart + 200 µl standart sulandırıcı = S5

200 µl S5 + 200 µl standart sulandırıcı = S4

200 µl S4 + 200 µl standart sulandırıcı = S3

200 µl S3 + 200 µl standart sulandırıcı = S2

200 µl S2 + 200 µl standart sulandırıcı = S1

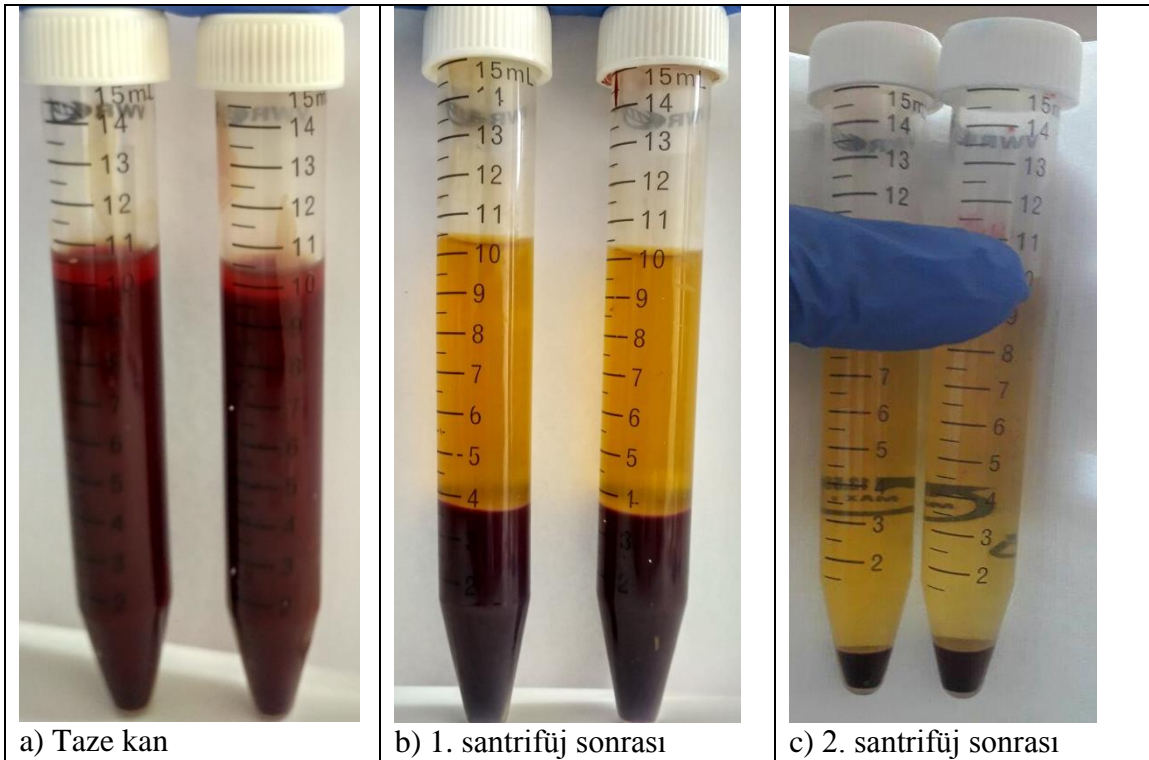
- Standart ve örneklerin nasıl yerleştirileceğini gösteren diyagram önceden çizildi.
- Belirlenen kuyucuklara 50 µl standart solüsyonları eklendi.
- Belirlenen kuyucuklara 40 µl PRP örnekleri eklendi.
- Örnek kuyucuklarına 10 µl Anti-EGF antikoru eklendi.
- Blank haricindeki kuyucuklara 50 µl Streptavidin-HRP eklendi.
- Kuyucuklar dikkatlice pipete edildi ve plastik koruyucu ile plaka kapatıldı.
- 37 °C'de bir saat inkubasyona bırakıldı.
- Plastik koruyucu çıkarılarak bütün kuyucuklar yıkama solüsyonu ile beş defa yıkandı.
- Bütün kuyucuklara 50 µl substrate A solüsyonu eklendi.
- Bütün kuyucuklara 50 µl substrate B solüsyonu eklendi.
- Plaka alüminyum folyo ile kaplanmak suretiyle ışıktan korunarak 37 °C'de 1 saat inkube edildi.
- Kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendi.
- ELİSA okuyucuda 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

2.10. At Kanından PRP Hazırlanması

Sağlıklı atların vena jugularislerinden antikoagülanlı kan torbalarına 300 ml kan alındı. Çalışmamızda tüm PRP işlemleri steril şartlar altında ve sınıf II biyogüvenlik kabininde gerçekleştirildi. Toplanan kandan çift santrifüj yöntemi ile PRP elde edildi. Kan torbalarında toplanan kanlar her birinde 10 ml kan olacak şekilde 15 ml'lik steril falkon tüplere alıkotlandı ve tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında plazma, buffy coat tabakası ile birlikte alınıp başka bir steril 15 ml falkon tüpe konuldu ve 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi (Şekil 2.2.). Santrifüjden sonra üstte kalan 2/3'lük trombosit fakir plazma tabakası (PPP) uzaklaştırıldı. Kalan 1/3'lük trombosit zengin plazma alttaki trombosit, lökosit ve az miktarda eritrosit içeren hücre peleti ile süspanse edildi. Trombosit miktarları tam

otomatik kan sayım cihazında (Mindray BC2800Vet) ölçüldü. Tüm örneklerde son trombosit konsantrasyonu, trombositten fakir plazma kullanılarak $700-725 \times 10^6/\text{mL}$ olacak şekilde ayarlandı.

PRP aktivasyonu, taze kandan hazırlanan PRP'de $100 \mu\text{l}$ %20 CaCl_2 eklenerek gerçekleştirildi (Van Pham ve ark., 2013). CaCl_2 ile aktivasyondan sonra koagülasyonu engellemek için 2,4 U/ml heparin (Nevparin, Türkiye) eklendi. Hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için tüpler (Hemeda ve ark., 2013) 3000g'de 30 dakika santrifüj edildi. Dondurma çözme ile PRP aktivasyonunda ise iki yöntem kullanıldı. 1- Dondurma çözme metodu (Hazırlanan PRP'nin -80°C 'de dondurulması ve çözülmesi, 3 defa tekrarlanır). 2- PRP'nin CaCl_2 ile aktive edildikten sonra dondurma metodu (Taze kandan $100 \mu\text{l}$ %20 CaCl_2 ile aktive edilerek hazırlanan PRP'nin, 1 kere -80°C 'de dondurulması ve kullanılacağı zaman çözülmesi).



Şekil 2.2. Atlarda PRP'nin hazırlanması

2.11. MTT ile Karşılaştırmalı Hücre Çoğalması Analizi

Farklı yöntemlerle hazırlanan PRP'lerin etkinliğini görmek amacıyla 4 grup oluşturuldu. PRP-1 grubu: Taze kandan hazırlanan inaktive PRP grubu; PRP-2 grubu: Taze kandan hazırlanan ve CaCl₂ ile aktive edilen PRP grubu; PRP-3 grubu: CaCl₂ ile aktive aktive edildikten sonra dondurulan PRP grubu; PRP-4 grubu: Dondurma çözündürme yöntemi ile aktive edilen PRP grubu (Tablo 2.1). Herbir grup için %5, %10, %15 ve %20 PRP konsantrasyonları hazırlandı. Amniotik membran kaynaklı hücrelerin proliferasyonu üzerine PRP'nin etkisini değerlendirmek için 96 kuyucuklu plakalara, her kuyucukta 7000 hücre olacak şekilde hücreler ekildi. Bu işlem %5 PRP, %10 PRP, %15 PRP, %20 PRP ve pozitif kontrol olarak %10 FBS içeren kültür medyumları kullanılarak tekrarlandı (Van Pham ve ark., 2013). 38.5°C ve %5 CO₂ ortamında 48 saat inkubasyon sonrasında kuyucuklara 4,5 mg/ml konsantrasyonunda MTT solüsyonu (Biomatik, ABD) eklendi. Aynı ortamda hücreler 4 saat daha inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırıldı ve kuyucuklara 100 µl izopropil alkol eklenerek oda ısısında 4 saat inkubasyona bırakıldı (Karaöz, 2012). 96 kuyucuklu plakanın 570 nm'de ELİSA okuyucuda absorbans değerleri ölçüldü. Hücrelerin çoğalması aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Çoğalma} = \frac{\text{Test OD}}{\text{Kontrol OD}} \times 100$$

Tablo 2.1. MTT'de kullanılan PRP grupları

PRP-1 grubu	Taze kandan hazırlanan inaktive PRP grubu
PRP-2 grubu	Taze kandan hazırlanan ve CaCl ₂ ile aktive edilen PRP grubu
PRP-3 grubu	CaCl ₂ ile aktive aktive edildikten sonra dondurulan PRP grubu
PRP-4 grubu	Dondurma çözündürme yöntemi ile aktive edilen PRP grubu
Kontrol grubu	%10 FBS grubu

2.12. Amniotik Membran Kaynaklı Kök Hücrelere Farklı Konsantrasyonlarda PRP Uygulamasının Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Amniotik membran kaynaklı epitel ve mezenkimal hücreler 24 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 7000 hücre konsantrasyonda olacak şekilde ekildi. HGDMEM kültür medyumu içerisine ilave edilen PRP'lerin (CaCl_2 ile aktive edilip dondurulan ve dondurma çözme yöntemi ile aktive edilmiş) farklı konsantrasyonlarının amniotik membran kökenli hücreler üzerine etkilerini gözlemek amacıyla aşağıdaki şekilde gruplar oluşturuldu (Tablo 2.2.).

Tablo 2.2. Proliferasyonu belirlemek amacıyla canlı hücre çoğalmasında kullanılan PRP grupları

PRP-3 grubu	CaCl_2 ile aktive edilip dondurulan PRP grubu
PRP-4 grubu	Dondurma çözme yöntemi ile aktive edilen PRP grubu
Kontrol grubu	%10 FBS grubu

Hücreler $38,5^\circ\text{C}$ ve %5 CO_2 ortamında kültüre edildi. Kültür medyumu her üç günde bir değiştirildi ve altı gün sonra hücreler sayıldı. Son olarak %10 FBS içeren grup pozitif kontrol alınarak canlı hücre sayısı karşılaştırması yapıldı.

2.13. AEH ve AMH'lerin Osteojenik Farklılaşması

Üçüncü pasaj sonrasında kök hücreler toplanarak 24 kuyucuklu kültür plakalarına her kuyucuğa 29,000 hücre olacak şekilde ekildi ve farklılaştırma medyumu içerisinde kültüre edildi. Farklılaştırma medyumu, α MEM (Lonza, Belçika) içerisine %10 FBS, 0,1 μM deksametazon (Sigma, Belçika), 0,05mg/mL askorbik asit (Ehrenstorfer GmbH, Almanya), 10 mM β -gliserofosfat (Sigma-Aldrich, ABD), %1 penisilin-streptomisin (Gibco, BK), %0,01 amfoterisin-B (Biochrom GmbH, Almanya) olacak şekilde hazırlandı. Kültür medyumu üç gün arayla değiştirildi ve hücreler düzenli olarak inverted mikroskop altında kontrol edildi. Osteojenik farklılaşmayı kontrol amacıyla 21. günlerde hücreler 80 mM alizarin red ile boyandı.

Alizarin red solüsyonunun hazırlanışı: 80 mM alizarin red solüsyonu hazırlamak için aşağıdaki protokol uygulandı:

- 1 gram alizarin red (Merck, Almanya) 50 ml deiyonize distile suda çözdürüldü.
- Manyetik karıştırıcı ile solüsyon iyice karıştırıldı.
- Solüsyonun pH'sı amonyum hidroksit ile düzenlendi (pH 4.2).
- Hazırlanan alizarin red solüsyonu oda ısısında karanlıkta saklandı (maksimum 6 ay).
- Hazırlanan solüsyonun taze kullanımının daha iyi boyama sağladığı görülmüştür.

2.13.1. Alizarin Red Boyama Protokolü

- Kuyucuklardaki medyum çekilerek uzaklaştırıldı.
- Hücreler HBSS (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak yıkandı.
- Hücreler %4 paraformaldehit kullanılarak 12 dakika tespit edildi.
- Paraformaldehit uzaklaştırıldı ve kuyucuklar distile su ile yıkandı.
- Hücreler 35 dakika alizarin red solüsyonu ile boyandı.
- Sonrasında distile su kullanarak boya dikkatlice uzaklaştırıldı ve bu işlem dört defa tekrarlandı.
- Hücreler mikroskop altında incelenerek fotoğrafları çekildi.

2.14. AEH ve AMH'lerin Yağ Dokusuna Farklılaşması

Üçüncü pasaj sonrasında kök hücreler toplanarak 24 kuyucuklu kültür plakalarına her kuyucuğa 29,000 hücre olacak şekilde ekilerek kültür medyumunda 24 saat inkübe edildi. Daha sonra adipojenik indüksiyon medyumunda (AIM) 21. güne kadar kültüre edildi. Adipojenik indüksiyon medyumunu; Low glucose (LG)-DMEM (Sigma-Aldrich, ABD), %10 FBS (Biowest, Güney Amerika Orijinli), %1 penisilin-

streptomisin (Gibco, BK), %0,1 amfoterisin-B (Biochrom GmbH, Almanya), 0,5 mM 3-izobütil-1-metilksantin- IBMX (Sigma, Almanya), 1 μ M deksametazon (Sigma,Belçika), 10 μ g/mL insülin (Sigma-Aldrich, Almanya) ve 100 μ M endomethasin (Cayman Chemical Company, ABD) içerecek şekilde hazırlandı. Adipojenik maintenance medyumunu (AMM) ise; LG-DMEM (Sigma-Aldrich, ABD), %10 FBS (Biowest, Güney Amerika Orijinli), %1 penisilin-streptomisin (Gibco, BK), %0,1 amfoterisin-B (Biochrom GmbH, Almanya), 10 μ g/ml insülin (Sigma-Aldrich, ABD) karışımından meydana gelmektedir. 7. ve 15. günlerde AMM kullanılırken, diğer günlerde AIM kullanıldı. Medyum ikişer gün arayla değiştirilip inverted mikroskop altında hücrelerin durumu kontrol edildi. Farklılaşmayı gözlemek amacıyla hücreler 21. günde 5 mM Oil Red O ile boyandı.

2.14.1. Oil Red O Boya Solüsyonunun Hazırlanışı

Stok Solüsyon: 12 mM stok solüsyon aşağıdaki şekilde hazırlandı:

- 0,64 gram toz Oil Red O (Sigma-Aldrich, ABD), 125 ml izopropil alkol (Merck, Almanya) içerisine eklendi.
- Solüsyon manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözünene kadar en az 2 saat karıştırıldı.
- Kullanımından önce oda sıcaklığında karanlık ortamda bir gece bekletildi.

Çalışma Solüsyonu

- 2 ml stok solüsyonuna 3 ml deiyonize su eklendi.
- Solüsyon filtreden geçirilerek 10 dakika dinlendirildi.
- Hazırlanan solüsyon en iyi sonucu alabilmek için iki saat içerisinde kullanıldı.

2.14.2. Oil Red O Boyama Protokolü

- Kuyucuklardaki medyum uzaklaştırıldı.
- Kuyucuklar PBS ile yıkandı.
- Hücreler %70 etanol ile bir defa yıkandı.

- Hücreler tamponlu nötral formalin ile 20 dakika tespit edildi.
- Tespit solüsyonu uzaklaştırılarak PBS ile bir kez yıkama yapıldı.
- %70 etanol ile bir defa yıkama yapıldı.
- Oil Red O solüsyonu ile hücreler 25 dakika boyandı.
- Boya kuyucuklardan çekildi ve %70 etanol ile yıkama yapıldı.
- Deiyonize su ile iki kez yıkama yapıldı.
- Mikroskop altında boyama kontrol edildi.
- Hematoksilen ile 30 saniye boyandı
- Akarsuda 2-3 dakika yıkama yapıldı.
- Mikroskop altında sonuçlar değerlendirildi ve boyama fotoğraflandı.

2.15. AEH ve AMH'lerin Kondrojenik Farklılaşması

Amniotik membrandan elde edilen kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını yapmak üzere altı kuyucuklu plakalara santimetrekareye 15,000 hücre konsantrasyonunda olacak şekilde hücreler ekildi. Kontrol medyumunu HGDMEM (Capricorn, Almanya), %10 FBS (Biowest, Güney Amerika Orijinli), %1 penisilin-streptomisin (Gibco, BK), %0,1 amfoterisin-B (Biochrom GmbH, Almanya) içerecek şekilde hazırlandı. Farklılaştırma medyumunu ise HGDMEM (Capricorn, Almanya), %5 FBS (Biochrome GmbH, Almanya), 0,1mM deksametazon (Sigma, Belçika), 50 mM askorbik asit (Ehrenstorfer, Almanya), %1 ITS-premix (Corning, ABD), 1 mM sodyum pirüvat (Lonza, Belçika), 0,35 mM proline (Sigma, ABD), 10 ng/mL TGF- β 3 (Peprotech, ABD), %1 NEAA (Lonza, Belçika), %1 penisilin-streptomisin (Gibco, BK), %0,1 amfoterisin-B (Biochrom GmbH, Almanya) olacak şekilde hazırlandı. Hücreler 21 gün süre ile 38,5°C, %5 CO₂ ortamında inkube edildi. Her üç günde bir medyum değiştirildi. Kondrogenezise bağlı oluşan glikozaminoglikan formasyonunu göstermek için hücreler %95 metanol ile 20 dakika tespit edildi. Tespit solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra distile su ile yıkandı. 0,1 M hidroklorik asit içeren %1 alsian mavisi ile 30 dakika boyandı.

2.15.1. Alsian Mavisi Solüsyonunun Hazırlanması

- 1 gram Alsian mavisi tartılarak erlenmayere koyuldu.
- 100 ml 0,1M hidroklorik asit eklendikten sonra erlenmayer alüminyum folyo ile sarıldı.
- Solüsyon manyetik karıştırıcı ile iyice karıştırıldı.
- Solüsyon filtrelendikten sonra oda ısısında karanlık ortamda saklandı.

2.15.2. Alsian Mavisi Boyama Protokolü

- Hücreler %95 metanol ile 20 dakika tespit edildi.
- Tespit solusyonu uzaklaştırıldıktan sonra distile su ile yıkandı
- 0,1 M hidroklorik asit içeren %1 alsian mavisi ile 30 dakika boyandı
- Hücreler tekrar distile su ile yıkandı

2.16. Nörosfer Eldesi

Kök hücrelerden nörosfer eldesi üçüncü ve yedinci pasajlardan sonra yapıldı. Nörosferleri kültüre etmek için %0,01 poy-L-Lizin (Sigma, ABD) ile kaplanan 4 kuyucuklu kültür plakaları kullanıldı. Hücreler her kuyucuğa santimetrekareye 50,000 hücre konsantrasyonunda ekildi. Her birinin 4 adet tekrarı olan 5'er AEH ve AMH örneklerinde deneyler yapıldı. Nörosfer kültüründe medyum olarak DMEM/F-12 (Gibco, BK), %1 penisilin-streptomisin (Gibco, BK), %0,01 amfoterisin-B (Biochrom GmbH, Almanya), %1 insülin-transferin-selenyum (Gibco, ABD), 20 ng/mL EGF (Sigma, ABD), ve 20 ng/mL FGF (R&D System, ABD) kullanıldı. 38.5°C, %5 CO₂ ve %95 nemli ortamda inkübe edildi. Farklı zamanlarda nörosfer şekillenmesi değerlendirildi ve kuyucukların fotoğrafları çekildi.

2.17. RNA İzolasyonu

Toplanılan hücrelerde aşağıdaki şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi:

RNA lizis tamponu: 1 ml Lizis tamponuna 20 µl 14.3 M beta-merkaptoetanol veya 2 M DTT eklendi.

Protein kinaz K solüsyonu: 10 µl proteinkinaz K, 590 µl TE tamponu içerisine eklendi.

Tamponlu yıkama solüsyonu 1: 40 ml Tamponlu yıkama solüsyonu 1'e 10 ml etanol (%96-100) eklendi.

Tamponlu yıkama solüsyonu 2: 23 ml Tamponlu yıkama solüsyonu 2'ye 39 ml etanol (%96-100) eklendi.

Yöntem:

- Toplanan hücreler etiketlenen tüpler içerisinde -80°C'den buz içerisinde getirildi.
- 600 µl lizis tamponu, tüplere eklendi.
- Hücreler 30 saniye homojenize edildi.
- Tüpler, 4°C sıcaklıkta 12000g'de 1 dakika santrifüj edildi (Thermo, IEC MICROMAX RF).
- Süpernatant başka bir tüpe aktarıldı.
- Tüpe 360 µl etanol (%96-100) eklendi; hemen ardından tüp vortekslendi.
- 700 µl hücre lizatı 2 ml'lik filtreli RNA toplama tüpüne aktarıldı.
- Tüp 12000g'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu teknik kalan hücre lizatına da tekrarlandı.
- Filtrat uzaklaştırıldıktan sonra tüpe 700 µl tamponlu yıkama solüsyonu 1 eklendi ve 12000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtrat tekrar uzaklaştırıldıktan sonra 650 µl tamponlu yıkama solüsyonu 2 eklendi. Sonrasında 12000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtrat uzaklaştırıldı ve 250 µl tamponlu yıkama solüsyonu 2 eklenerek tekrar 12000 g'de 2 dakika santrifüj yapıldı.

- Filtrat uzaklaştırıldıktan sonra 16000 g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- Filtre tübü 1,5ml'lik RNA tüpüne transfer edildi.
- Filtre tüpüne 50 µl DNase ve RNase içermeyen su eklendi. Tüp önce 250 g'de 1 dakika, sonrasında 12000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- RNA içeren filtrat solüsyonu elde edildi. RNA konsantrasyonu Qubit® 2.0 Fluorometer using Qubit™ RNA HS assay kit (Invitrogen) ile belirlenerek sonraki çalışmalar için -80°C'de solüsyon muhafaza edildi.

2.18. RNA Saflaştırma

Başarılı bir şekilde cDNA üretmek için önce RNA preparatlarından genomik DNA'nın çıkarılması gereklidir. Bu işlem aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

- RNase free santrifüj tüpüne aşağıdaki içerikler eklendi:

RNA	1 µg
MgCl ₂ 'li 10X reaksiyon bufferı	1 µl
DNase I RNase free	1 µl
DEFG uygulanmış su	10 µl'ye tamamlayacak kadar
Toplam hacim	10 µl

- Bu karışım 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- Her tüpe 1 µl EDTA (50 mM) eklendi ve 65°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- Böylelikle cDNA sentezinde kullanılan saf RNA elde edildi.

2.19. cDNA Sentezi

cDNA sentezi aşağıdaki protokol ile gerçekleştirildi:

- Her tüpe 1 µl Oligo (dt)₁₈ eklendi ve 65°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Aşağıdaki karışım hazırlanarak tüplere eklendi:

5X Reaksiyon buffer	4 µl
Ribolock RNase inhibitör	1 µl

10 mM dNTP karışımı	2 µl
RevertAid M-muLV	1 µl

- İyice pipete edildikten sonra tüpler 42°C’de 1 saat inkübe edildi.
- Sonrasında 5 dakika 70°C’de inkubasyona alındı.
- Hazırlanan cDNA sonraki aşamalar için -80°C’de muhafaza edildi.

2.20. Jel Elektroforez

- Jeli hazırlamak için 1000 mg agaroz tozu (Biomax,EU) 50 ml tank solüsyonu ile karıştırıldı.
- Hazırlanan karışıma 1 µl RedSafe (iNtRON, Güney Kore) eklendi.
- Karışım iyice karıştırıldı ve ocakta ısıtıldı. Sonrasında oda sıcaklığına soğutuldu.
- Elde edilen ürün 30 dakika jel kutusuna konuldu sonrasında buzdolabında muhafaza edildi.
- 96 kuyucuklu plaka kullanarak 8 µl boya ve 3 µl örnek kuyucuklarda karıştırıldı. Sonrasında örnekler jel üzerinde 90 voltta 15 dakika koşuruldu.
- DNA transilluminator (Biovision, Fransa) ile gözlemlendi ve kontrol edildi.
- Bu protokol diğer örnekler ile tekrarlandı.

2.21. İstatistiksel Analiz

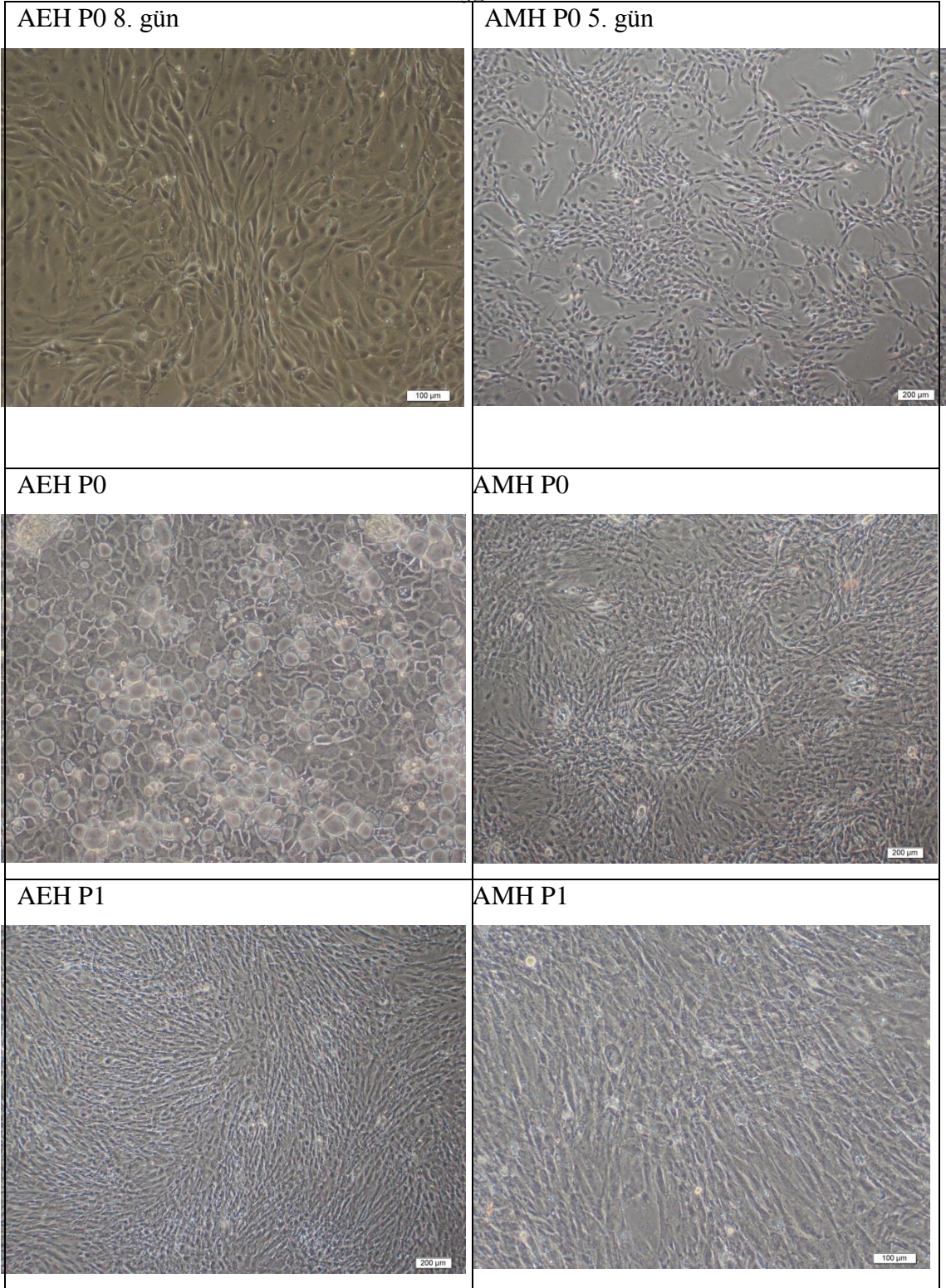
Elde edilen değerler ortalama ve standart hata olarak verildi ($X \pm SE$). Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile belirlendi. Normal dağılım gösterenlerde parametrik test olan student-t test ile ANOVA (general linear model) uygulandı. Farkın kaynağının belirlenmesinde ise Bonferroni veya Duncan testleri kullanıldı. Veriler normal dağılım göstermiyorsa ortanca (Q1-Q3) değerleri kullanılarak nonparametrik test olan Friedman’s 2-way ANOVA uygulandı. Bütün testlerde $p < 0.05$, istatistiki olarak önemli görüldü. Çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 22.0 (IBM, USA) programı kullanılarak yapıldı.

3. BULGULAR

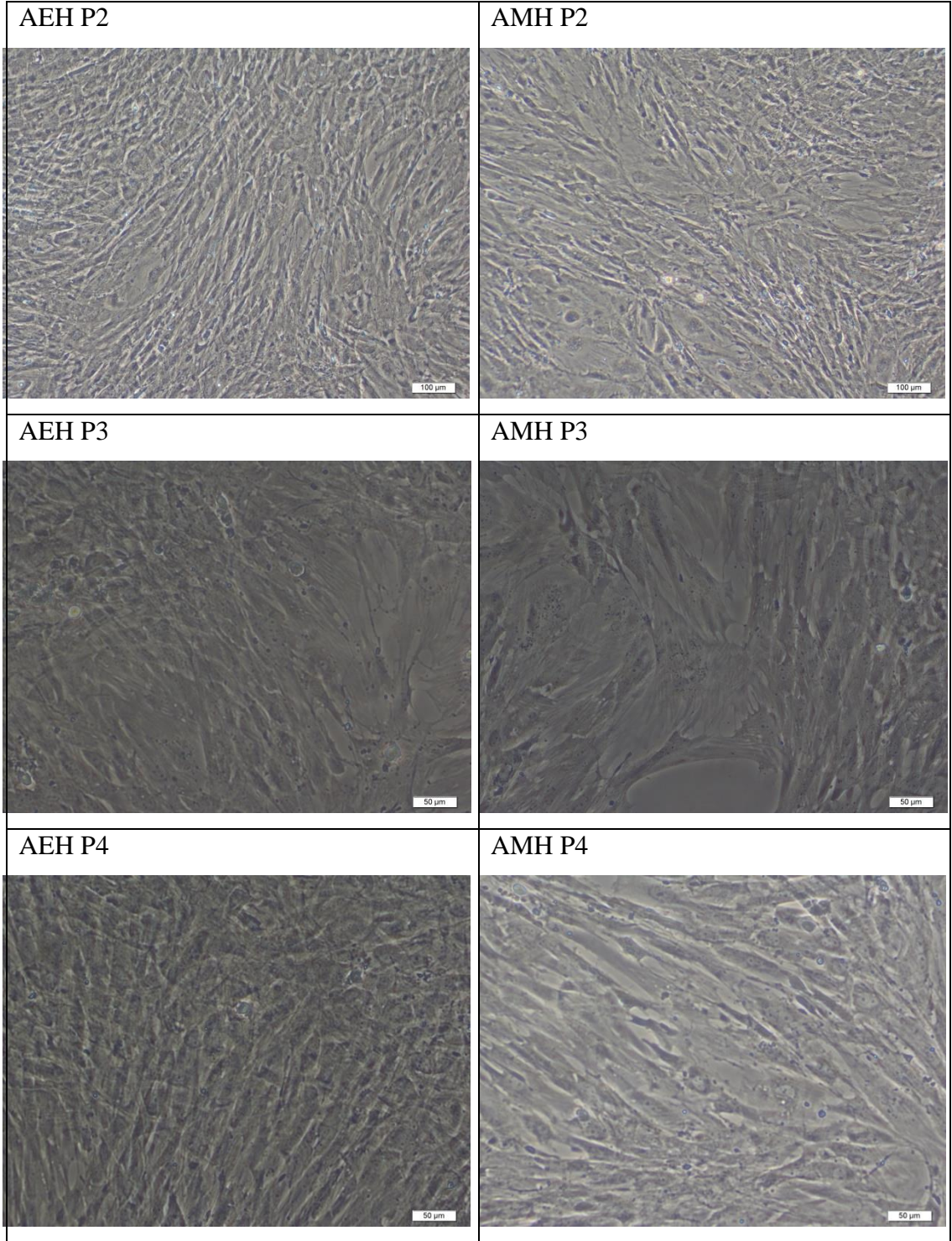
3.1. Morfolojik Bulgular

Amniotik epitel kök hücreleri ve amniotik mezenkimal kök hücreleri kültüre edildiğinde 4. ve 5. günlerde kök hücre toplulukları görülmeye başlandı. Başlangıçta hücreler yavaş büyüme gösterirken, daha sonra hızlı çoğalma potansiyeli göstererek %70-80 konfluense ulaştılar. Faz kontrast invert mikroskop (Nikon T2 Eclipse) altında hücreler, morfolojileri ve çoğalma potansiyelleri yönünden 10. pasaja kadar değerlendirildi.

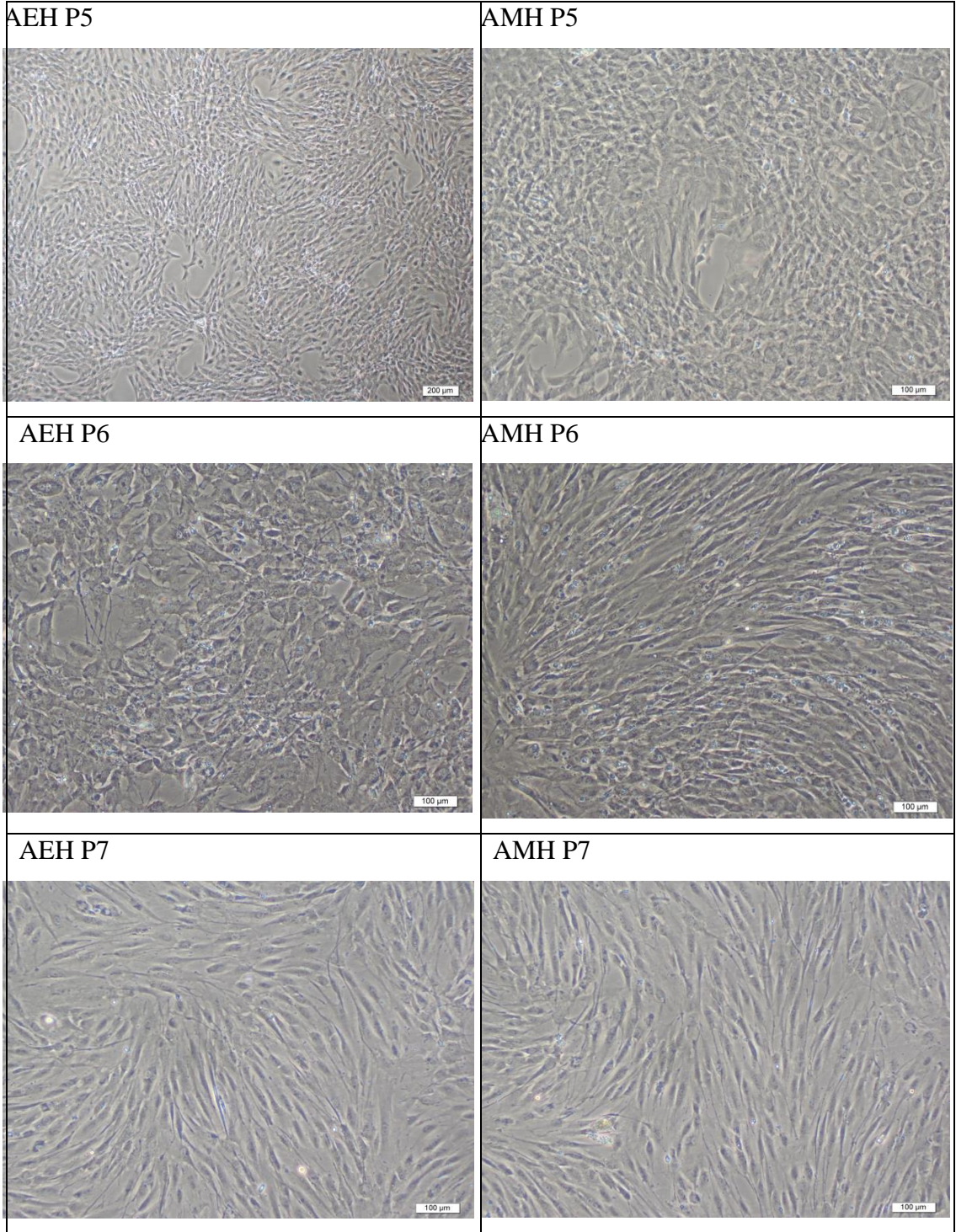
AMH'lerin, fibroblast benzeri bir morfolojiye sahip oldukları gözlemlendi. AEH'ler sadece pasaj (P) 0'da çok sayıda tipik poligonal morfolojiye sahip hücrelerden oluşurken (Şekil 3.1), ilerleyen pasajlarda fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin arttığı ve poligonal şekilli hücrelerin sayısının azalarak kaybolduğu belirlendi (Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4).



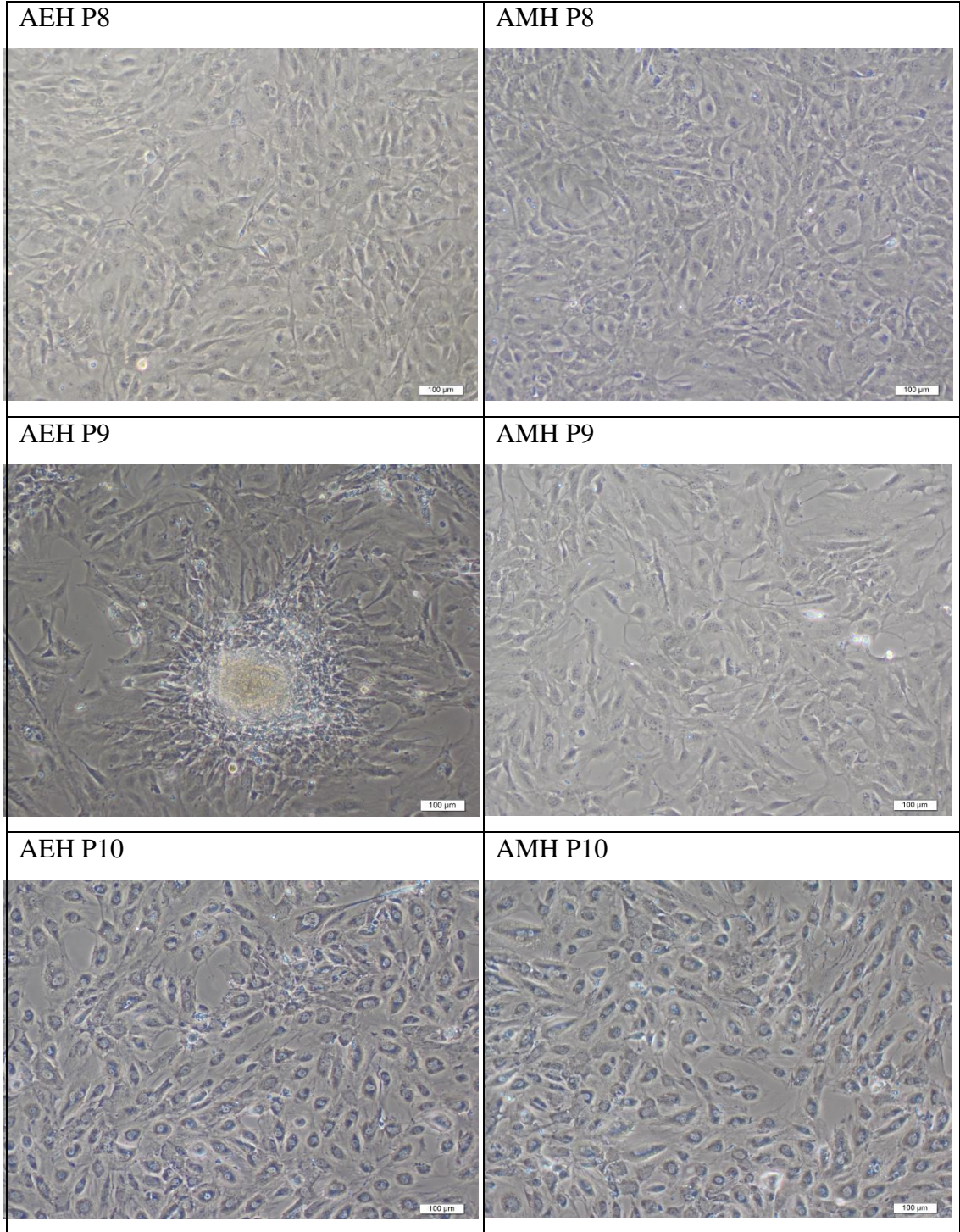
Şekil 3.1. AEH ve AMH'lerin P0 ve P1'de morfolojik yapıları.



Şekil 3.2. AEH ve AMH'lerin P2, P3 ve P4'de morfolojik yapıları.



Şekil 3.3. AEH ve AMH'lerin P5, P6 ve P7'de morfolojik yapıları.



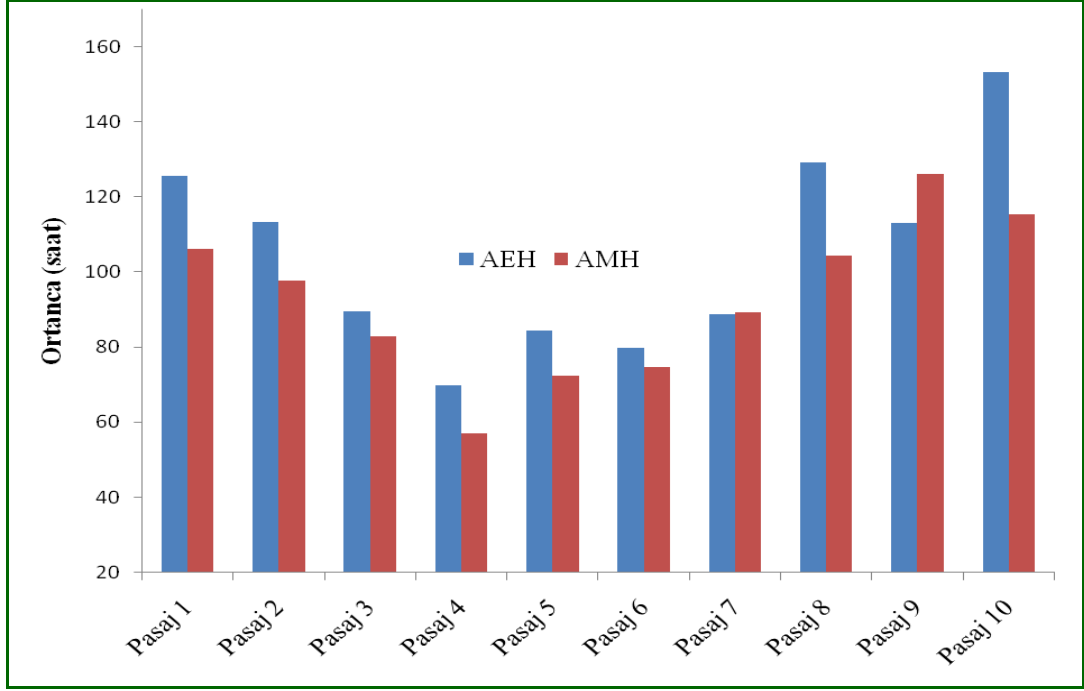
Şekil 3.4. AEH ve AMH'lerin P8, P9 ve P10'da morfolojik yapıları.

3.2. İkiye Katlanma Süresi (Doubling Time)

İkiye katlanma süresi hesaplanmasında her iki hücre türünde de (AEH ve AMH) benzer veriler elde edildi. İkiye katlanma süresinin P1'den P4'e kadar azaldığı, P6'dan P10'a kadar derece derece arttığı gözlemlendi (Tablo 3.1, Şekil 3.5). Her iki hücre türünde de en düşük ikiye katlanma süresinin P4 olduğu saptandı ($p < 0.05$).

Tablo 3.7. AEH ve AMH'lerin ikiye katlanma süresi, ortanca ve quartiles (Q) (çeyrekler) değerleri.

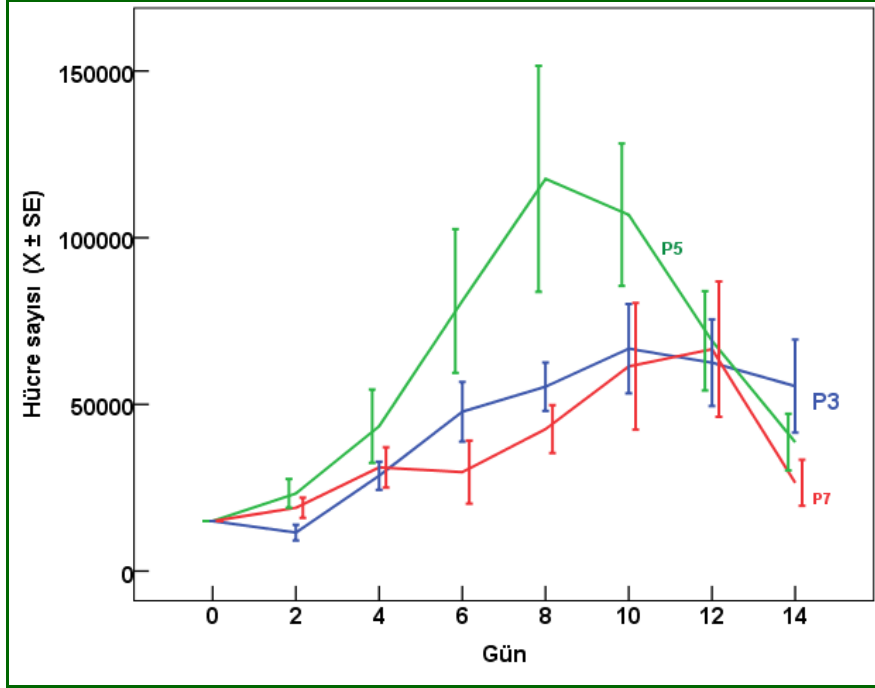
Pasaj	AEH Ortanca (Q1-Q3) n= 18 (P1-P5) n= 12 (P6-P10)	AMH Ortanca (Q1-Q3) n= 18 (P1-P8) n= 12 (P9-P10)
P1	125.55 (89.41-157.43)	106.08 (81.97-136.23)
P2	113.33 (103.38-135.75)	97.67 (81.33-118.25)
P3	89.54^b (79.00-98.68)	82.92 (70.44-99.81)
P4	69.73^a (52.60-126.03)	56.91^a (52.34-77.55)
P5	84.32^c (58.14-112.15)	72.29 (55.73-108.90)
P6	79.76^d (67.59-134.73)	74.72^b (69.09-78.24)
P7	88.82 (68.34-128.69)	89.22 (63.53-95.46)
P8	129.25^{a,b} (114.01-143.40)	104.40 (75.45-131.95)
P9	113.05^a (100.72-160.91)	126.25^{a,b} (101.55-152.05)
P10	153.23^{a,b,c,d} (119.10-167.40)	115.50^a (96.61-143.78)
Sütündeki aynı harfler istatistiki olarak önemi gösterir ($p < 0.05$)		



Şekil 3.5. AEH ve AMH'lerin P1'den P10'a kadar ikiye katlanma süresi grafiği.

3.3. Büyüme Eğrisi (Growth Curve)

Büyüme eğrisi grafiği, AMH için başlangıç log (çoğalma) fazının AEH'lerin log fazından daha kısa olduğunu gösterdi. AMH'lerde log fazı 0-24 saatte dururken, AEH'lerde tüm pasajlar (P3, P5 ve P7) için bu süre 0-48 saat sürdü. AMH'lerde sonraki log fazı 1-8 gün arasında kaydedildi ve ardından değerlerde düşme gözlemlendi (Tablo 3.2, Şekil 3.6). Büyüme modeli incelendiğinde P5'in hücre poliferasyonu için oldukça güçlü bir potansiyele sahip olduğu belirlendi. Pasajın ilerleyen aşamalarında hücreler daha yavaş ve daha az miktarda üreme gösterdi. Bunun yanı sıra AEH'lerin düşüş evresine geçmeden önce kademeli bir yükseliş eğrisi göstererek daha uzun süreli bir log fazına sahip olduğu gözlemlendi (2-10 gün) (Tablo 3.3, Şekil 3.7). AMH'ler gibi AEH'lerde de benzer bir poliferasyon modeli saptandı. Ayrıca P5'teki kök hücrelerin diğer pasajlardan (P3 ve P7) daha iyi bir büyüme kabiliyetine sahip olduğu görüldü.

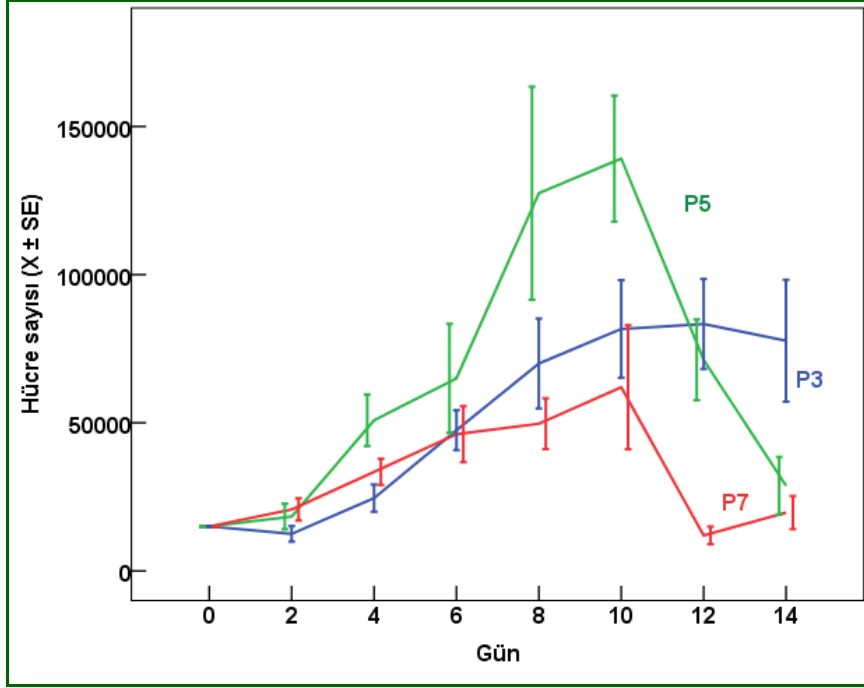


Şekil 3.6. AMH'lerin P3, P5 ve P7'de büyüme eğrisi.

Tablo 3.2. AMH'lerin P3, P5 ve P7'de büyüme eğrisi.

Gün (n=24)	Hücre sayısı/ml (AMH)		
	Pasaj 3 X ± SE	Pasaj 5 X ± SE	Pasaj 7 X ± SE
0	15000 ± 0	15000 ± 0	15000 ± 0
2	11562.50 ± 1175.98 ^{ab}	23281.25 ± 2169.24 ^{ab}	18984.38 ± 1513.79 ^a
4	28593.75 ± 2108.86	43437.50 ± 5510.43 ^a	31093.75 ± 3024.47 ^a
6	47812.50 ± 4478.54 ^a	81015.63 ± 10784.42 ^a	29687.50 ± 4732.98 ^a
8	55312.50 ± 3633.52 ^a	117656.30 ± 16952.09 ^a	42578.13 ± 3594.71 ^a
10	66718.75 ± 6703.73 ^a	106875 ± 10675.87 ^{ab}	61406.25 ± 9497.15 ^b
12	62500 ± 6499.07	69062.50 ± 7443.29	66562.50 ± 10142.48
14	55468.75 ± 6971.86 ^a	38671.88 ± 4250.81	26484.38 ± 3443.19 ^a

Sütündaki aynı harfler istatistiki olarak önem gösterir (p<0.05)



Şekil 3.7. AEH'lerin P3, P5 ve P7'de büyüme eğrisi.

Tablo 3.3. AEH'lerin P3, P5 ve P7'de büyüme eğrisi.

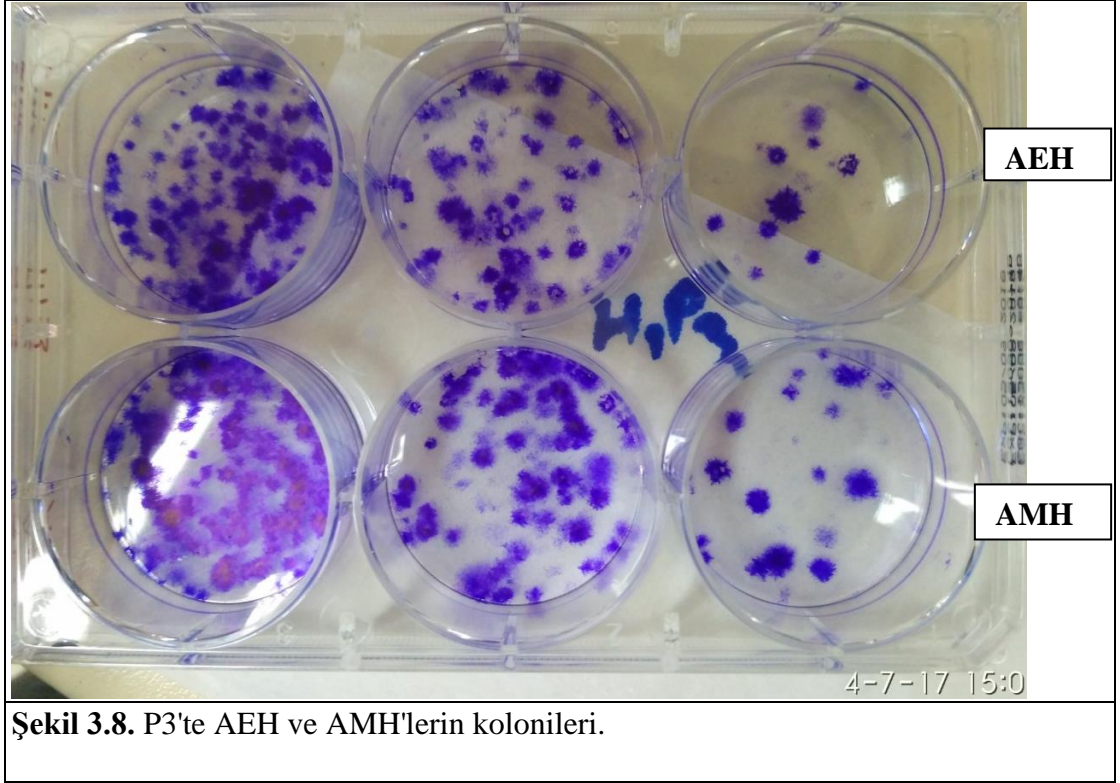
Gün (n=24)	Hücre sayısı/ml (AEH)		
	Pasaj 3 X ± SE	Pasaj 5 X ± SE	Pasaj 7 X ± SE
0	15000.00 ± 0.00	15000.00 ± 0.00	15000.00 ± 0.00
2	12500.00 ± 1311.87 ^{ab}	18333.33 ± 2163.32 ^{ab}	20729.17 ± 1888.41 ^a
4	24583.33 ± 2290.43 ^a	50833.33 ± 4357.93 ^a	33437.50 ± 2220.89 ^a
6	47500.00 ± 3378.32	65000.00 ± 9212.66 ^a	46145.83 ± 4727.59 ^a
8 (n=16)	70000.00 ± 7582.88	127500.00 ± 17975.68 ^a	49687.50 ± 4293.13 ^a
10	81666.67 ± 8218.41 ^a	139166.67 ± 10647.80 ^{ab}	61979.17 ± 10469.05 ^b
12	83333.33 ± 7589.54 ^a	71250.00 ± 6818.36 ^b	11979.17 ± 1489.54 ^{ab}
14	77708.33 ± 10274.67 ^{ab}	28750.00 ± 4845.90 ^{ab}	19687.50 ± 2788.24 ^a
Sütundaki aynı harfler istatistiki olarak önem gösterir (p<0.05)			

3.4. Koloni Oluşturan Birim Analizi (Colony Forming Unit Assay)

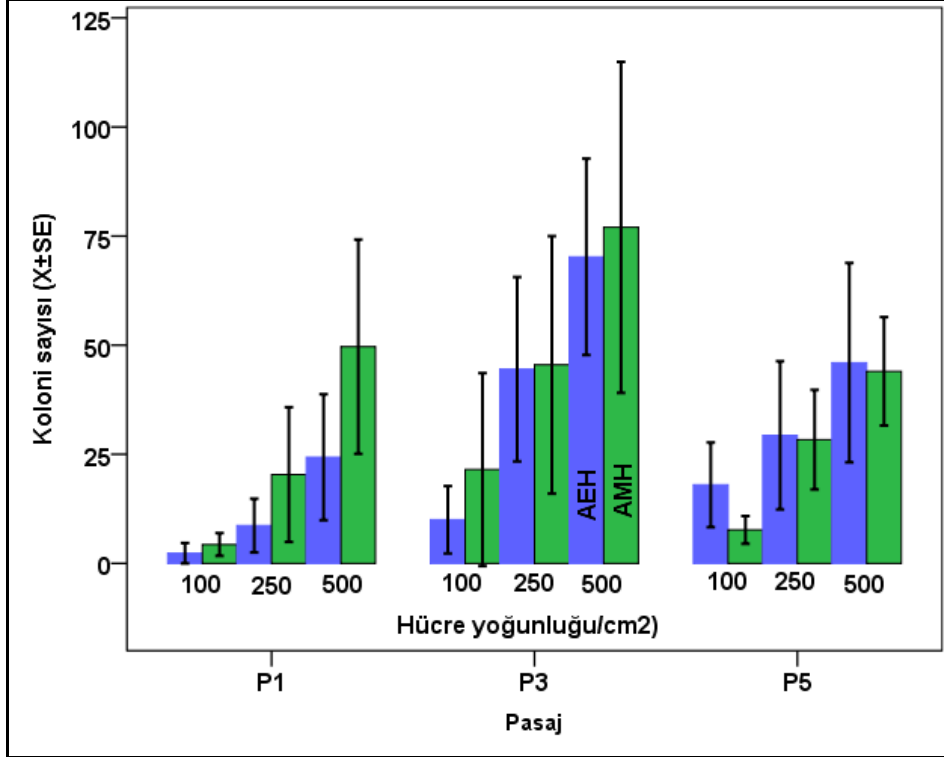
Farklı pasajlardaki (P1, P3 ve P5) hücrelerin farklı yoğunluklarında oluşan koloni sayıları incelendiğinde, her iki kök hücre türünde de (AEH ve AMH) hücre ekim konsantrasyonunun artmasıyla birlikte koloni gelişimlerinde anlamlı bir artış görüldü (Şekil 3.8). AMH'lerin koloni oluşturmada daha yüksek bir potansiyele sahip olduğu ortaya kondu (Tablo 3.4). Her iki durumda da kolonilerin oluşumunda P3'ün üstünlük gösterdiği belirlendi (Şekil 3.9).

Tablo 3.8. P1, P3 ve P5'te AEH ve AMH'lerde koloni oluşturan birim (KOB) analizi.

	Pasaj numarası	Hücre yoğunluğu (hücre/cm ²)	Toplam hücre	KOB X±SE	Hücre/ KOB
AEH	P1 (n=9)	100	960	2.33 ± 3.57	411.49
		250	2400	8.67 ± 7.65	276.91
		500	4800	24.33 ± 9.89	197.26
	P3 (n=8)	100	960	10.00 ± 3.78^a	96.00
		250	2400	44.50 ± 8.11^b	53.93
		500	4800	70.25 ± 10.49^{a,b}	68.33
	P5 (n=9)	100	960	18.00 ± 3.57	53.33
		250	2400	29.33 ± 7.65^a	81.82
		500	4800	46.00 ± 9.89^a	104.35
AMH	P1 (n=9)	100	960	4.33 ± 5.87	221.56
		250	2400	20.33 ± 9.53^a	118.03
		500	4800	49.67 ± 12.77^a	96.64
	P3 (n=8)	100	960	21.50 ± 6.23^a	44.65
		250	2400	45.50 ± 10.11^a	52.75
		500	4800	77.00 ± 13.55^a	62.34
	P5 (n=9)	100	960	7.67 ± 5.87^a	125.21
		250	2400	28.33 ± 9.53^a	84.71
		500	4800	44.00 ± 12.77^a	109.09
Aynı pasajın farklı konsantrasyonlarındaki aynı harfler istatistiki olarak önemi gösterir (p<0.05)					



Şekil 3.8. P3'te AEH ve AMH'lerin kolonileri.



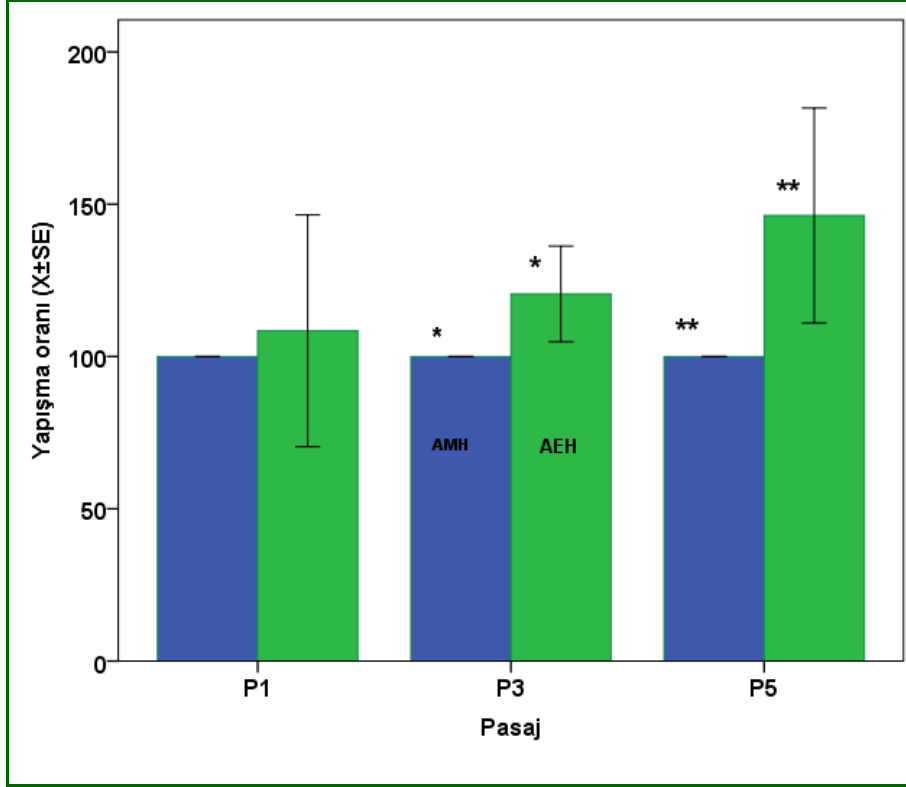
Şekil 3.9. P1, P3 ve P5'te AEH ve AMH'lerin koloni oluşturan birim grafiği.

3. 5. Yapışma Profili (Adhesion profile)

Amniotik epitel hücrelerin ve amniotik mezenkimal hücrelerin yapışma özellikleri P1, P3 ve P5 olmak üzere üç pasajda kontrol edildi. AEH'lerin AMH'lerden daha yüksek bir yapışma potansiyeli gösterdiği belirlendi. Bu fark P3 ve P5'te daha yüksek bir anlamlılık gösterdi (Tablo 3.5, Şekil 3.10).

Tablo 3.9. P1, P3 ve P5'te AEH ve AMH'lerin yapışma oranı.

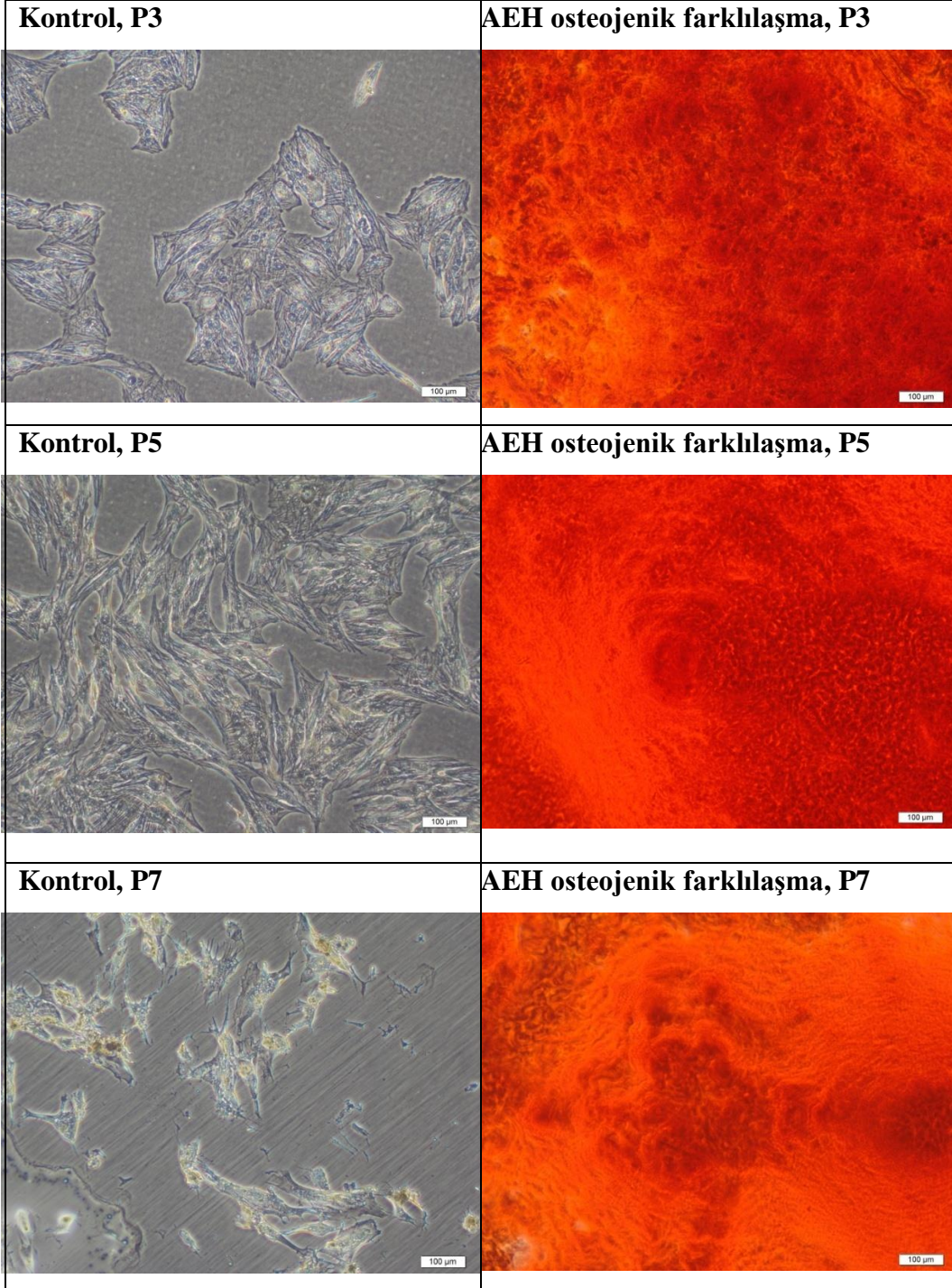
Pasaj	Hücre türü	Proliferasyon X ± SE
P1 (n=6)	AEH	108.40 ± 19.03
	AMH	100.00 ± 0.00
P3 (n=6)	AEH	120.55 ± 7.86 ^a
	AMH	100.00 ± 0.00 ^a
P5 (n=8)	AEH	146.30 ± 17.63 ^a
	AMH	100.00 ± 0.00 ^a
Aynı pasajdaki aynı harfler istatistiki önemi gösterir (p<0.05)		



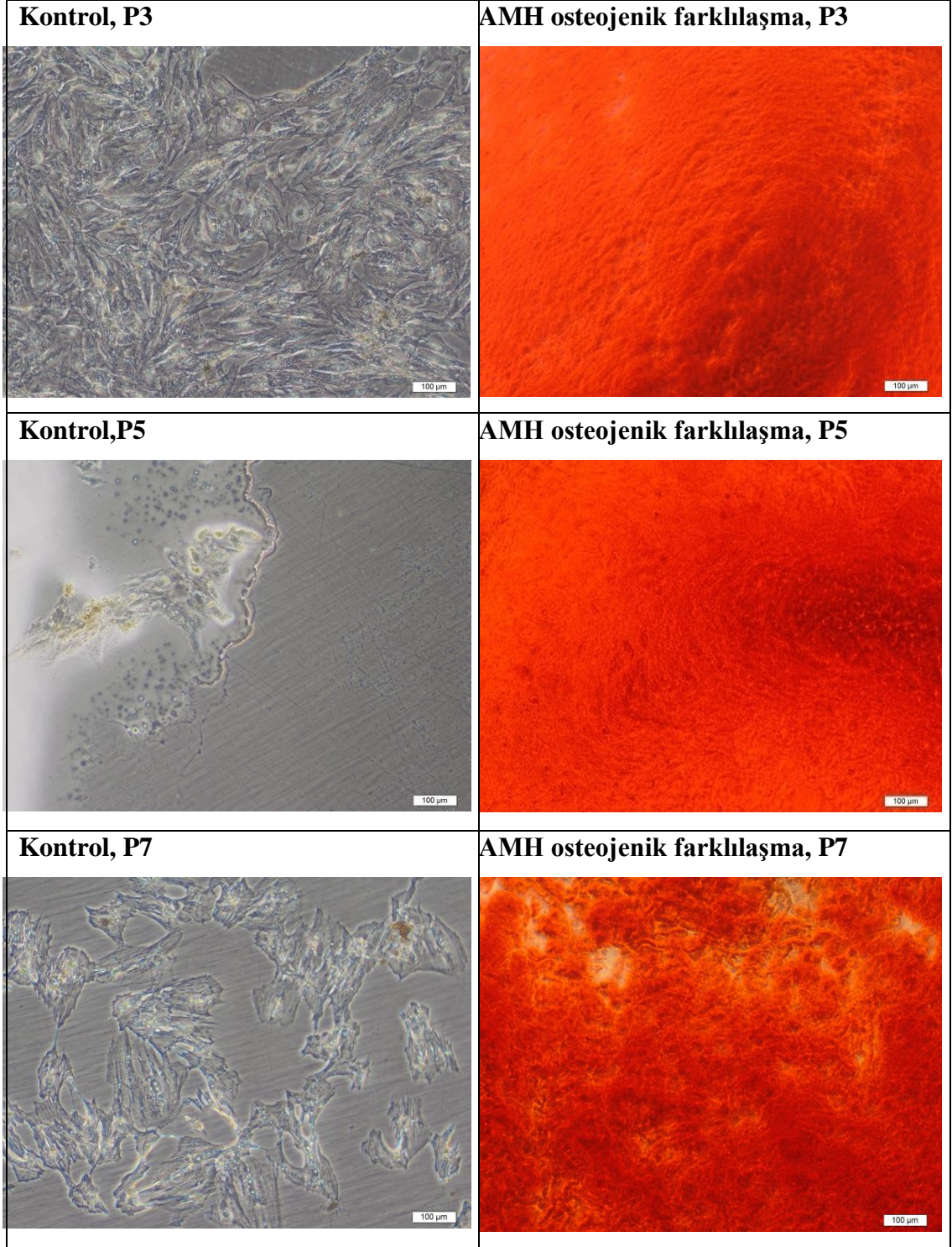
Şekil 3.10. P1, P3 ve P5'te AEH ve AMH'lerin yapışma oranı grafiği. Aynı işaretler AEH ve AMH'ler arasındaki istatistikî önemi gösterir ($p < 0.05$).

3.6. Osteojenik Farklılaşma

P3, P5 ve P7'de, AEH ve AMH'ler osteojenik farklılaşma medyumunu ile 21 gün kültüre edildikten sonra Alizarid Red S ile boyandı. Deney grubunda kalsiyum birikintileri kırmızı renkte boyanırken, normal kültür medyumundaki (kontrol grubu) hücrelerde boyanma gözlenmedi. Üç ayrı pasajda da osteojenik farklılaşma görüldü (Şekil 3.11-12).



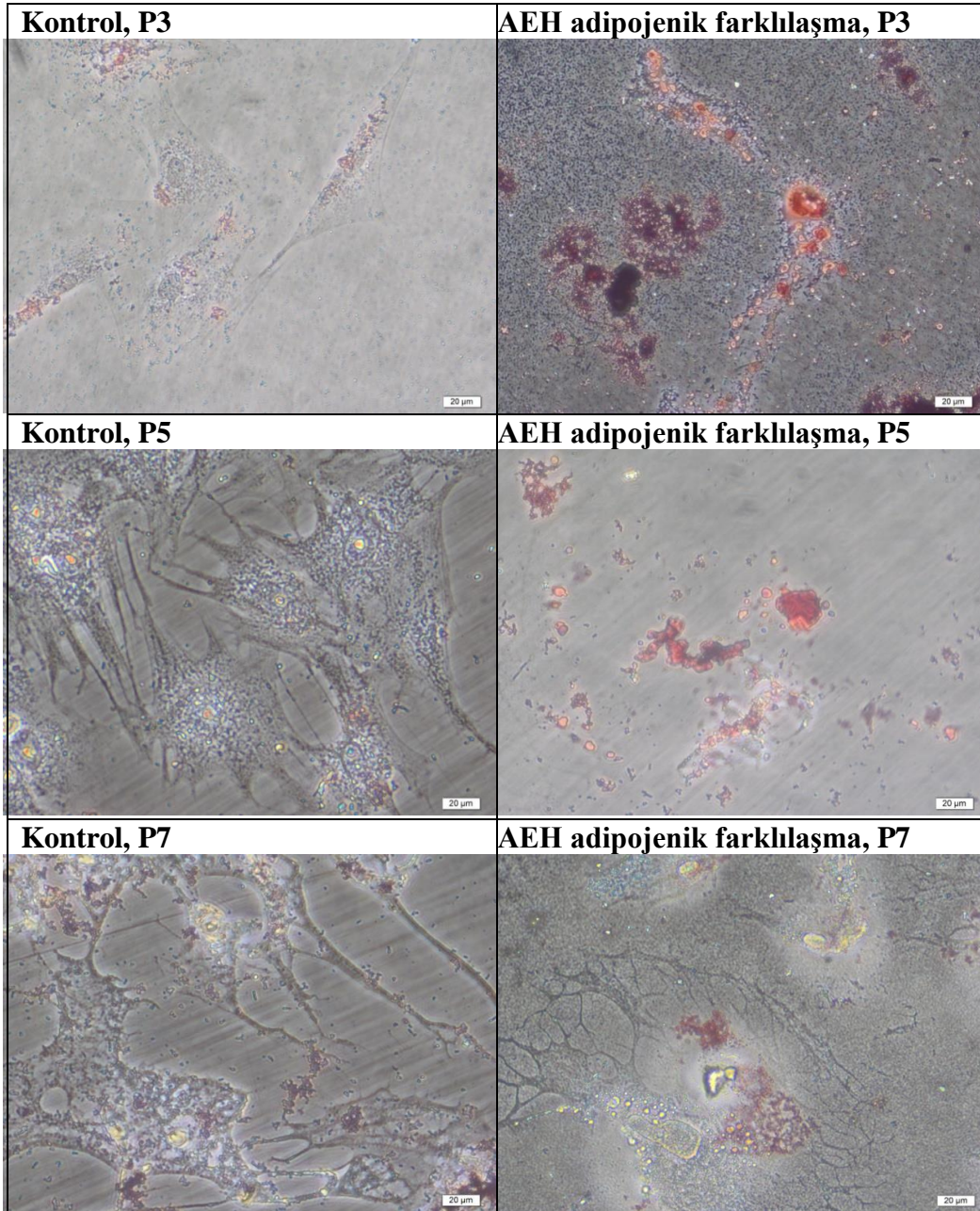
Şekil 3.11. AEH'lerde P3, P5 ve P7'de 21. günde osteojenik farklılaşma.



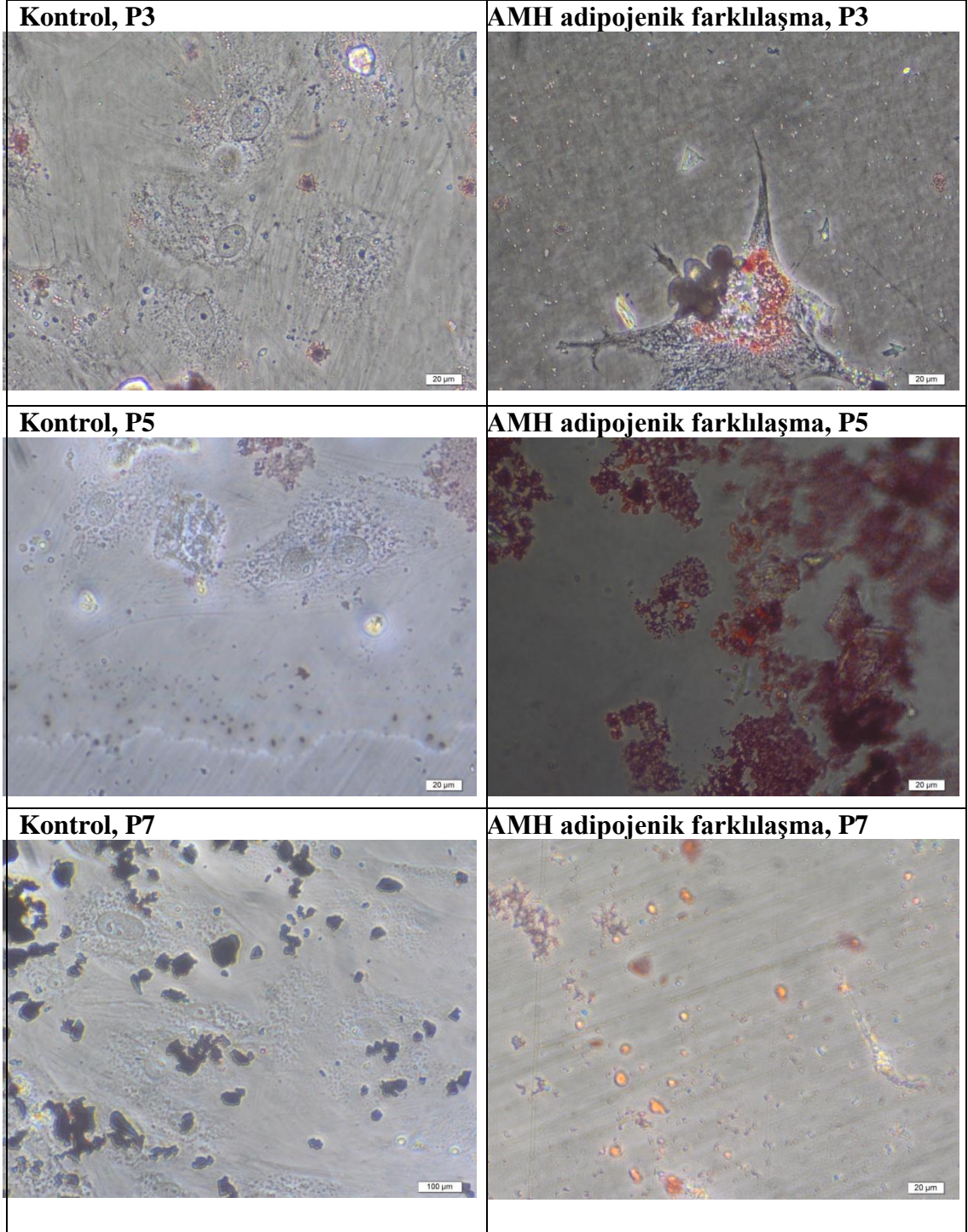
Şekil 3.12. AMH'lerde P3, P5 ve P7'de 21. günde osteojenik farklılaşma.

3.7. Adipojenik Farklılaşma

P3, P5 ve P7'de, AEH ve AMH'ler adipojenik farklılaştırma medyumunda kültüre edildikten 21 gün sonra yağ dokuya farklılaşma Oil Red O boyası ile gösterildi. Üç pasajda da adipojenik farklılaşma belirlendi. Hücrelerin sitoplazmasında lipid damlacıklarının kırmızı renkte boyandığı gözlemlendi. Kontrol boyamada ise herhangi bir yağ damlacığı gözlenmedi (Şekil 3.13-14).



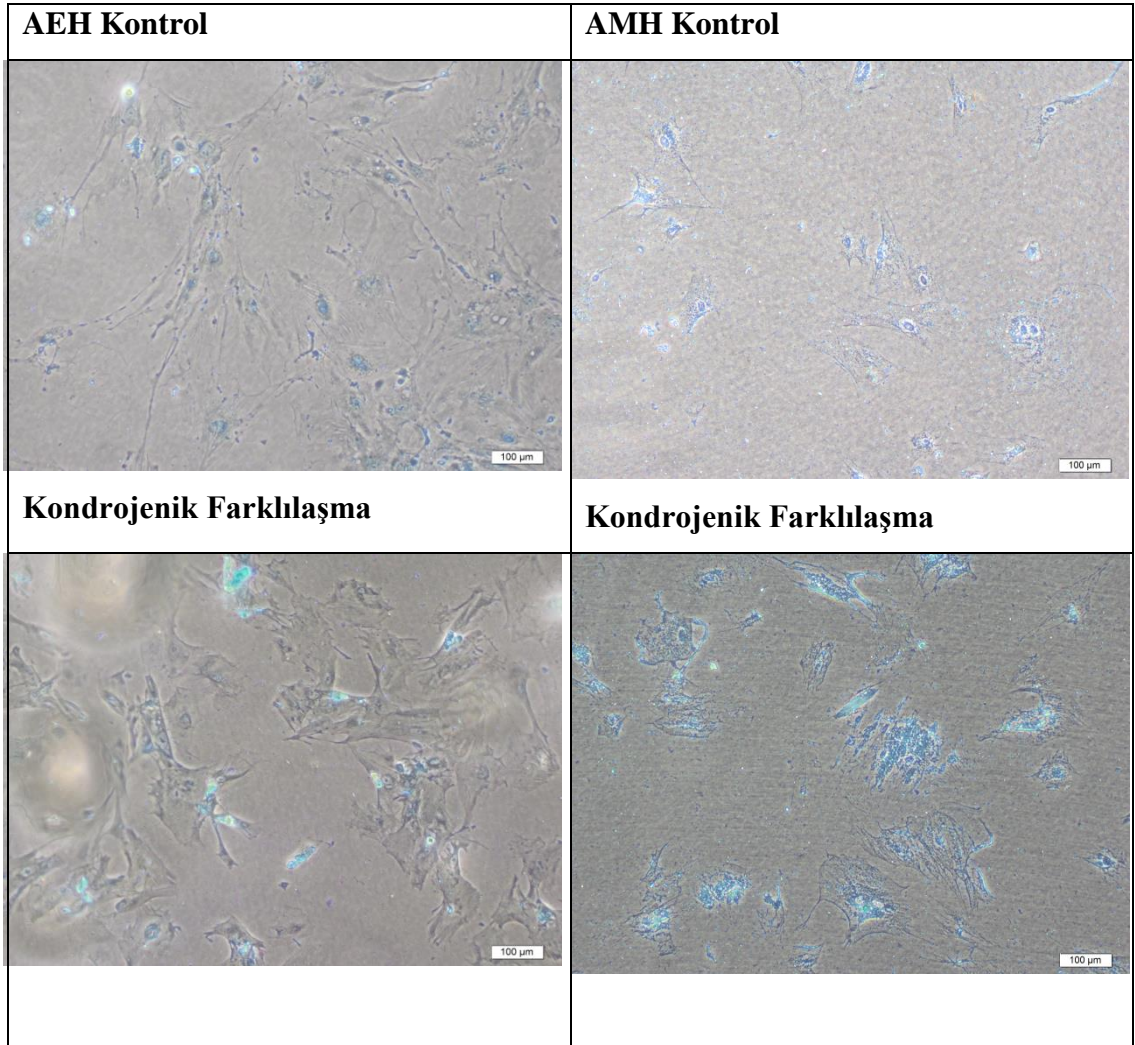
Şekil 3.13. P3, P5 ve P7'de AEH'lerde adipojenik farklılaşma medyumunu ile kültüre edildikten sonra 21. günde hücrelerin sitoplazmalarında Oil Red O ile parlak kırmızı renkte boyanmış alanlar.



Şekil 3.14. P3, P5 ve P7'de AEH'lerde adipojenik farklılaşma medyumu ile kültüre edildikten sonra 21. günde hücrelerin sitoplazmalarında Oil Red O ile parlak kırmızı renkte boyanmış alanlar.

3.8. Kondrojenik Farklılaşma

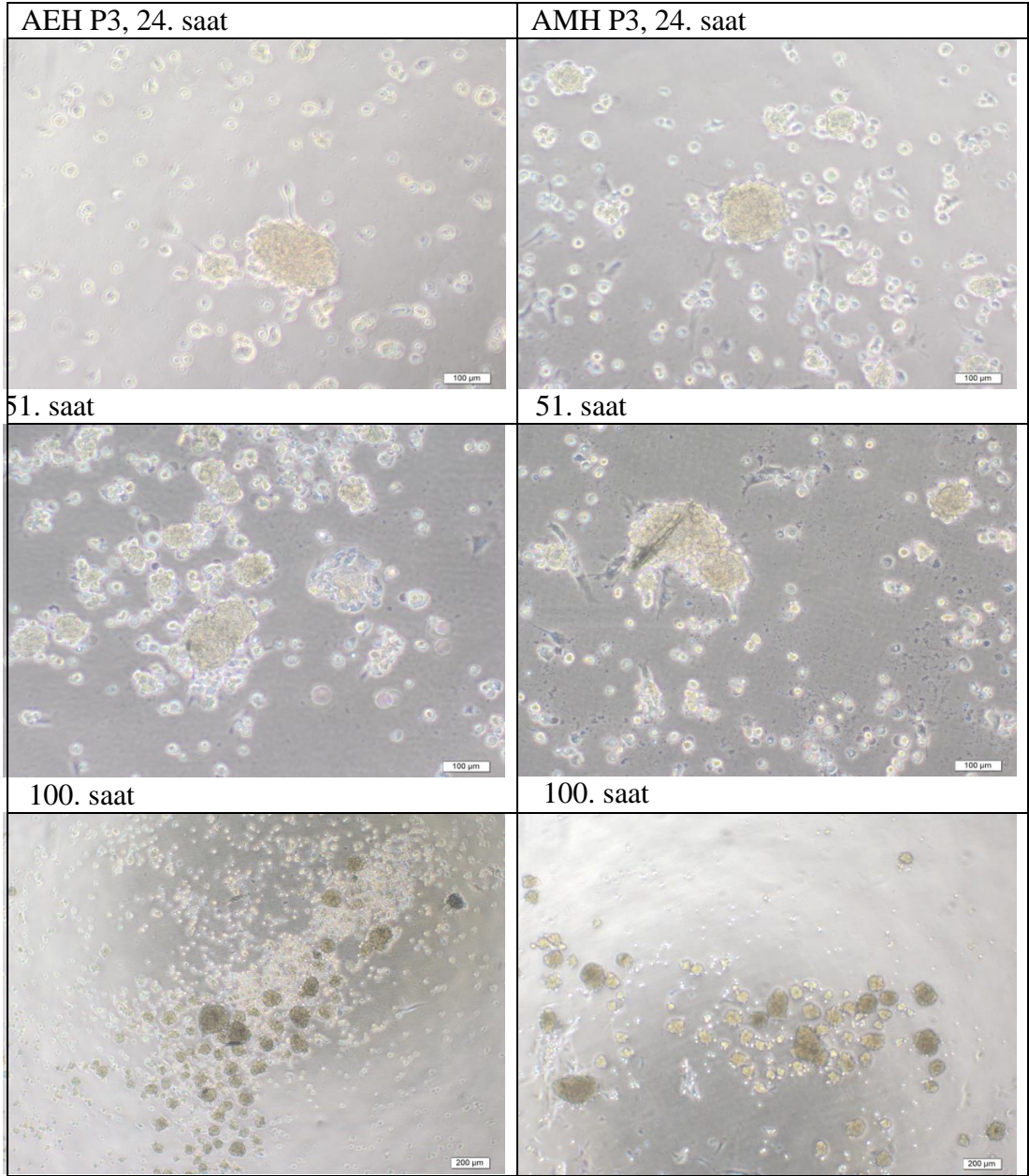
P5'teki AEH ve AMH'ler kondrojenik farklılaşma medyumu ile 21 gün kültüre edildikten sonra alsian mavisi ile boyandı. Glikozaminoglikanlar mavi renkte boyandı. Kontrol grubunda herhangi bir boyanma gözlenmedi. AMH'nin AEH'lere kıyasla daha yüksek bir kondrojenik farklılaşma kapasitesine sahip olduğu belirlendi. (Şekil 3.15).



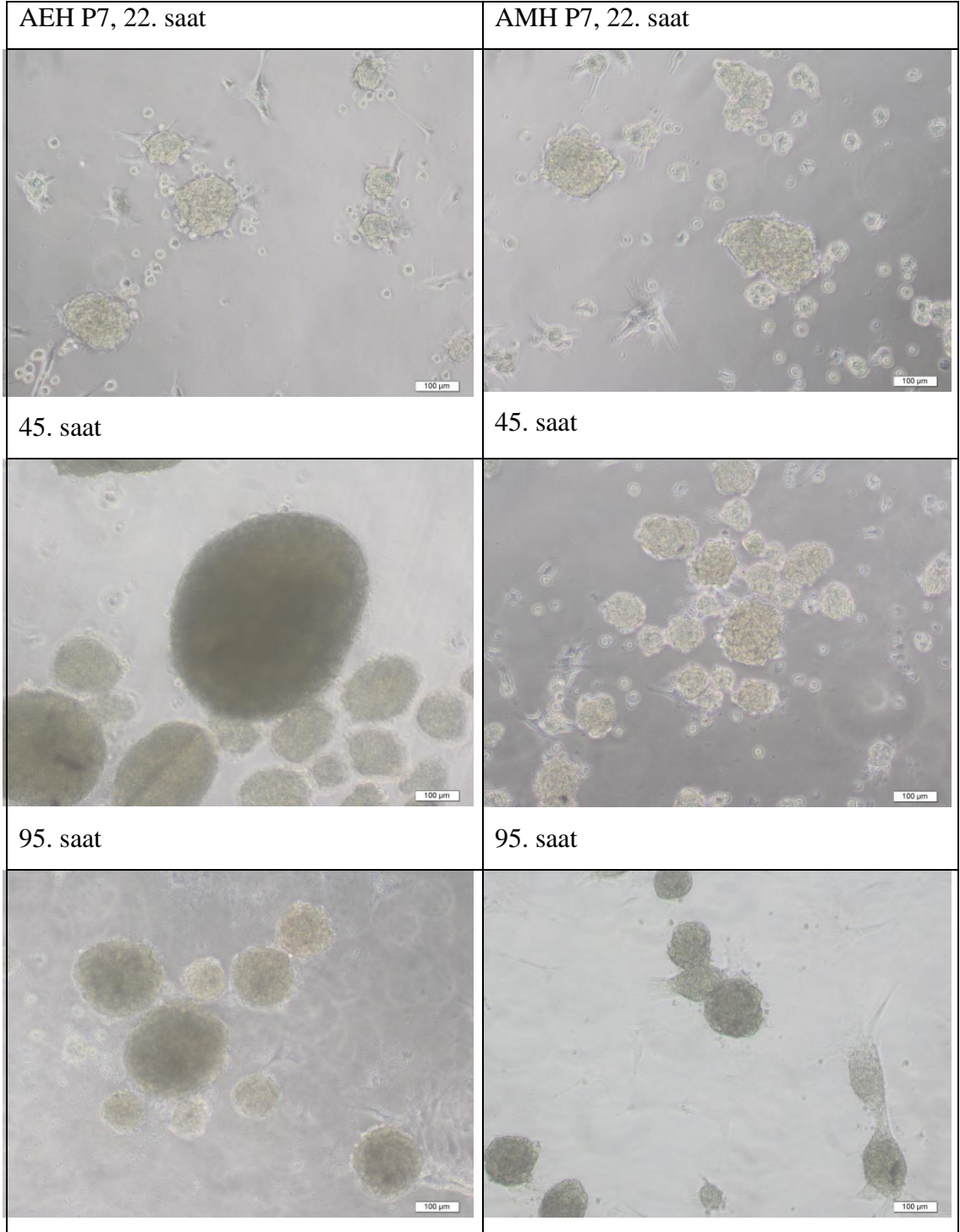
Şekil 3.15. AEH ve AMH'lerde kondrojenik farklılaşma medyumu ile kültüre edildikten sonra 21. günde hücrelerin sitoplazmalarında alsian mavisi ile parlak mavi renkte boyanmış alanlar.

3.9. Nörosfere Farklılaşma

P3 ve P7'de kök hücreler (AEH ve AMH) kültüre edildikten 48 saat sonra küre şekilli nörosferler oluşmaya başladı. Yaklaşık 100. saatlerde irili ufaklı çok sayıda nörosferlerin tamamen olgunlaştığı ve serbestçe yüzdüğü gözlemlendi (Şekil 3.16-17). Nörosfer oluşturma kabiliyeti P3'te P7'ye oranla daha düşüktü. Yaklaşık 7 gün sonra nörosferlerin yapıları bozularak kayboldu.



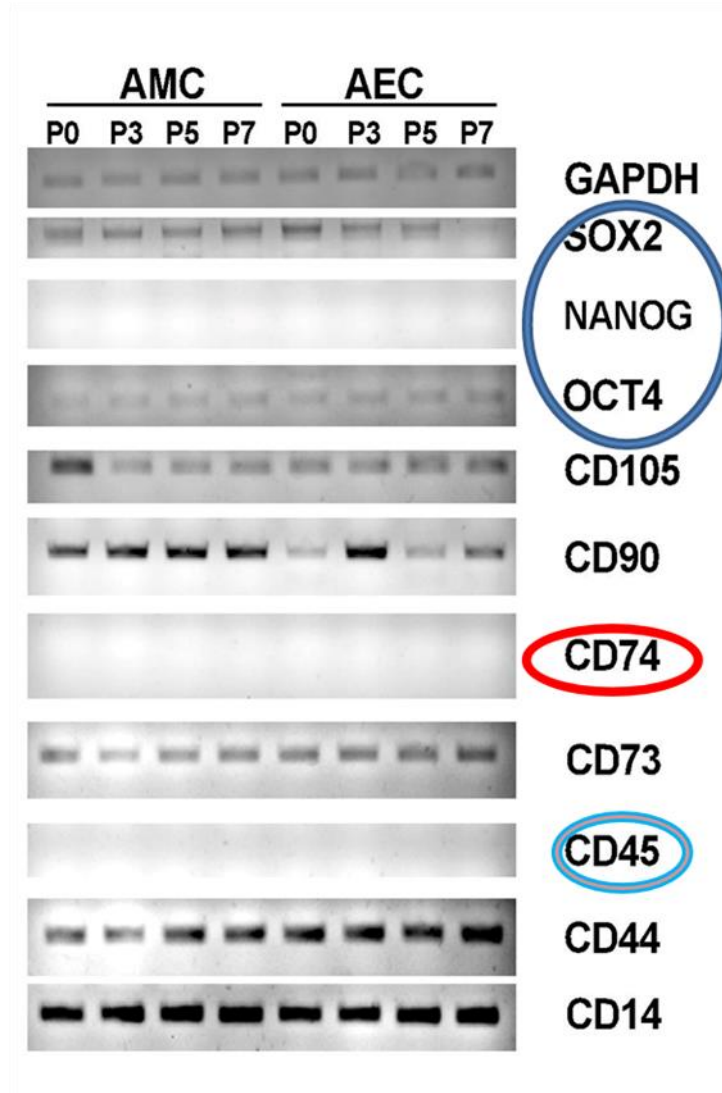
Şekil 3.16. AEH ve AMH'lerde 3. pasajda oluşan nörosferler.



Şekil 3.17. AEH ve AMH'lerde 7. pasajda oluşan nörosferler.

3.10. PCR

P0, P3, P5 ve P7'de yapılan PCR analizlerinde, atların amnionundan elde edilen amniotik epitel ve amniotik mezenkimal kök hücrelerin, multipotent özelliklerden daha fazlasına sahip oldukları görüldü. Hücreler multipotent markırlar olan CD14, CD44, CD 73, CD 90, CD 105 ve pluripotent markırlar olan SOX 2 ve OCT 3/4 bakımından pozitif ekspresyon gösterdi. Bunun yanında hemopoietik kök hücre markırını olan CD 45, MHC-II markırını CD 74 ve pluripotent markırlardan NANOG her iki hücre türünde de negatif sonuç verdi (Şekil 3.18).



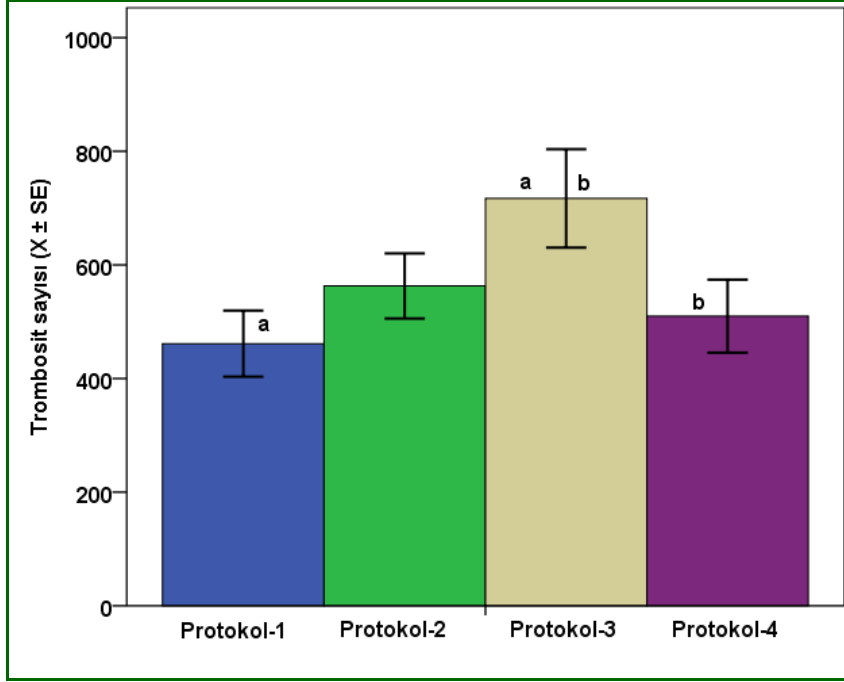
Şekil 3.18. AEH ve AMH'lerin PCR analizi.

3.11. At Kanı için En Fazla Sayıda Trombosit Elde Etme Protokolünün Seçimi

Yapılan çalışmada farklı protokoller kullanılarak hangisinde en fazla sayıda trombosit elde edilebileceği tespit edildi. Toplam trombositlerin sayısı temel alınarak en iyi PRP hazırlama protokolü belirlendi. Sonuçlar incelendiğinde protokol-3'te (1. santrifüjde 1000 rpm 10 dk, 2. santrifüjde 3000 rpm 15 dk), protokol-1 ve protokol-4'den anlamlı olarak ($p<0.05$) daha yüksek sayıda trombosit elde edildiği belirlendi (Tablo 3.6, Şekil 3.19). Tam kanda ortalama trombosit sayısı $122.42 \times 10^9/L$ olarak tespit edildi. Protokol-3'te tam kana göre yaklaşık 6 kat fazla trombosit elde edildi. Çalışmamızın sonraki aşamalarda PRP hazırlanırken, en fazla sayıda trombosit elde ettiğimiz 3. protokol kullanılarak PRP'ler hazırlandı.

Tablo 3.10. Farklı protokoller kullanılarak elde edilen trombosit sayısı.

Trombosit elde etme protokolü n=12	Trombosit sayısı ($10^9/L$) X \pm SE
Protokol-1	461.42 \pm 29.16 ^a
Protokol-2	563.00 \pm 28.65
Protokol-3	717.17 \pm 43.34 ^{a,b}
Protokol-4	509.92 \pm 32.16 ^b
Farklı harfler istatistiki önemi gösterir ($p<0.05$)	



Şekil 3.19. 4 farklı protokole göre elde edilen trombosit miktarları. Aynı işaretler protokoller arasındaki istatistiksel önemi gösterir.

Ayrıca lökosit ve eritrosit konsantrasyonları için de sayım yapıldı. Lökosit ve eritrosit sayıları bakımından kan ve Protokol-3'e göre hazırlanan PRP arasında istatistiksel önemde farklılık ($p < 0.01$) görüldü. PRP'deki lökositlerin, kandakinden yaklaşık 2.7 kat daha yüksek bir konsantrasyona sahip olduğu belirlendi. Ancak eritrositlerin PRP'de daha düşük konsantrasyonda olduğu saptandı ($p < 0.01$) (Tablo 3.7).

Tablo 3.11. Kan ve PRP'de eritrosit, lökosit ve trombosit miktarları.

Örnekler (n=9)	Lökosit ($10^9/L$) X ± SE	Eritrosit ($10^{12}/L$) X ± SE	Trombosit ($10^9/L$) X ± SE
Kan	6.10 ± 0.37*	7.25 ± 0.47*	122.42 ± 5.81*
Protokol-3	16.51 ± 1.16*	2.11 ± 0.29*	717.17 ± 43.34*
Aynı sütunda * = istatistiksel anlamda önemi gösterir ($p < 0.01$)			

3.12. Büyüme Faktörlerinin Ölçümü

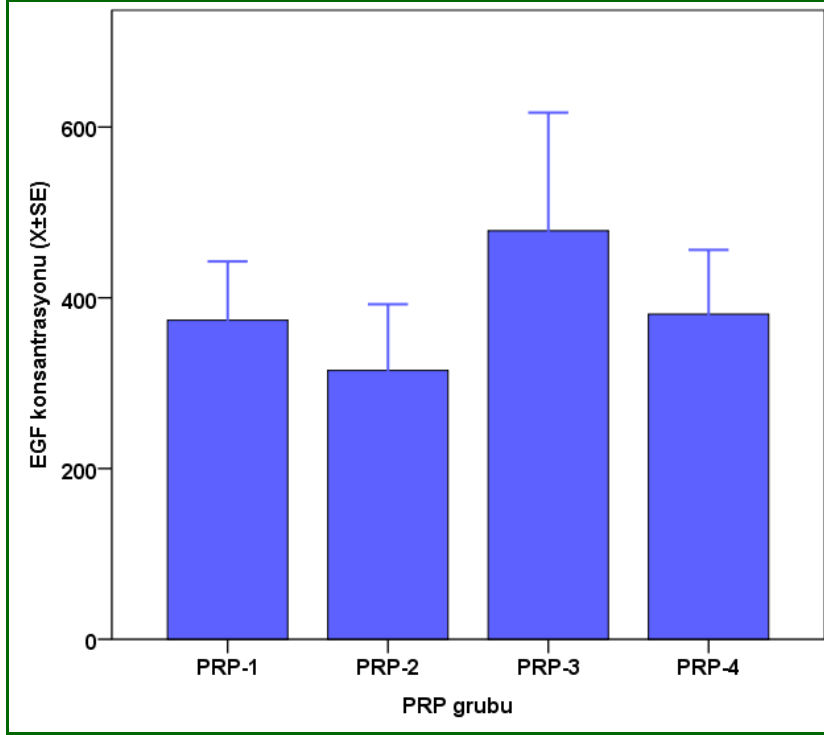
PRP'lerin etkili olabilmesi için aktive olması ve büyüme faktörlerini salgılaması gerekmektedir. Etkili PRP'yi tespit etmek için farklı şekillerde hazırlanan PRP'ler farklı kriterlere (EGF salınımı, PDGF salınımı, hücre proliferasyonu) göre birbirleriyle kıyaslandı. Bu amaçla 4 farklı PRP grubu oluşturuldu: Taze kandan elde edilen ve aktive edilmeyen PRP grubu (PRP-1); Taze kandan elde edilen ve CaCl₂ ile aktive edilen PRP grubu (PRP-2); CaCl₂ ile aktive edildikten sonra dondurulan PRP grubu (PRP-3); Dondurma-çözdürme yöntemiyle aktive edilen PRP grubu (PRP-4).

3.12.1. EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) Konsantrasyonu

Atlardan elde edilen PRP gruplarında ELİSA ile EGF ölçümü yapıldı. EGF salınımları incelendiğinde PRP grupları arasında istatistiki anlamda bir fark görülmedi. Yapılan ölçümlere göre en yüksek EGF salınımı PRP-3'te belirlenirken onu PRP-4'ün takip ettiği görüldü (Tablo 3.8, Şekil 3.20).

Tablo 3.8. PRP gruplarında EGF konsantrasyonu.

Gruplar	EGF (ng/L) X ± SE
PRP-1	373.64 ± 34.51
PRP-2	314.80 ± 38.78
PRP-3	478.47 ± 69.16
PRP-4	380.80 ± 37.70



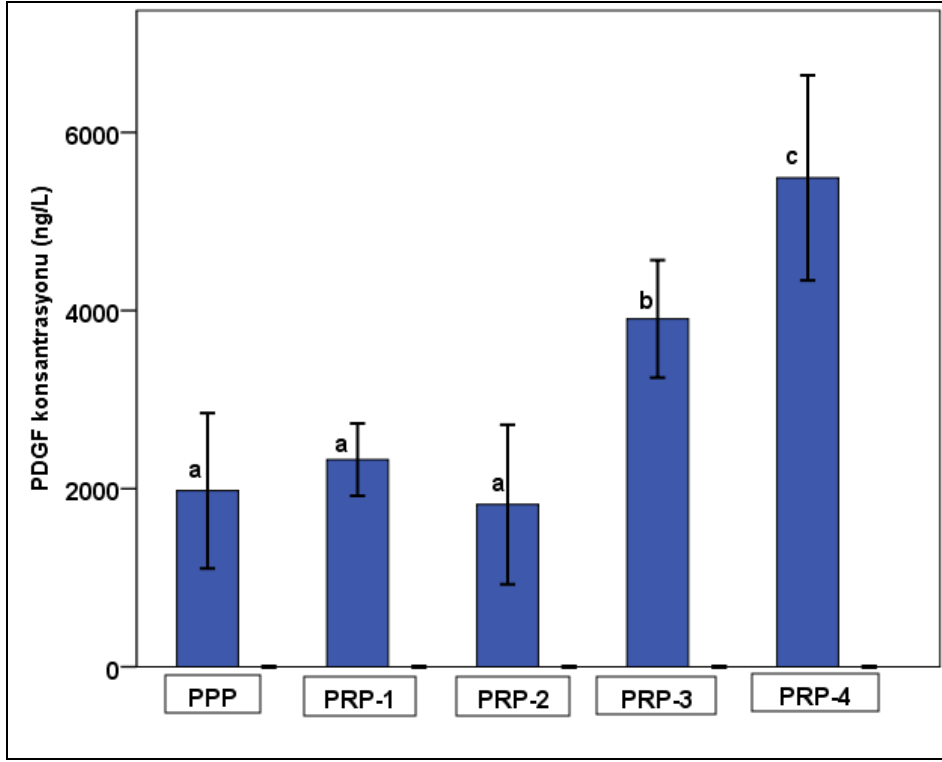
Şekil 3.20. PRP gruplarında EGF konsantrasyonu.

3.12.2. PDGF (Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü) Konsantrasyonu

PRP grupları arasında PDGF konsantrasyonları incelendiğinde; PRP-4 grubunda istatistiki anlamda en yüksek PDGF salınımı belirlendi ($p < 0.05$). PRP-3 grubunda ise kontrol grubu olarak bulunan PPP, PRP-1 ve PRP-2 gruplarına göre daha yüksek düzeylerde PDGF salınımı gözlemlendi (Tablo 3.9, Şekil 3.21). ELİSA sonuçlarına göre PRP-4 grubundaki trombositlerin, diğer gruplara göre daha iyi aktive edildiği görüldü.

Tablo 3.9. PRP gruplarında PDGF konsantrasyonları.

Gruplar	PDGF-BB (ng/L) X±SE
PPP	1977.34 ± 436.18 ^a
PRP-1	2326.33 ± 202.83 ^a
PRP-2	1822.05 ± 448.20 ^a
PRP-3	3905.56 ± 329.98 ^b
PRP-4	5489.80 ± 575.60 ^c
Farklı harfler istatistiki önemi gösterir ($p < 0.05$)	



Şekil:3.21. PRP gruplarında PDGF konsantrasyonu.

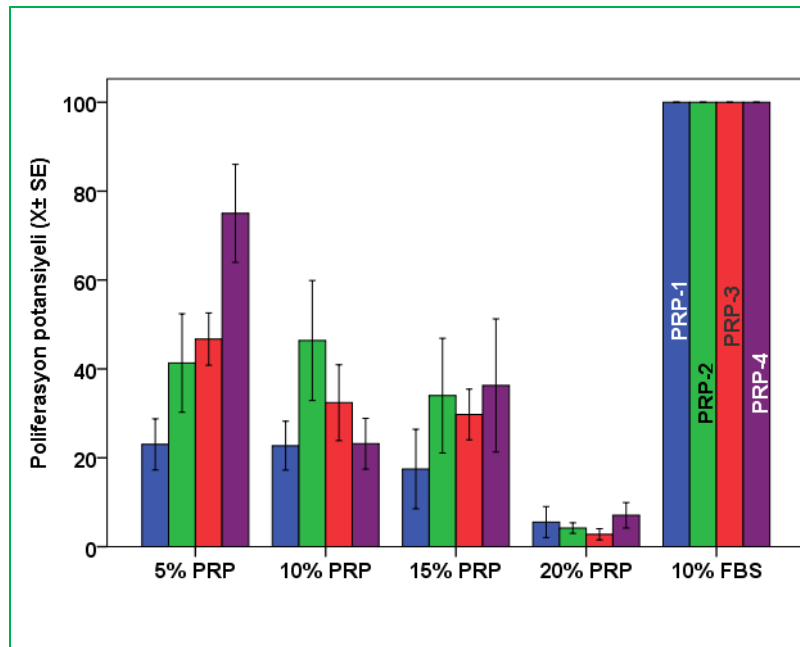
3.13. MTT ile Karşılaştırmalı Hücre Proliferasyonu

Çalışmanın bu aşamasında 4 PRP grubunda, %5, %10, %15 ve %20'lik konsantrasyonlarda 4 PRP altgrubu oluşturuldu. Bu dört altgrup PRP'nin AEH'ler ve AMH'lerin poliferasyonu üzerine potansiyel etkileri değerlendirildi. Ayrıca kontrol grubu olan FBS ile PRP'ler arasında hücrelerin proliferasyonları karşılaştırıldı. AEH'lerde en iyi hücre proliferasyonunun kontrole göre baskılanmasına rağmen ($p < 0.001$) kontrol grubuna daha yakın bir değere sahip olan %5'lik PRP-4 grubunda (dondurma çözme ile aktive edilen PRP) olduğu belirlendi. Diğer PRP gruplarında hücre proliferasyonunun kontrole göre anlamlı derecede baskılandığı ($p < 0.001$) gözlemlendi (Tablo 3.10, Şekil 3.22).

Tablo 3.10. Farklı konsantrasyonlardaki PRP'nin AEH'ler üzerine etkileri. MTT ile proliferasyon ölçümü.

Hücre türü	% PRP	PRP Grubu	Proliferasyon X ± SE
AEH	%5 PRP	PRP-1	23.02 ± 2.79 ^{a*}
		PRP -2	41.33 ± 4.87 ^{b*}
		PRP -3	46.72 ± 2.66 ^{a*}
		PRP -4	75.01 ± 4.40 ^{ab*}
	%10 PRP	PRP-1	22.71 ± 2.79*
		PRP -2	46.40 ± 4.87 ^{a*}
		PRP -3	32.40 ± 2.66 ^{b*}
		PRP -4	23.17 ± 4.40 ^{ab*}
	%15 PRP	PRP-1	17.46 ± 2.79*
		PRP -2	33.99 ± 4.87*
		PRP -3	29.75 ± 2.66*
		PRP -4	36.28 ± 4.40*
	%20 PRP	PRP-1	5.54 ± 2.79*
		PRP -2	4.19 ± 4.87*
		PRP -3	2.78 ± 2.66*
		PRP -4	7.06 ± 4.40*
	10% FBS (kontrol)		100.00 ± 2.79*

Aynı harfler aynı konsantrasyondaki PRP'ler için istatistiki önemi gösterir (p<0.05) ;
* işareti %10 FBS'ye göre PRP'lerdeki istatistiki önemi belirtir (p<0.001).



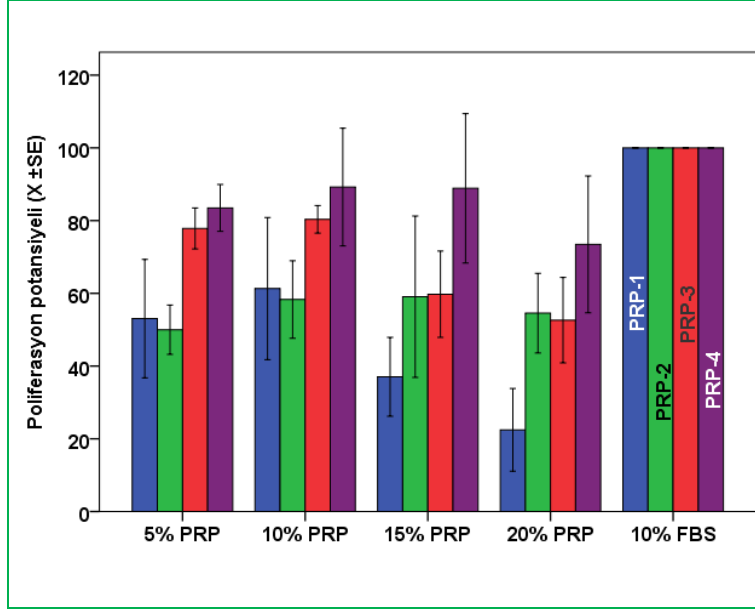
Şekil 3.22. Farklı konsantrasyonlardaki PRP'nin AEH'lerin proliferasyonu üzerine etkileri.

AMH'lerde PRP-4 grubunun tüm konsantrasyonlarında (%5, %10, %15, %20) en yüksek proliferasyon elde edildi. PRP-3 grubunda ise düşük konsantrasyonlarda (%5, %10) daha yüksek proliferasyon gözlemlendi. En düşük oranda proliferasyon ise taze kandan hazırlanan PRP-1 ve PRP-2 gruplarında elde edildi (Şekil 3.23). PRP-4 grubunda %5, %10 ve %15 konsantrasyonlardaki proliferasyon değerlerinin kontrol grubuna oldukça yakın olduğu ($p>0.05$), diğer PRP gruplarının tüm konsantrasyonlarında proliferasyon oranlarının önemli derecede baskılandığı ($p<0.001$) görüldü. Bununla birlikte, kontrol grubunun (%10 FBS) en yüksek proliferasyon oranına sahip olduğu belirlendi (Tablo 3.11).

Tablo 3.11. Farklı konsantrasyonlardaki PRP'nin AMH'ler üzerine etkileri. MTT ile proliferasyon ölçümü.

Hücre türü	% PRP	PRP Grubu	Proliferasyon X ± SE
AMH	%5 PRP	PRP-1	53.05±7.47 *
		PRP -2	49.99±6.95 ^{ab} *
		PRP -3	77.86±4.51 ^a *
		PRP -4	83.49±8.21 ^b
	%10 PRP	PRP-1	61.32±7.47 *
		PRP -2	58.30±6.95 ^a *
		PRP -3	80.34±4.51 ^a *
		PRP -4	89.25±8.21
	%15 PRP	PRP-1	37.05±7.47 ^a *
		PRP -2	59.07±6.95 *
		PRP -3	59.75±4.51 ^a *
		PRP -4	88.88±8.21
	%20 PRP	PRP-1	22.45±7.47 ^{abc} *
		PRP -2	54.55±6.95 ^a *
		PRP -3	52.62±4.51 ^b *
		PRP -4	73.47±8.21 ^c *
	10% FBS (control)		100.00±2.79 *

Aynı harfler aynı konsantrasyondaki PRP'ler için istatistiksel önemi gösterir ($p<0.05$)
* işareti %10 FBS'ye göre PRP'lerdeki istatistiksel farklılıkları belirtir ($p<0.001$).



Şekil 3.23. Farklı konsantrasyonlardaki PRP'nin AMH'lerin proliferasyonu üzerine etkileri.

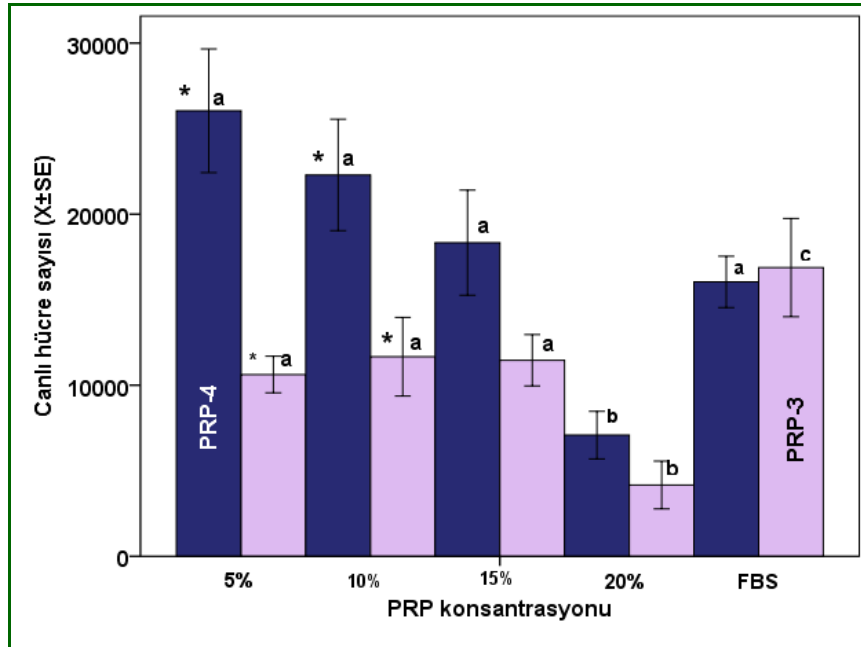
3.14. Hücre Sayımı ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

MTT sonuçlarımızda en iyi proliferasyon gösteren grupların dondurularak saklanan (PRP-3 ve PRP-4 grubu) gruplar oldukları belirlendi. Bu çalışmada iki grup arasından (PRP-3 ve PRP-4 grubu) en iyi proliferasyon gösteren PRP grubunu belirlemek amaçlandı. Dondurulup çözdürülen PRP (PRP-4) ve CaCl_2 ile aktive edilerek dondurulan PRP'nin (PRP-3) farklı konsantrasyonlarının kök hücrelerin proliferasyonu üzerine etkilerini belirlemek için hücre sayımı yapıldı. 24 kuyucuklu hücre kültürü plakasının her bir kuyucuğuna 7000 hücre ekildi, ardından 5 gün sonra tripsin ile muamele edilerek canlı hücreler sayıldı. AMH'lerde PRP-4 grubundaki, hem %5'lik hem de %10'luk konsantrasyonlardaki canlı hücre sayısının, PRP-3 grubuna göre istatistiki önemde yüksek olduğu saptandı ($p < 0.05$). Her iki PRP grubunun %20'lik konsantrasyonunda ise en az sayıda canlı hücre belirlendi ($p < 0.05$). Bununla birlikte, %5 konsantrasyonundaki PRP-4 grubunda en yüksek sayıda canlı hücre elde edildi (Şekil 3.24; Tablo. 3.12). PRP-4 grubunda %10 ve %15 PRP konsantrasyonlarının, %5'lik konsantrasyona oranla daha düşük sayıda bir hücre proliferasyonu göstermelerine karşın, aralarında istatistiki açıdan bir fark

bulunmamaktadır. Bunun aksine, CaCl_2 aktivasyonu ile dondurulan PRP grubunun (PRP-3) tüm konsantrasyonlarında, canlı hücre sayısının kontrole göre anlamlı oranda azaldığı belirlendi ($p < 0.05$).

Tablo 3.12. AMH'lerde farklı konsantrasyonlardaki PRP'nin hücre proliferasyonu üzerine etkisi.

AMH n=6	% PRP	Hücre sayısı X \pm SE
CaCl ₂ ile aktive edilen ve dondurulan PRP grubu (PRP-3)	%5 PRP	10625.00 \pm 535.22
	%10 PRP	11666.67 \pm 1148.67
	%15 PRP	11458.33 \pm 751.16
	%20 PRP	4166.67 \pm 697.22
	%10 FBS	16875.00 \pm 1434.33
Dondurulup-Çözdürülen PRP grubu (PRP-4)	%5 PRP	26041.67 \pm 1809.02
	%10 PRP	22291.67 \pm 1627.14
	%15 PRP	18333.33 \pm 1536.59
	%20 PRP	7083.33 \pm 697.22
	%10 FBS	16041.67 \pm 751.16



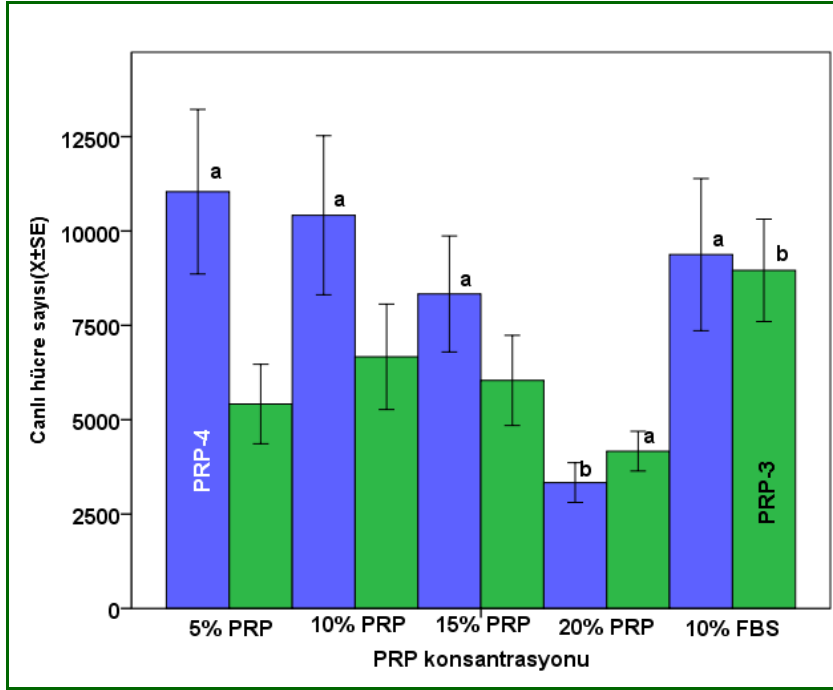
Şekil 3.24. AMH'lerde farklı konsantrasyonlardaki PRP'nin canlı hücrelerin proliferasyonu üzerine etkisi.

*= Farklı PRP gruplarının aynı konsantrasyonları arasında istatistiki önemi gösterir. Farklı harfler, Aynı PRP protokolünün farklı konsantrasyonları arasındaki istatistiki önemi gösterir ($p < 0.05$).

AEH'lerde de AMH'lere benzer sonuçlar gözlemlendi. Buna karşın elde edilen canlı hücre sayısı AMH'lerden oldukça düşük çıktı. PRP-4 grubunda, %5, %10 ve %15 konsantrasyonları arasında istatistiki fark olmamasına rağmen, %5'lik konsantrasyonda en yüksek sayıda canlı hücre elde edildi. %20'lik konsantrasyonda ise canlı hücre sayısı baskılandı ($p < 0.05$). PRP-3 grubunda ise istatistiki anlamda fark olmamasına karşın %5, %10 ve %15'lik konsantrasyonlarda canlı hücre sayısının kontrol grubuna göre az olduğu ve %20'lik konsantrasyonda ise canlı hücre sayısının baskılandığı ($p < 0.05$) belirlendi (Tablo 3.13, Şekil. 3.25).

Tablo 3.13. AEH'lerde farklı konsantrasyonlardaki PRP'nin hücre proliferasyonu üzerine etkisi.

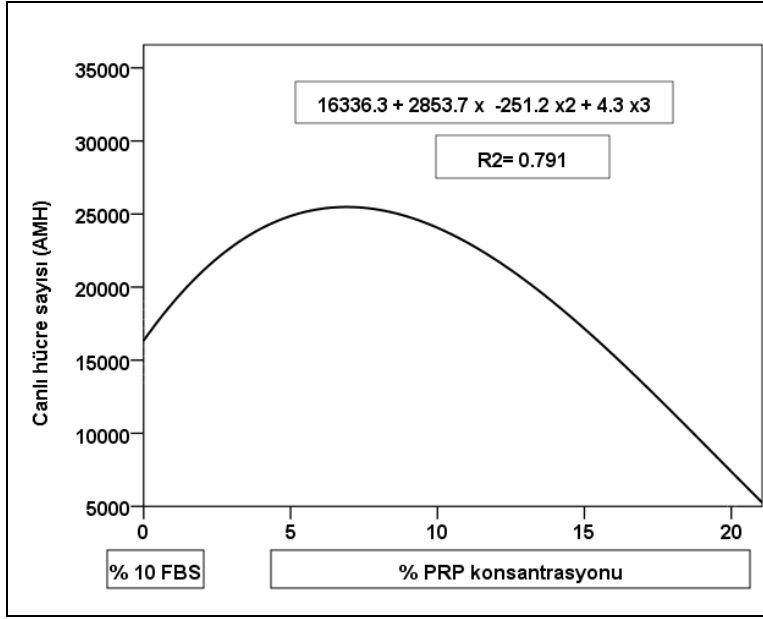
AEH n=6	% PRP	Hücre sayısı X ± SE
CaCl ₂ ile aktive edilen ve dondurulan PRP grubu (PRP-3)	%5 PRP	5416.67 ± 527.05
	%10 PRP	6666.67 ± 697.22
	%15 PRP	6041.67 ± 596.58
	%20 PRP	4166.67 ± 263.52
	%10 FBS	8958.33 ± 678.28
Dondurulup-Çözdürülen PRP grubu (PRP-4)	%5 PRP	11041.67 ± 1090.52
	%10 PRP	10416.67 ± 1054.09
	%15 PRP	8333.33 ± 768.30
	%20 PRP	3333.33 ± 263.52
	%10 FBS	9375.00 ± 1007.78



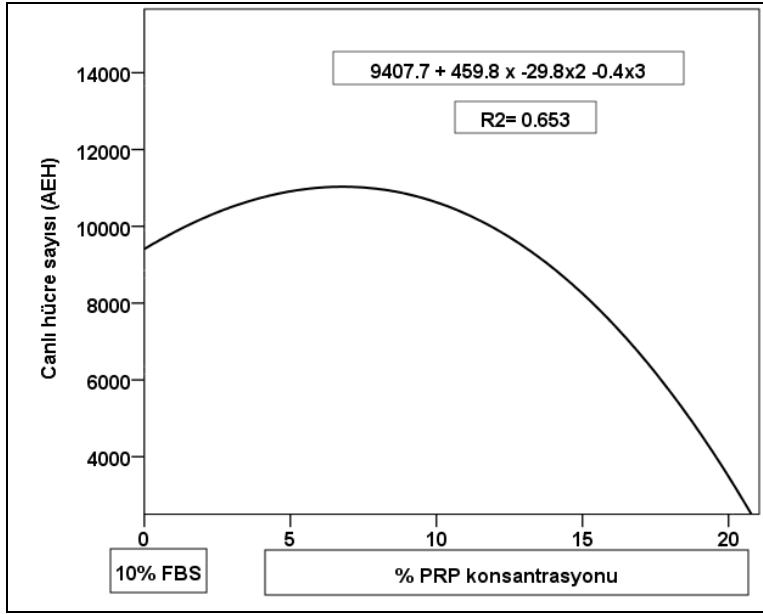
Şekil 3.25. AEH'lerde farklı konsantrasyonlardaki PRP'nin canlı hücrelerin proliferasyonu üzerine etkisi.

Farklı harfler, aynı PRP grubunun farklı konsantrasyonları arasında istatistiki önemi gösterir ($p < 0.05$).

PRP-4 grubunda, hücre çoğalması ile farklı konsantrasyonların ilişkisi incelendiğinde ise, AMH ve AEH'lerde genel linear regresyon analizi ile hücre çoğalması ve PRP konsantrasyonları arasında kuadratik (non-linear) ilişki bulundu. Bu ilişkiye göre, PRP'nin %5 konsantrasyonuna kadar hücre sayısı artarken, %5'den sonra PRP konsantrasyonu arttıkça hücre sayısının azaldığı belirlendi (Şekil 3.26-27).



Şekil 3.26. PRP-4 grubunda, farklı konsantrasyonların AMH proliferasyonuna etkisi.



Şekil 3.27. PRP-4 grubunda, farklı konsantrasyonların AEH proliferasyonu üzerine etkisi.

4. TARTIŞMA

4.1. Amniotik Membran Kaynaklı Epitel ve Mezenkimal Kök Hücreler

Çalışmamızda at amniotik membran kaynaklı epitel ve mezenkimal kök hücreler enzimatik yöntem ile elde edildi. Amniotik membran kaynaklı kök hücreler pasajlanarak çoğaltıldı ve çok yönlü farklılaşmaları yapıldı. Atların amniotik membranlarından elde edilen kök hücrelerin proliferasyon özellikleri ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Lange-Consiglio ve arkadaşlarının (2012) yaptıkları çalışma bulgularına benzer olarak çalışmamızda AEH hücrelerinin poligonal bir morfolojiye sahip oldukları; AMH hücrelerinin ise fibroblast benzeri bir morfoloji gösterdikleri saptandı. Bununla birlikte Coli ve arkadaşları (2011) bizim bulgularımızla uyumlu olarak ilk pasajlarda poligonal morfoloji sergileyen AEH hücrelerinin ilerleyen pasajlarda fibroblast benzeri bir morfoloji sergilediklerini bildirdiler.

4.2. İki Katına Çıkma Süresi

Çalışmamızda iki katına çıkma süreleri incelendiğinde AEH'lerin sekizinci pasajdan itibaren belirgin bir şekilde daha uzun sürede iki katı sayıya ulaştıkları görüldü. En hızlı proliferasyon ise dördüncü pasajda saptandı. AMH'lerde ise dokuzuncu pasajdan itibaren iki katına çıkma süresi belirgin bir şekilde daha yüksek ölçüldü ($p<0,05$). Ayrıca AMH'lerde dördüncü pasaj en kısa sürede hücrelerin iki katına çıktığı pasaj olarak belirlendi. Bu bulgular Lange-Consiglio ve arkadaşları'nın (2012) bulguları ile de benzerlik göstermektedir. Lange-Cosniglio ve arkadaşları (2012) çalışmalarında en yoğun proliferasyonun dördüncü ila altıncı pasaj aralığında görüldüğünü; altıncı pasajdan itibaren ise proliferasyonun yavaşladığını belirtmiştir. Yine aynı çalışmada AEH'lerin AMH'lere kıyasla daha yavaş proliferere oldukları belirtilmiş olup yaptığımız bu tez çalışmasında da benzer sonuçlar elde edildi. 2012'de atların amniotik sıvılarından, göbek kordon kanından ve Wharton jelinden elde edilen kök hücrelerinde sekizinci pasaja kadar güçlü bir proliferasyon gözleyen

Iacono ve arkadaşları (2012) tarafından da iki katına çıkma süresi bakımından benzer sonuçlar elde edildi. Coli ve arkadaşları (2011) ise, atlarda amnion kaynaklı kök hücrelerde onuncu pasajdan sonra hücrelerde yaşlanma görüldüğünü saptadılar. Atların amniotik mezenkimal hücrelerinde üçüncü ve beşinci pasajlarda daha yüksek proliferasyon saptandığını belirten Corradetti ve arkadaşları (2014) tarafından da benzer gözlemler bildirildi. İnsanlardan elde edilen amniotik kök hücrelerde de hücre proliferasyonunun altıncı pasaja kadar daha güçlü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Miki ve ark., 2010; Soncini ve ark., 2007). Atların kök hücre tedavilerinde kullanılabilecek en uygun hücrelerin 3. ila 6. pasajlar arasındaki AEH ve AMH'lerin olduğunu söyleyebiliriz.

4.3. Büyüme Eğrisi

Bu çalışmada üçüncü, beşinci ve yedinci pasajların üçünde de yapılan büyüme eğrisi grafiklerinde amniotik mezenkimal hücrelerin (0-24 saat), amniotik epitel hücrelere (0-48 saat) kıyasla daha kısa log fazına sahip oldukları saptandı. AMH'ler de plato fazı 6. ve 8. günler arasında gözlenirken, AEH'ler de 8. ve 10. günler arasında gözlendi. Dolayısıyla AMH'lerde proliferasyon AEH'lerden daha iyidir. Beşinci pasajdaki hücreler 3. ve 7. pasajlardan daha iyi çoğalma gösterdi. Bu durum çalışmadaki iki katına çıkma süresi analizini de desteklemektedir. Sonuçlarımız diğer çalışmaların (Corradetti ve ark., 2014; Lange-Consiglio ve ark., 2012; Lange-Consiglio ve ark., 2013) verileri ile de uyumludur.

4.4. Koloni Oluşturabilen Birim Analizi

Her iki tip hücre (AEH, AMH) için de birinci, üçüncü ve beşinci pasajda farklı yoğunluklarda hücre ekimi yapılarak hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri değerlendirildi. İki tip hücrede, ekilen hücre konsantrasyonu arttıkça koloni oluşturma yeteneklerinin de belirgin bir şekilde ($p<0,05$) arttığı görüldü. Öncesinde Lange-Consiglio ve arkadaşları (2012) tarafından amniotik epitel hücrelerde

santimetrekaireye 250 hücre ekildiğinde 226,66 hücre/koloni oluşturan birim (KOB) ve santimetrekaireye 500 hücre ekildiğinde 237,5 hücre/KOB ölçümleri ile uyumlu olarak çalışmamızda P1'de benzer değerler elde edilirken, P3 ve P5'te hücre/KOB değerinin P1'e göre azaldığı gözlemlendi. Bahsi geçen çalışmada amniotik mezenkimal hücrelerde ise santimetrekaireye 250 ve 500 hücre ekildiğinde sırasıyla 116,8 hücre/KOB ve 79,61 hücre/KOB sonuçları alındığı bildirildi. Bu sonuçlar da çalışmamızdaki P1'de elde ettiğimiz değerlerle uyumludur. P3 değerlerimiz daha düşükken, P5'teki 500 hücre ekiminde elde ettiğimiz hücre/ KOB değerinin daha yüksek olduğu belirlendi. Çalışmamızda koloni oluşturabilen birim analizinde amniotik epitel ve mezenkimal hücrelerde 3. pasajda, pasaj 1 ve 5'e oranla daha çok sayıda koloni görülürken bu kolonilerin az miktarda hücrenin bir araya gelerek oluşturulduğu gözlemlendi. Koloni oluşturma kabiliyetinin, hücre yoğunluğundaki artışa paralel olarak yükseldiği görüldü. Bu bulgular Bourzac ve arkadaşlarının (2010) atların kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerde pasaj 0 ve pasaj 1'de elde ettiği sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Lange-Consiglio ve arkadaşları (2012) ve Bourzac ve arkadaşları (2010) bu pozitif korelasyonu sıfırıncı ve birinci pasajda gösterirken, yaptığımız çalışmada atların amnionundan elde edilen kök hücrelerde birinci, üçüncü ve beşinci pasajlarda bu paralel artış belirlendi.

4.5. Yapışma Profili

Çalışmamızda AEH ile AMH'ler arasında hücrelerin plastik yüzeye tutunma (yapışma) özellikleri bakımından karşılaştırmaları yapıldı. Plastik yüzeye tutunma, kök hücrelerin düzgün bir şekilde gelişip proliferasyon olabilmesi için önemli faktörlerden birisidir. Yaptığımız çalışmada, üçüncü ve beşinci pasajlarda AEH'lerin yüzeye tutunma potansiyellerinde, AMH'lere göre belirgin bir üstünlük gözlemlendi. Yapışma profili bakımından epitel ve mezenkimal hücreler arasında karşılaştırmalı analiz ilk defa tarafımızdan yapıldı.

4.6. Çok Yönlü Farklılaşma

Çalışmamızda AEH ve AMH'lerin farklılaşma potansiyellerini göstermek üzere, spesifik farklılaştırma medyumlarında hücrelerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmaları yapıldı. Osteojenik farklılaşmada alizarin red boyaması ile ekstraselüler kalsiyum demonstrasyonu, adipojenik farklılaşmada Oil Red O boyaması ile adipositlere farklılaşan hücrelerde intraselüller yağ damlacıklarının varlığı, kondrojenik farklılaşmada ise alsian mavisi ile intrasellüler glikozaminoglikanlar gösterildi. Atlarda amniotik epitel hücreler (Lange-Consiglio ve ark., 2012), amniotik mezenkimal hücreler (Coli ve ark., 2011; Lange-Consiglio ve ark., 2012), amniyon sıvısı kaynaklı kök hücreler, göbek kordonu kanı kaynaklı kök hücreler (Barberini ve ark., 2014), wharton jeli kaynaklı kök hücreler (Iacono ve ark., 2012), kemik iliği kaynaklı kök hücreler (Barberini ve ark., 2014; Bourzac ve ark., 2010; Lange-Consiglio ve ark., 2013) ve yağ doku kaynaklı kök hücreler (Alipour ve ark., 2015; Barberini ve ark., 2014) gibi birçok kök hücre türünde benzer farklılaşma sonuçları bildirildi.

4.7. Nörosfer Oluşumu

AMH ve AEH'lerin, oval veya küresel sinir progenitör hücreleri olan nörosferleri oluşturma yeteneklerini görmek için lizin kaplı pleytler kullanıldı. Nörosferlerin olgunlaştıktan sonra üç boyutlu, küre benzeri yapılar halinde yüzmeye başladıkları görüldü. Bu bulgu Boia'nın (2012) köpek olfaktör mukozasının lamina epiteliyalis ve lamina propriyalarından elde edilen kök hücreler ile yaptığı çalışmanın nörosfer bulguları ile örtüşmektedir. Çalışmada elde ettiğimiz nörosferlerin 3. pasaja göre 7. pasajda daha fazla oluştuğu belirlendi.

4.8. PCR Analizi

Lange-Consiglio ve arkadaşlarının (2012) atların amnionundan elde edilen kök hücrelerde yaptıkları çalışmanın bulguları ile uyumlu olarak, gen ekspresyonu analizlerimiz sonucunda, AEH ve AMH'lerin CD 14, CD 44, Cd 73, CD 90, CD 105 gibi multipotent kök hücre markırlarının ekspresyonu bakımından pozitif sonuç verdiği görüldü. İmmunojenik MHC-II markırı CD 74 ekspresyonu ise negatifti. MHC-II ekspresyonunun negatif olması bu hücrelerin allojenik kullanımının önünü açması nedeniyle son derece önemlidir. Bulgularımızla uyumlu olarak farklı araştırmacılar da gen ekspresyon sonuçlarını bildirmişlerdir. Iacono ve arkadaşları (2012) atların amniotik sıvılarından elde edilen kök hücrelerinde, CD 73 gen ekspresyonunu göstermezken, CD 90, CD 105 ve CD 44 genlerinin pozitif ekspresyonlarını göstermiştir. Coli ve arkadaşları (2011)'da atların amniotik mezenkimal hücreleri üzerine yaptıkları araştırmadaki flow sitometri sonuçlarında CD 14, CD 44, CD 90, CD 105 ve CD 45 markırları bakımından pozitif sonuçlar bildirmişlerdir. Çalışmamızda multipotent markırların yanı sıra, SOX2 ve OCT3/4 gibi pluripotent markırlarında eksprese olması bu hücrelerin multipotentliğin ötesinde bir potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir. Bulgularımızla uyumlu olarak, Lange-Consiglio ve arkadaşları (2012)'da yaptıkları çalışmada atların amnionundan elde edilen hücrelerde OCT4'ün pozitif ekspresyonunu bildirmişlerdir. Atların amnion kaynaklı kök hücrelerinde OCT4 ekspresyonunun varlığına dair başka çalışmalar da mevcuttur (Coli ve ark., 2011; Corradetti ve ark., 2014). Bu bulgular, bazı araştırmacıların (Miki ve ark., 2005)'da önerdiği gibi, bu hücrelerin epiblastik hücreler olabileceği veya bu hücrelerin embriyonun trofoektoderm ve epiblast katmanlarından köken alıyor olabileceği (Vejlsted, 2010) ihtimallerini akla getirmektedir.

4.9. Atlarda Yüksek Sayıda Trombosit Elde Etme Protokolünün Belirlenmesi

PRP, kandaki trombositlerin santrifüjlenerek yüksek konsantrasyonlara çıkarılmasıyla elde edilen bir üründür. Textor (2011), PRP'nin tam kana oranla daha

yüksek konsantrasyonda trombosit içermesi gerektiğini; aksi halde elde edilen ürünün PRP olarak nitelendirilemeyeceğini belirtmektedir. Denediğimiz dört farklı protokolde de trombosit sayısının belirgin bir şekilde arttığı gözlemlendi. Atlarda PRP tanımı için trombosit konsantrasyonu aralığını belirten birkaç çalışma bulunmaktadır. Her ne kadar uygulanan dört protokolde de trombosit konsantrasyonu belirgin bir şekilde artsa da üç numaralı protokolde PRP hazırlamada en iyi sonuçlar elde edildi. Hessel ve arkadaşları (2015), atlarda yerçekimsel trombosit ayırıştırma sistemi ile $761 \times 10^9/L$; santrifüj ile $310.4 \times 10^9/L$ konsantrasyonunda trombosit elde etmiştir. Çalışmamızda üç numaralı protokol yöntemi ile belirgin bir şekilde ($p < 0,001$) yüksek trombosit konsantrasyonu ($717.17 \pm 43.34 \times 10^9/L$) elde edildi. Protokolümüzde $21.17 \pm 4.72 \times 10^9/L$ konsantrasyonunda akyuvar bulunmaktadır ve bu konsantrasyon Hessel ve arkadaşlarının (2015) elde ettiği değerler ile ($18.2 \times 10^9/L$) uyumludur. Atlarda PRP'yi, trombosit sayı aralığının oldukça geniş olduğu düşünüldüğünde, trombosit sayısına bakarak tanımlamak zor olmaktadır. Zuffova ve arkadaşları (2013), atlardan elde ettikleri PRP'de $490 \pm 188 \times 10^9/L$ konsantrasyonunda trombosit ve $184 \pm 1035 \times 10^9/L$ konsantrasyonunda lökosit bildirmektedir. Fontenot ve arkadaşları (2012) elde ettikleri PRP'nin, tam kandan 2,58 kat daha fazla trombosit içerdiğini belirtmektedir. Başka çalışmalarda ise at PRP'lerinde $304 \times 10^9/L$ (Giraldo ve ark., 2013), $221.4 \pm 60.3 \times 10^9/L$ (Jean-Claude Ionita, 2014) gibi daha düşük trombosit konsantrasyonları bildirilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız yöntemle tam kana göre yaklaşık 6 kat daha fazla sayıda trombosit elde edildi.

4.10. MTT ile Karşılaştırmalı Hücre Proliferasyon Analizi

Bu kolorimetrik analiz ile tetrazolyum bileşenlerinin kromojenik bir ürünü olan formazanın seviyesine göre hücrelerin metabolik aktivitesi ölçülmektedir. PRP, aktivasyondan sonra büyüme faktörlerince zengin haldedir. Çalışmamızda %5, %10, %15 ve % 20 olmak üzere dört farklı konsantrasyonda hazırlanan PRP'nin AEH ve AMH'lerin proliferasyonu üzerine olan etkileri değerlendirildi. Çalışmamızda AEH, ve AMH'lerde PRP-4 grubunda (Dondurma çözündürme ile aktive edilmiş) en iyi proliferasyon sonuçları elde edildi. AEH'lerde %5 PRP'nin, diğer PRP

konsantrasyonlarının tamamından daha iyi sonuç verdiği gözlemlendi. Diğer yandan %10 konsantrasyondaki PRP-2 grubunun, %5 değerinden sonraki en iyi sonuçları verdiği belirlendi. Elde ettiğimiz bulgular, Kakudo ve arkadaşlarının 2008'de insan yağ dokusu kaynaklı kök hücrelerinde yapmış olduğu, kalsiyum klorür ile aktive edilmiş %5 PRP'nin maksimum proliferasyon sağladığını bildirdikleri çalışma sonuçları ile örtüşmektedir. Kakudo ve arkadaşları (2008) çalışmalarında ayrıca %20 PRP'nin proliferasyonu arttırmadığı sonucunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda %20 PRP içeren hem kalsiyum klorür ile aktive edilen hem de dondurma çözündürme ile aktive edilen gruplarda elde ettiğimiz düşük proliferasyon bulguları da bu çalışma sonuçları ile uyum içerisindedir. Bazı araştırmacılar PRP'nin proliferasyon üzerine doza bağlı etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. Li ve arkadaşları (2013), %10 konsantrasyonda trombin ile aktive edilmiş PRP ile, %20 FBS ile kültüre edilen insan iskelet kası progenitör hücreleri arasında benzer etkilerin olduğunu göstermiştir. Kakudo ve arkadaşları (2008) ise, insan yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerinde ve insan dermal fibroblastlarında doza bağlı olarak hücre proliferasyonunun değiştiğini bildirmektedir. Van Pham ve arkadaşları (2013), yaptıkları araştırmada insan yağ dokusu kaynaklı kök hücrelerinde %10 FBS ile %15 PRP'yi karşılaştırdıklarında, PRP'nin daha iyi proliferasyon sağladığını göstermişlerdir. Del Bue ve arkadaşları (2007), atların yağ dokusu kaynaklı kök hücrelerinde %3,125 ve üzeri konsantrasyonda trombosit lizatinin hücre çoğalmasında belirgin bir etkisinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Yaptığımız çalışmada, AEH ve AMH'lerde 5% konsantrasyonda PRP-3 ve PRP-4 gruplarının (dondurup çözündürme grupları), PRP-1 ve PRP-2 gruplarına (taze kan grupları) göre belirgin derecede daha yüksek proliferasyon sağladığı belirlendi ($p<0,05$). %15 konsantrasyonda ise AEH ve AMH'lerde PRP-4 grubu, diğer gruplara göre daha yüksek proliferasyon sağlarken; %20 konsantrasyonun ise bütün PRP tiplerinde en düşük proliferasyon ile sonuçlandığı görüldü. Elde edilen bulgular ile hücre proliferasyonunda daha başarılı sonuçlar elde etmek için AEH'lerde %5 PRP, AMH'lerde ise %5, %10 ve %15 PRP kullanımının önemli olduğu sonucuna varıldı.

4.11. Hücre Sayımı ile Karşılaştırmalı Hücre Proliferasyonu

MTT bulgularımızda AEH ve AMH'lerde en iyi proliferasyonun dondurma çözündürme gruplarında olduğu belirlendikten sonra iki dondurma çözündürme grubu olan kalsiyum klörür ile aktive edildikten sonra dondurulan PRP grubu (PRP-3) ile dondurma çözündürme yöntemi ile aktive edilen PRP grubunun (PRP-4) farklı konsantrasyonlarının (%5, %10, %15 ve %20) hücre çoğalmasına etkileri incelendi. Kontrol grubuna göre istatistiki anlamda önem olmasa da, AEH ve AMH'lerde PRP-4 grubunun %5 PRP konsantrasyonlarında en yüksek oranda proliferasyon belirlendi. AEH ve AMH'lerde %5, %10 ve %15 PRP konsantrasyonlarında PRP-4 grubundaki proliferasyon oranı, PRP-3 grubundan daha yüksekti. Her iki tip hücrede de %20 PRP'de canlı hücre sayısı tüm gruplarda belirgin bir şekilde düşük gözlemlendi ($p<0,05$). Diğer yandan, PRP-3 grubunda AEH ve AMH'lerde, %5, %10 ve %15 konsantrasyondaki PRP'nin, kontrol grubuna göre anlamlı oranda proliferasyonu baskılandığı belirlendi.

Kakudo ve arkadaşları (2008), insan yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerinde ve insan dermal fibroblastlarda kalsiyum klörür ile aktive edilen %5 PRP ile kültüre edilen hücrelerin tam kan ve aktive edilmemiş PRP'ye göre canlı hücre sayısında belirgin bir şekilde ($p<0,05$) 2,5-3 katı daha yüksek sonuçlar elde etmişlerdir. Aynı çalışmada %10 PRP konsantrasyonunun daha düşük proliferasyon sağladığı gösterilmiştir. Cho ve arkadaşlarının (2011) çalışmasına göre, insan mezenkimal kök hücrelerinde %10 PRP; %1, %3 ve %30 PRP konsantrasyonlarına göre daha iyi proliferasyon sağlamıştır. Bu konuda bazı araştırmacıların sonuçları ise bizim bulgularımıza göre farklı sonuçlar vermiştir. Örneğin Kurita ve arkadaşları (2008), insan yağ dokusu kaynaklı kök hücreler ve insan fibroblastlarında %10 PRP'nin %5 PRP'ye oranla daha iyi sonuçlar verdiğini bildirmiştir.

Kakudo ve arkadaşları (2008), hem insan yağ dokusu kaynaklı kök hücrelerde, hem de dermal fibroblastlarda kalsiyum klörür ile aktive edilmiş %5 konsantrasyonundaki PRP'nin proliferasyona etkisinin günden güne belirgin bir şekilde daha iyiye gittiğini göstermişlerdir. Yazar ayrıca %20 PRP

konsantrasyonunda en düşük çoğalma verilerini elde etmiştir. Kocaoemer ve arkadaşları (2007), insan yağ dokusu kaynaklı kök hücrelerde trombin ile aktive edilmiş %10 konsantrasyondaki PRP'nin fötal buzağı serumuna kıyasla daha iyi çoğalma kinetikleri gösterdiğini ($p<0,05$) bildirmiştir. Çalışmamızda araştırmacıların sonuçlarıyla uyumlu olarak, dondurma çözündürme yöntemiyle aktive edilen %5 PRP'nin her iki kök hücre türünde de en yüksek oranda proliferasyonu sağladığı, bunun yanında PRP konsantrasyonu yükseldikçe, proliferasyonun azaldığı belirlendi.

4.12. Farklı Yöntemlerle Hazırlanan PRP'lerde EGF Değerleri

Çalışmamızda PRP gruplarında ELİSA ile EGF ölçümü yapıldı. Yapılan ölçümde en yüksek değerler PRP-3'te alınırken onu PRP-4'ün takip ettiği görüldü. PRP grupları arasında belirgin bir fark görülmedi. Atlarda EGF'nin ölçümü ve normal konsantrasyonu hakkında oldukça sınırlı bilgi bulunmaktadır. Arterioocyte Medical Systems firması 2013'te at PRP'sinde EGF miktarını 163.3 ± 49.4 ng/L olarak ölçmüştür. Bu konsantrasyon, çalışmamızda elde edilen bulgulardan düşüktür. Bunun yanı sıra Anitua ve arkadaşları (2005), $470\pm 75.02\times 10^6$ /ml trombosit konsantrasyonundaki insan PRP'sinde yaptıkları ölçümde EGF konsantrasyonunu 442.50 ± 37.05 ng/L olarak ölçmüşlerdir. Rauch ve arkadaşları (2011) ise 15000×10^6 /mL trombosit içeren insan PRP'sinde 18340 ng/L konsantrasyonunda EGF ölçmüşlerdir. Bazı başka araştırmalarda ise insanlarda 188 ± 11 /ml trombosit konsantrasyonunda 265 ng/L gibi daha düşük konsantrasyonlarda EGF sonuçları elde etmişlerdir (Jeanne Adiwinata, 2012; Kurita ve ark., 2008). Elde ettiğimiz sonuçlarda gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır. Bu sonuçlarla, EGF'nin trombosit aktivasyonunu belirlemede bir kriter olarak değerlendirilemeyeceği sonucuna varıldı.

4.13. Farklı Yöntemlerle Hazırlanan PRP'lerde PDGF Değerleri

Yaptığımız çalışmada dondurma çözündürme ile aktive edilmiş PRP'nin (PRP-4) en yüksek PDGF-BB değerlerine (5489.80 ± 575.60 ng/L) sahip olduğu görüldü. Bu

bulgular, Hessel ve arkadaşlarının (2015), $761.0 \pm 240.0 \times 10^6$ trombosit/ml konsantrasyonundaki PRP'nin dondurma çözündürme ile aktivasyonu sonrasında elde ettikleri 5160 ± 1120 ng/L PDGF-BB bulgusu ile paralellik göstermektedir. Ancak birçok araştırmacı tarafından daha düşük konsantrasyonlar da saptanmıştır. Hauschild ve arkadaşları (2017), 327×10^6 trombosit/ml konsantrasyonundaki PRP'den 3569 ± 1597.23 ng/L PDGF-BB konsantrasyonu elde etmişlerdir. Giraldo ve arkadaşları (2013), PRP'de (327×10^6 trombosit/ml) 1259.7 ± 418.6 ng/L ;PPP'de ise 601.8 ± 339.3 ng/L PDGF-BB konsantrasyonu elde ettiklerini bildirmektedir. Atlar üzerine yapılan başka bir çalışmada ise, PRP'de ($221.4 \pm 60.3 \times 10^6$ trombosit/ml) 3630 ± 1160 ng/L PDGF-BB konsantrasyonu bulunmuştur (Jean-claude Ionita ve ark., 2014). Bu farklılıklar, hazırlanan PRP'lerdeki trombosit sayılarının farkından kaynaklanıyor olabileceği gibi aktivasyon sonrasında trombositlerin α granüllerinden daha fazla büyüme faktörünün salgılanmasından da kaynaklanıyor olabilir. Jean-claude Ionita ve arkadaşları (2014) PDGF-BB'nin belirgin bir şekilde trombosit sayısı ile doğru orantılı olduğunu bildirmektedir. Yaptığımız çalışmada PRP-3'ün daha düşük PDGF-BB konsantrasyonuna sahip olduğu görüldü. Dondurma çözündürme ile yapılan aktivasyonun, en yüksek konsantrasyonda PDGF salgılanmasına neden olduğu sonucuna varıldı. Fakat büyüme faktörleri ve aktivasyon ilişkisinin belirlenebilmesi için PRP aktivasyon metodları alanında daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

5. SONUÇ

1- Morfoloji ve Fiziksel Karakteristik Özellikler

Amniotik epitel kaynaklı kök hücreler primer kültürde poligonal morfolojide gözlemlendi. Amniotik mezenkimal kök hücreler ise fibroblast benzeri bir morfolojiye sahipti. Bununla birlikte diğer pasajlarda (P2'den P10'a) hücreler fibroblast benzeri morfolojide gözlemlendi. Her iki hücre tipi de plastik yüzeye yapışma bakımından başarılı olsa da amniotik epitel hücrelerin P3 ve P5'te bu konuda daha iyi olduğu görüldü.

2- İki Katına Çıkma Süresi, Büyüme Eğrisi ve Koloni Oluşturma Yeteneği

Her iki hücre grubunda da proliferasyon potansiyeli birbirine paralel gözlemlendi. Dördüncü pasajdaki hücreler, en kısa iki katına çıkma süresi ile en yüksek mitoz kabiliyetindeki hücreler olarak göze çarparken 3. ile 6. pasaj arasındaki hücrelerde de yakın sonuçlar elde edildi. Her iki hücre tipinde de beşinci pasajın en iyi çoğalma kinetiklerine sahip olduğu ortaya kondu. Büyüme eğrisi analizinde her iki hücre tipinin de onuncu güne kadar çoğalmaya devam ettiği; çoğalma yavaşlamadan önce 8. ile 10. günler arasında daha iyi çoğalmanın olduğu görüldü. Koloni formasyonunun her zaman ekilen hücre sayısı ile pozitif ilişkide olduğu ve iki hücre tipi için de üçüncü pasajdaki hücrelerin bu konuda daha başarılı olduğu gözlemlendi.

3- Farklılaşma Potansiyeli

Amnion kaynaklı kök hücreler çok yönlü farklılaşma potansiyeline sahiptir. Bu özelliklerinden yararlanarak hücrelerde osteojenik, adipojenik, kondrojenik farklılaşma çalışmaları yapılarak her iki hücre tipinin de multipotent karakterleri saptandı. Bunlara ek olarak her iki hücre tipinde de nörosfer eldesi gerçekleştirildi.

4- PCR Analizi

AEH ve AMH'lerde yapılan PCR analizlerinde pluripotent markırlar olan OCT3/4 ve SOX2 ekspresyonlarının varlığı ile bu hücrelerin multipotent özelliklerden fazlasına sahip oldukları görüldü. Yapılan analizlerde hemopoietik kök hücre markırını CD 45 negatif gözlandı. Hücreler mezenkimal markırlar olan CD 73, CD 90 ve CD 105 bakımından; metastatik kök hücre belirteci CD 44 bakımından ve non-malignant kök hücre belirteci CD 14 bakımından pozitif ekspresyon gösterdi. MHC-II belirteci CD 74 her iki hücre tipinde de negatif sonuç verdi. Bu bulgular çalışmada kullanılan hücrelerin allojenik uygulamalar için kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

5- Trombosit Elde Etme Protokolü

Toplanan trombosit sayısı bakımından başarılı sonuçlar elde edildi. Kullanılan çifte santrifüj tekniği ile önce 1000 rpm'de 10 dakika; sonrasında 3000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenen kandan, taze kana oranla yaklaşık 6 kat daha fazla trombosit elde edildi (Taze kanda $122.42 \pm 5.81 \times 10^9/L$; protokol sonrası $717.17 \pm 43.34 \times 10^9/L$). Bu protokolün, at kanlarından PRP hazırlamada oldukça etkili bir yöntem olduğu sonucuna varıldı.

6- Karşılaştırmalı MTT Analizi

MTT analizlerinin sonuçları ile dondurma çözündürme yöntemi ile aktive edilen (PRP-4) %5 PRP içeren grubun diğer PRP gruplarına göre AEH'lerde yüksek proliferasyon sağladığı görüldü. AMH'lerde ise yine PRP-4 grubunda %5, %10 ve %15 konsantrasyonu ile en yüksek proliferasyon elde edildi. Bununla beraber, dondurma çözündürme yöntemi ile aktive edilen ve kalsiyum klorür ile aktive edilen dondurulmuş PRP'nin, taze inaktif PRP ve kalsiyum klorür ile aktive edilmiş taze PRP'ye göre daha iyi sonuçlar sağladığı ortaya kondu.

7- Canlı hücre sayımı ve PRP konsantrasyonu

En iyi proliferasyonu sağlayan PRP-3 ve PRP-4 gruplarında hücre sayımı ile proliferasyon sonuçları değerlendirildi. Yapılan canlı hücre sayımı ile AMH ve AEH'lerde %5 konsantrasyonda dondurma çözme ile aktive edilmiş PRP'nin (PRP-4) en yüksek hücresel proliferasyonu sağladığı görüldü. %5, %10 ve %15 konsantrasyonlarda kullanılan PRP ile elde edilen proliferasyon oranları birbirine yakınken, PRP konsantrasyonu yükseldikçe, proliferasyonun azaldığı belirlendi. %20 konsantrasyonda PRP kullanımının ise her iki hücre tipinde de hücre çoğalmasını baskıladığı görüldü.

Bu sonuçlar ile en iyi kök hücre proliferasyonu için, %5 konsantrasyonda dondurma çözme ile aktive edilen PRP'nin en ideal seçenek olduğu ortaya kondu.

ÖZET

Amniotik Membran Kaynaklı Kök Hücreleri Üzerine Trombositten Zengin Plazmanın Etkisi

Kök hücreler gelişen teknoloji ile birlikte biyomedikal alanında oldukça önemli bir tedavi aracı haline gelmiştir. Amniotik membran, kök hücre kaynakları arasında daha az immunojenite ve multipotentten daha yüksek potansiyelleri ile önemli bir kaynaktır. Bu çalışmada atların amniotik membranından elde edilen kök hücreler izole edilerek, kültüre edildi ve onuncu pasaja kadar çoğaltıldı. Bununla beraber hücreler üzerinde adipojenik, osteojenik, kondrojenik farklılaşmalar ve nörosfer oluşumu çalışmaları yapıldı. İki katına çıkma süresi analizi ile üçüncü pasaj ile altıncı pasaj arasında hücre çoğalmalarının daha güçlü olduğu ve dördüncü pasajda hem epitel (AEH) hem de mezenkimal hücrelerde (AMH) çoğalmanın en yüksek olduğu belirlendi. Büyüme eğrisi analizinde AEH ve AMH'lerde beşinci pasajın en iyi büyüme kinetiği özelliğini sergilediği görüldü. At kanından yüksek konsantrasyonda ($717.17 \pm 43.34 \times 10^9/L$) trombosit içeren PRP hazırlanışı için çift santrüfüjlü bir teknik geliştirildi. Çalışmada, taze ve inaktif (PRP-1), taze ve $CaCl_2$ ile aktive edilen (PRP-2), $CaCl_2$ ile aktive edildikten sonra dondurulan (PRP-3) ve dondurma çözme işlemi ile aktive edilen (PRP-4) dört grup PRP kullanıldı. Çalışmada PRP grupları arasında belirgin bir fark olmaksızın yüksek konsantrasyonda Epidermal büyüme faktörü (EGF) gözlemlendi. PRP-4 grubunda en yüksek konsantrasyonda Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) saptandı. MTT analizi ile hem AEH hem de AMH'de dondurma çözme ile aktive edilen PRP'nin (PRP-4) daha iyi çoğalma sağladığı ortaya kondu. Canlı hücre sayımı da dondurma çözme ile aktive edilen PRP'nin (PRP-4) daha iyi hücre proliferasyonunu sağladığını gösterdi. Farklı dozlardaki PRP kullanımlarında, dondurma çözme ile aktive edilen %5 PRP konsantrasyonunun hem AEC hem de AMC'lerde bütün analizlerde hücre çoğalmasını arttırdığı belirlenirken, %10 ve %15 PRP konsantrasyonları ile de yakın sonuçlar elde edildi. Farklılaşma çalışmalarında iki tip hücre de başarı ile osteojenik, adipojenik ve kondrojenik hücrelere farklılaştırıldı; bu farklılaşmalar alizarin red boyaması, Oil Red O boyaması ve alsian mavisi boyaması ile gösterildi. Nörosfer oluşumunda iki tip hücrenin de küre benzeri, üç boyutlu sinir

doku progenitör hücreleri oluşturabilme yeteneğinde olduğu gözlemlendi. PCR analizinde pluripotent hücre belirteçleri olan SOX2 ve OCT3/4'te oldukça güçlü ekspresyon gözlemlendi. Hem AMH hem de AEH'lerde P0, P3, P5 ve P7'de multipotent kök hücre belirteçleri CD14, CD44, CD73, CD90 ve CD105 ekspresyonları iyi seviyede gözlemlendi. Hemotopoetik hücre belirteci CD45 iki tip hücre için de negatif bulundu. Ayrıca MHC-II belirteci (CD74) de her iki hücre tipinde negatifti. Bu sonuçlar, hem pluriopotent hem de multipotent kök hücre karakterizasyonu gösteren amnion membranından elde edilen kök hücrelerinin, allojenik uygulamalar için kullanılabilir önemli bir kök hücre kaynağı olduklarını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Amniotik Membran Kaynaklı Kök Hücre, PRP, PDGF, EGF, At

SUMMARY

The Effect of Platelet Rich Plasma on Amniotic Membrane Derived Stem Cells

Stem cells become very important apparatus in this cutting edge technology in the field of biomedical science. Amniotic membrane is one of the vital sources of stem cells that give the cells with lesser immunogenicity having the strength more than multipotency. Thus equine amniotic membrane derived stem cells were isolated, cultured and propagated till passages ten. Along with these osteogenic, adipogenic, chondrogenic differentiation as well as neurospheres formation were also performed. In proliferative study, doubling time revealed that passage three (P3) to passage six (P6) had the higher growth and passage four (P4) was the highest proliferation in both epithelial (AEC) and mesenchymal stem cells (AMC). In AECs and AMCs, growth curve analysis showed that passage five (P5) was the best for growth kinetics properties. A handy double centrifuged laboratory technique was developed to yield a PRP from horse blood with higher platelets ($717.17 \pm 43.34 \times 10^9/L$) concentration. Four types of PRP was made such as fresh and inactivated (PRP-1), fresh and $CaCl_2$ activated (PRP-2), stored and $CaCl_2$ activated (PRP-3) as well as stored and freeze-thaw activated (PRP-4). Epidermal Growth Factor (EGF) concentration was recorded in higher concentration having without any significant difference among different types of PRPs. Platelet-derived growth factor (PDGF) concentration was the highest in the freeze-thaw activated PRP. MTT procedure showed that PRP activated by freezing-thawing method (PRP-4) was related with higher propagation of both AECs and AMCs. Viable cells counting also favoured the freeze-thaw activated PRP (PRP-4) in terms of growth of cells. In case of different dosages of PRP, 5% concentration of freeze-thaw PRP had over all improved relation with all cellular growth indexes for both AECs and AMCs although 10% and 15% concentration of PRP had the close results. In differentiation study both types of stem cells were successfully differentiated into osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineage that were confirmed by alizarin red stain, Oil Red O stain and alcian blue stain, respectively. In neurospheres generation, both cells proved their ability to produce progenitor cells

for nerve tissue by creating well defined, spheroid, three dimensional structures. In PCR analysis, strong expression of two pluripotent markers (SOX 2 and OCT 3/4) was recorded. Besides these, multipotent stem cell markers like CD 14, CD 44, CD 73, CD 90 and CD 105 had good expression in this study (P0, P3, P5 and P7) for AECs and AMCs. On the contrary hemopoietic cell marker (CD 45) was negative for both cell types. In addition, MHC-II marker (CD 74) had also negative. These results have shown that the amniotic membrane derived stem cells which have both of multipotent and pluripotent characteristics are an important source of stem cells for allogenic treatments.

Key words: Amniotic Membrane Derived Stem Cell, PRP, PDGF, EGF, Horse

KAYNAKLAR

- ALIPOUR, F., PARHAM, A., KAZEMI MEHRJERDI, H., DEHGHANI, H. (2015). Equine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotype and Growth Characteristics, Gene Expression Profile and Differentiation Potentials. *Cell Journal (Yakhteh)*, **16(4)**: 456-465.
- ALSOUSOU, J., THOMPSON, M., HULLEY, P., NOBLE, A., WILLETT, K. (2009). The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery. *A review of the literature*, **91-B(8)**: 987-996. doi: 10.1302/0301-620x.91b8.22546
- ANITUA, E., ANDÍ, I., SANCHEZ, M., AZOFRA, J., DEL MAR ZALDUENDO, M., DE LA FUENTE, M., NURDEN, P., NURDEN, A. T. (2005). Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *Journal of Orthopaedic Research*, **23(2)**: 281-286. doi: 10.1016/j.orthres.2004.08.015
- ANITUA, E., ANDIA, I., ARDANZA, B., NURDEN, P., NURDEN, A. T. (2004). Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis*, **91(1)**: 4-15. doi: 10.1160/th03-07-0440
- ARGÜELLES, D., CARMONA, J. U., CLIMENT, F., MUNOZ, E., PRADES, M. (2008). Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. *Veterinary Record*, **162**. doi: 10.1136/vr.162.7.208
- ARGÜELLES, D., CARMONA, J. U., PASTOR, J., IBORRA, A., VIÑALS, L., MARTÍNEZ, P., BACH, P., PRADES, M. (2006). Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Research in Veterinary Science*, **81**. doi: 10.1016/j.rvsc.2005.12.008
- ARTERIOCYTE MEDICAL SYSTEMS, A. (2013). Discover the quality of Magellan® TruPRP™. <http://www.discovertruprp.com/>, from Arterioocyte Medical Systems, Inc. USA

- ASSOIAN, R. K., KOMORIYA, A., MEYERS, C. A., MILLER, D. M., SPORN, M. B. (1983). Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, **258(11)**: 7155-7160.
- BANKS, R. E., FORBES, M. A., KINSEY, S. E., STANLEY, A., INGHAM, E., WALTERS, C., SELBY, P. J. (1998). Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *British Journal of Cancer*, **77(6)**: 956-964.
- BANKS, W. J. (1993). *Applied veterinary histology* (Third edition ed.). USA: George Stamathis.
- BARBERINI, D. J., FREITAS, N. P. P., MAGNONI, M. S., MAIA, L., LISTONI, A. J., HECKLER, M. C., SUDANO, M. J., GOLIM, M. A., da CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F., AMORIM, R. M. (2014). Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Research & Therapy*, **5(1)**: 25-25. doi: 10.1186/srct414
- BOIA, S. D. (2012). *Establishing stem cell based systems to study neuropathologies*. Master's thesis (Master's in molecular biomedicine), University of Aveiro, Aveiro, Portugal.
- BORDIN, J. O., HEDDLE, N. M., BLAJCHMAN, M. A. (1994). Biologic effects of leukocytes present in transfused cellular blood products. *Blood*, **84(6)**: 1703-1721.
- BORRIONE, P., GIANFRANCESCO, A. D., PEREIRA, M. T., PIGOZZI, F. (2010). Platelet-Rich Plasma in Muscle Healing. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, **89(10)**: 854-861. doi: 10.1097/PHM.0b013e3181f1c1c7
- BOSCH, G., VAN SCHIE, H. T. A., DE GROOT, M. W., CADBY, J. A., VAN DE LEST, C. H. A., BARNEVELD, A., VAN WEEREN, P. R. (2010b). Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebo-controlled experimental study. *Journal of Orthopaedic Research*, **28**.

- BOSWELL, S. G., COLE, B. J., SUNDMAN, E. A., KARAS, V., FORTIER, L. A. (2012). Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy*, **28(3)**: 429-439. doi: 10.1016/j.arthro.2011.10.018
- BOUDREAUX, M. K., EBBE, S. (1998). Comparison of platelet number, mean platelet volume and platelet mass in five mammalian species. *Comparative Haematology International*, **8(1)**: 16-20. doi: 10.1007/bf02628099
- BOURZAC, C., SMITH, L. C., VINCENT, P., BEAUCHAMP, G., LAVOIE, J. P., LAVERTY, S. (2010). Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Veterinary Journal*, **42(6)**: 519-527. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00098.x
- BREDERLAU, A., CORREIA, A. S., ANISIMOV, S. V., ELMI, M., PAUL, G., ROYBON, L., MORIZANE, A., BERGQUIST, F., RIEBE, I., NANNMARK, U., CARTA, M., HANSE, E., TAKAHASHI, J., SASAI, Y., FUNA, K., BRUNDIN, P., ERIKSSON, P. S., LI, J.-Y. (2006). Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cells to a Rat Model of Parkinson's Disease: Effect of In Vitro Differentiation on Graft Survival and Teratoma Formation. *Stem Cells*, **24(6)**: 1433-1440. doi: 10.1634/stemcells.2005-0393
- CAPLAN, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, **9(5)**: 641-650. doi: 10.1002/jor.1100090504
- CASTELIJNS, G., CRAWFORD, A., SCHAFFER, J., ORTOLANO, G. A., BEAUREGARD, T., SMITH, R. K. W. (2011). Evaluation of a filter-prepared platelet concentrate for the treatment of suspensory branch injuries in horses. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, **24**. doi: 10.3415/vcot-11-01-0001
- CASTILLO, T. N., POULIOT, M. A., KIM, H. J., DRAGOO, J. L. (2011). Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *American Journal of Sports Medicine*, **39(2)**: 266-271. doi: 10.1177/0363546510387517
- CHO, H. S., SONG, I. H., PARK, S. Y., SUNG, M. C., AHN, M. W., SONG, K. E. (2011). Individual variation in growth factor concentrations in platelet-rich

- plasma and its influence on human mesenchymal stem cells. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, **31(3)**: 212-218. doi: 10.3343/kjlm.2011.31.3.212
- CHO, J. W., KIM, S. A., LEE, K. S. (2012). Platelet-rich plasma induces increased expression of G1 cell cycle regulators, type I collagen, and matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, **29(1)**: 32-36. doi: 10.3892/ijmm.2011.803
- CHU, C. R., SZCZODRY, M., BRUNO, S. (2010). Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Engineering Part B Review*, **16(1)**: 105-115. doi: 10.1089/ten.TEB.2009.0452
- COLI, A., NOCCHI, F., LAMANNA, R., IORIO, M., LAPI, S., URCIUOLI, P., SCATENA, F., GIANNESI, E., STORNELLI, M. R., PASSERI, S. (2011). Isolation and characterization of equine amnion mesenchymal stem cells. *Cell Biology International Report (2010)*, **18(1)**: e00011. doi: 10.1042/cbr20110004
- CORRADETTI, B., CORREANI, A., ROMALDINI, A., MARINI, M. G., BIZZARO, D., PERRINI, C., CREMONESI, F., LANGE-CONSIGLIO, A. (2014). Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal Cells and Their Conditioned Media: Potential Candidates for Uterine Regenerative Therapy in the Horse. *PloS One*, **9(10)**: e111324. doi: 10.1371/journal.pone.0111324
- CROVACE, A., LACITIGNOLA, L., ROSSI, G., FRANCIOSO, E. (2010). Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. *Veterinary Medicine International*, **2010**: 250978. doi: 10.4061/2010/250978
- DATTENA, M., PILICHI, S., ROCCA, S., MARA, L., CASU, S., MASALA, G., . . . CAPPALÀ, P. (2009). Sheep embryonic stem-like cells transplanted in full-thickness cartilage defects. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **3(3)**: 175-187. doi: 10.1002/term.151
- DAVENPORT, R. D., KUNKEL, S. L. (1994). Cytokine roles in hemolytic and nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion Medicine Reviews*, **8(3)**: 157-168.

- DE MATTOS CARVALHO, A., ALVES, A. L. G., DE OLIVEIRA, P. G. G., CISNEROS ÁLVAREZ, L. E., AMORIM, R. L., HUSSNI, C. A., DEFFUNE, E. (2011). Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines *Journal of Equine Veterinary Science* , **31**: 26-34.
- DEL BUE, M., RICCÒ, S., CONTI, V., MERLI, E., RAMONI, R., GROLLI, S. (2007). Platelet Lysate Promotes in Vitro Proliferation of Equine Mesenchymal Stem Cells and Tenocytes. *Veterinary Research Communications*, **31(1)**: 289-292. doi: 10.1007/s11259-007-0099-z
- DELONG, J. M., RUSSELL, R. P., MAZZOCCA, A. D. (2012). Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy*, *28(7)*: 998-1009. doi: 10.1016/j.arthro.2012.04.148
- DEROSSI, R., COELHO, A. C., MELLO, G. S., FRAZILIO, F. O., LEAL, C. R., FACCO, G. G., BRUM, K. B. (2009). Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Acta Cirurgica Brasileira*, **24(4)**: 276-281.
- DIMOND, L. (1914). Blood Platelets in the Treatment of Disease. *British Medical Journal*, **2(2)**: 828-829.
- DOHAN EHRENFEST, D. M., RASMUSSEN, L., ALBREKTSSON, T. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*, **27(3)**: 158-167. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.11.009
- EL BACKLY, R. M., ZAKY, S. H., MURAGLIA, A., TONACHINI, L., BRUN, F., CANCIANI, B., CHIAPALE, D., SANTOLINI, F., CANCEDDA, R., MASTROGIACOMO, M. (2012). A platelet-rich plasma-based membrane as a periosteal substitute with enhanced osteogenic and angiogenic properties: a new concept for bone repair. *Tissue Engineering Part A*, **19(1-2)**: 152-165. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0357
- ELDER, B. D., HOLMES, C., GOODWIN, C. R., LO, S. F., PUVANESARAJAH, V., KOSZTOWSKI, T. A., LOCKE, J. E., WITHAM, T. F. (2015). A systematic assessment of the use of platelet-rich plasma in spinal fusion.

Annals of Biomedical Engineering, **43(5)**: 1057-1070. doi: 10.1007/s10439-015-1300-0

- EPPLEY, B. L., WOODSELL, J. E., HIGGINS, J. (2004). Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, **114(6)**: 1502-1508.
- ESLAMINEJAD, M. B., FAGHIHI, F. (2011). Mesenchymal Stem Cell-Based Bone Engineering for Bone Regeneration. In *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*. Ed.: Eberli, D., InTech publisher, Rijeka, Croatia.
- EVANS, C. H. (2013). Advances in regenerative orthopedics. *Mayo Clinic Proceedings*, **88(11)**: 1323-1339. doi: 10.1016/j.mayocp.2013.04.027
- FERRARI, M., ZIA, S., VALBONESI, M., HENRIQUET, F., VENERE, G., SPAGNOLO, S., GRASSO, M. A., PANZANI, I. (1987). A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *International Journal of Artificial Organs*, **10(1)**: 47-50.
- FONTENOT, R. L., SINK, C. A., WERRE, S. R., WEINSTEIN, N. M., DAHLGREN, L. A. (2012). Simple tube centrifugation for processing platelet-rich plasma in the horse. *The Canadian Veterinary Journal*, **53(12)**: 1266-1272.
- FORTIER, L. A., POTTER, H. G., RICKEY, E. J., SCHNABEL, L. V., FOO, L. F., CHONG, L. R., STOKOL, T., CHEETHAM, J., NIXON, A. J. (2010). Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model. *Journal of Bone and Joint Surgery (American Volume)*, **92(10)**: 1927-1937. doi: 10.2106/jbjs.i.01284
- FORTIER, L., BARKER, J., STRAUSS, E., MCCARREL, T., COLE, B. (2011). The role of growth factors in cartilage repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **469**. doi: 10.1007/s11999-011-1857-3
- FRIEDENSTEIN, A. J., CHAILAKHJAN, R. K., LALYKINA, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*, **3(4)**: 393-403. doi: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x

- FRISBIE, D. D., SMITH, R. K. (2010). Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Veterinary Journal*, **42(1)**: 86-89. doi: 10.2746/042516409x477263
- GADE, N. E., PRATHEESH, M. D., NATH, A., DUBEY, P. K., AMARPAL, SHARMA, G. T. (2012). Therapeutic potential of stem cells in veterinary practice. *Veterinary World*, **5(8)**: 499-507.
- GAO, F., WANG, J.-X., HAN, Y. (2009). Research advance on application of platelet-rich plasma in wound repair - review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. Journal of Experimental Hematology*, **17(3)**: 840-843.
- GEBUREK, F., STADLER, P. (2011). Regenerative therapy for tendon and ligament disorders in horses. Terminology, production, biologic potential and in vitro effects. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G: Grosstiere Nutztiere*, **39(6)**: 373-383.
- GEORG, R., MARIA, C., GISELA, A., BIANCA, C. (2010). Autologous conditioned plasma as therapy of tendon and ligament lesions in seven horses. *Journal of Veterinary Science*, **11(2)**: 173-175. doi: 10.4142/jvs.2010.11.2.173
- GIRALDO, C. E., LÓPEZ, C., ÁLVAREZ, M. E., SAMUDIO, I. J., PRADES, M., CARMONA, J. U. (2013). Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Veterinary Research*, **9(1)**: 29. doi: 10.1186/1746-6148-9-29
- GIUSTI, I., RUGHETTI, A., D'ASCENZO, S., MILLIMAGGI, D., PAVAN, A., DELL'ORSO, L., DOLO, V. (2009). Identification of an optimal concentration of platelet gel for promoting angiogenesis in human endothelial cells. *Transfusion*, **49(4)**: 771-778. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.02033.x
- GOBBI, A., FISHMAN, M. (2016). Platelet-rich Plasma and Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells in Sports Medicine. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, **24(2)**: 69-73. doi: 10.1097/jsa.000000000000105
- GRAGEDA, E. (2004). Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dentistry*, **13(4)**: 301-309.

- GRIFFIN, X. L., SMITH, C. M., COSTA, M. L. (2009). The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: a systematic review. *Injury*, **40(2)**: 158-162. doi: 10.1016/j.injury.2008.06.025
- HAUSCHILD, G., GEBUREK, F., GOSHEGER, G., EVESLAGE, M., SERRANO, D., STREITBÜRGER, A., JOHANNLÜKENS, S., MENZEL, D., MISCHKE, R. (2017). Short term storage stability at room temperature of two different platelet-rich plasma preparations from equine donors and potential impact on growth factor concentrations. *BMC Veterinary Research*, **13(1)**: 7. doi: 10.1186/s12917-016-0920-4
- HEMEDA, H., KALZ, J., WALENDA, G., LOHMANN, M., WAGNER, W. (2013). Heparin concentration is critical for cell culture with human platelet lysate. *Cytotherapy*, **15(9)**: 1174-1181. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.05.006
- HESSEL, L. N., BOSCH, G., VAN WEEREN, P. R., IONITA, J. C. (2015). Equine autologous platelet concentrates: A comparative study between different available systems. *Equine Veterinary Journal*, **47(3)**: 319-325. doi: 10.1111/evj.12288
- HIDAKA, C., GOODRICH, L. R., CHEN, C. T., WARREN, R. F., CRYSTAL, R. G., NIXON, A. J. (2003). Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. *Journal of Orthopaedic Research*, **21(4)**: 573-583. doi: 10.1016/s0736-0266(02)00264-4
- HODGKISS-GEERE, H. M. (2012). Isolation, Characterisation and Differentiation of Canine Adult Stem Cells. PhD Thesis, The University of Edinburgh and The Roslin Institute, Chapter 1: 357.
- IACONO, E., BRUNORI, L., PIRRONE, A., PAGLIARO, P. P., RICCI, F., TAZZARI, P. L., MERLO, B. (2012). Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. *Reproduction*, **143(4)**: 455-468. doi: 10.1530/rep-10-0408
- JEAN-CLAUDE IONITA, C. K., GOTTSCHALK, J., EINSPANIER, A., KÖLLER, G., WINTER, K., BREHM, W. (2014). Comparison of cellular and growth

- factor concentrations in equine autologous conditioned plasma (ACP®) and manually prepared platelet rich plasma (mPRP). *Pferdeheilkunde*, **30**, (2): 7.
- JEANNE ADIWINATA, P. (2012). Platelet Rich Plasma in Xeno-Free Stem Cell Culture: The impact of platelet count and processing method. *Current Stem Cell Research and Therapy*, **7**(5): 329-335. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/157488812802481508>
- KAKUDO, N., MINAKATA, T., MITSUI, T., KUSHIDA, S., NOTODIHARDJO, F. Z., KUSUMOTO, K. (2008). Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plastic and Reconstructive Surgery*, **122**(5): 1352-1360. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181882046
- KARAÖZ, E. (2012). Temel kök hücre teknikleri ve moleküler biyoloji uygulamaları kursu. KOU-KOGEM, Istanbul. Turkey
- KAREY, K., SIRBASKU, D. (1989). Human platelet-derived mitogens. II. Subcellular localization of insulinlike growth factor I to the alpha-granule and release in response to thrombin. *Blood*, **74**(3): 1093-1100.
- KIM, D. H., JE, Y. J., KIM, C. D., LEE, Y. H., SEO, Y. J., LEE, J. H., LEE, Y. (2011). Can Platelet-rich Plasma Be Used for Skin Rejuvenation? Evaluation of Effects of Platelet-rich Plasma on Human Dermal Fibroblast. *Ann Dermatol*, **23**(4): 424-431. doi: 10.5021/ad.2011.23.4.424
- KOCHAOEMER, A., KERN, S., KLÜTER, H., BIEBACK, K. (2007). Human AB Serum and Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. *Stem Cells*, **25**(5): 1270-1278. doi: 10.1634/stemcells.2006-0627
- KOCH, T. G., BERG, L. C., BETTS, D. H. (2009). Current and future regenerative medicine - Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *The Canadian Veterinary Journal*, **50**(2): 155-165.
- KRUGER, J. P., HONDKE, S., ENDRES, M., PRUSS, A., SICLARI, A., KAPS, C. (2012). Human platelet-rich plasma stimulates migration and chondrogenic

- differentiation of human subchondral progenitor cells. *Journal of Orthopaedic Research*, **30(6)**: 845-852. doi: 10.1002/jor.22005
- KURITA, M., AIBA-KOJIMA, E., SHIGEURA, T., MATSUMOTO, D., SUGA, H., INOUE, K., ETO, H., KATO, H., AOI, N., YOSHIMURA, K. (2008). Differential effects of three preparations of human serum on expansion of various types of human cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, **122(2)**: 438-448. doi: 10.1097/PRS.0b013e31817d618d
- LANGE-CONSIGLIO, A., CORRADETTI, B., BIZZARO, D., MAGATTI, M., RESSEL, L., TASSAN, S., PAROLINI, O., CREMONESI, F. (2012). Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **6(8)**: 622-635. doi: 10.1002/term.465
- LANGE-CONSIGLIO, A., CORRADETTI, B., MEUCCI, A., PEREGO, R., BIZZARO, D., CREMONESI, F. (2013). Characteristics of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow: in vitro proliferative and multilineage potential assessment. *Equine Veterinary Journal*, **45(6)**: 737-744. doi: 10.1111/evj.12052
- LEE, K. S., WILSON, J. J., RABAGO, D. P., BAER, G. S., JACOBSON, J. A., BORRERO, C. G. (2011). Musculoskeletal Applications of Platelet-Rich Plasma: Fad or Future? *American Journal of Roentgenology*, **196(3)**: 628-636. doi: 10.2214/AJR.10.5975
- LI, H., USAS, A., PODDAR, M., CHEN, C.-W., THOMPSON, S., AHANI, B., CUMMINS, J., LAVASANI, M., HUARD, J. (2013). Platelet-Rich Plasma Promotes the Proliferation of Human Muscle Derived Progenitor Cells and Maintains Their Stemness. *PloS One*, **8(6)**: e64923. doi: 10.1371/journal.pone.0064923
- LIN, C. S., LIN, G., LUE, T. F. (2012). Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants. *Stem Cells Development*, **21(15)**: 2770-2778. doi: 10.1089/scd.2012.0176
- LIU, X., QIN, J., LUO, Q., BI, Y., ZHU, G., JIANG, W., KIM, S. H., LI, M., SU, Y., NAN, G., CUI, J., ZHANG, W., LI, R., CHEN, X., KONG, Y., ZHANG, J.,

- WANG, J., ROGERS, M. R., ZHANG, H., SHUI, W., ZHAO, C., WANG, N., LIANG, X., WU, N., HE, Y., LUU, H. H., HAYDON, R. C., SHI, L. L., LI, T., HE, T.-C., LI, M. (2013). Cross-talk between EGF and BMP9 signalling pathways regulates the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **17(9)**: 1160-1172. doi: 10.1111/jcmm.12097
- LOPEZ, M. J., JARAZO, J. (2015). State of the art: Stem cells in equine regenerative medicine. *Equine Veterinary Journal*, **47(2)**: 145-154. doi: 10.1111/evj.12311
- MARX, R. E. (2004). Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **62(4)**: 489-496.
- MCLELLAN, J., PLEVIN, S. (2011). Does it matter which platelet-rich plasma we use? *Equine Veterinary Education*, **23(2)**: 101-104. doi: 10.1111/j.2042-3292.2010.00185.x
- MEHTA, V. (2010). Platelet-rich plasma: a review of the science and possible clinical applications. *Orthopedics*, **33(2)**: 111. doi: 10.3928/01477447-20100104-22
- MIFUNE, Y., MATSUMOTO, T., TAKAYAMA, K., OTA, S., LI, H., MESZAROS, L. B., USAS, A., NAGAMUNE, K., GHARAIBEH, B., FU, F. H., HUARD, J. (2013). The effect of platelet-rich plasma on the regenerative therapy of muscle derived stem cells for articular cartilage repair. *Osteoarthritis and Cartilage*, **21(1)**: 175-185. doi: 10.1016/j.joca.2012.09.018
- MIKI, T., LEHMANN, T., CAI, H., STOLZ, D. B., STROM, S. C. (2005). Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cells*, **23(10)**: 1549-1559. doi: 10.1634/stemcells.2004-0357
- MIKI, T., MARONGIU, F., DORKO, K., ELLIS, E. C., STROM, S. C. (2010). Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Current Protocols in Stem Cell Biology, Chapter 1: Unit 1E.3*. doi: 10.1002/9780470151808.sc01e03s12
- MISHRA, A., TUMMALA, P., KING, A., LEE, B., KRAUS, M., TSE, V., JACOBS, C. R. (2009). Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal

- stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng Part C Methods*, **15(3)**: 431-435. doi: 10.1089/ten.tec.2008.0534
- MUYLLE, L., PEETERMANS, M. E. (1994). Effect of Prestorage Leukocyte Removal on the Cytokine Levels in Stored Platelet Concentrates. *Vox Sanguinis*, **66**: 0-0.
- NAJAR, M., RAICEVIC, G., BOUFKER, H. I., KAZAN, H. F., BRUYN, C. D., MEULEMAN, N., BRON, D., TOUNGOUZ, M., LAGNEAUX, L. (2010). Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cellular Immunology*, **264(2)**: 171-179.
- NGUYEN, R. T., BORG-STEIN, J., MCINNIS, K. (2011). Applications of platelet-rich plasma in musculoskeletal and sports medicine: an evidence-based approach. *Pm r*, **3(3)**: 226-250. doi: 10.1016/j.pmrj.2010.11.007
- NIXON, A. J., DAHLGREN, L. A., HAUPT, J. L., YEAGER, A. E., WARD, D. L. (2008). Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *American Journal of Veterinary Research*, **69(7)**: 928-937. doi: 10.2460/ajvr.69.7.928
- PACINI, S., SPINABELLA, S., TROMBI, L., FAZZI, R., GALIMBERTI, S., DINI, F., CARLUCCI, F., PETRINI, M. (2007). Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Engineering*, **13(12)**: 2949-2955. doi: 10.1089/ten.2007.0108
- PALMER, D. S., AYE, M. T., DUMONT, L., DUMONT, D., MCCOMBIE, N., GIULIVI, A., RUTHERFORD, B., TRUDEL, E., HASHEMI-TAVOULARIS, S. (1998). Prevention of cytokine accumulation in platelets obtained with the COBE spectra apheresis system. *Vox Sanguinis*, **75(2)**: 115-123.
- QUIMBY, J. M., DOW, S. W. (2015). Novel treatment strategies for feline chronic kidney disease: A critical look at the potential of mesenchymal stem cell therapy. *Veterinary Journal*, **204(3)**: 241-246. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.04.007

- RAUCH, C., FEIFEL, E., AMANN, E. M., SPOTL, H. P., SCHENNACH, H., PFALLER, W., GSTRAUNTHALER, G. (2011). Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *Altex*, **28(4)**: 305-316.
- RODRIGUEZ, I. A., GROWNEY KALAF, E. A., BOWLIN, G. L., SELL, S. A. (2014). Platelet-rich plasma in bone regeneration: engineering the delivery for improved clinical efficacy. *Biomedical Research International*, **2014**: 392398. doi: 10.1155/2014/392398
- ROH, Y. H., KIM, W., PARK, K. U., OH, J. H. (2016). Cytokine-release kinetics of platelet-rich plasma according to various activation protocols. *Bone Joint Res*, **5(2)**: 37-45. doi: 10.1302/2046-3758.52.2000540
- ROSS, R., GLOMSET, J., KARIYA, B., HARKER, L. (1974). A Platelet-Dependent Serum Factor That Stimulates the Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **71(4)**: 1207-1210.
- ROUBELAKIS, M. G., TROHATOU, O., ROUBELAKIS, A., MILI, E., KALAITZOPOULOS, I., PAPAOGLOU, G., PAPPA, K. I., ANAGNOU, N. P. (2014). Platelet-rich plasma (PRP) promotes fetal mesenchymal stem/stromal cell migration and wound healing process. *Stem Cell Review*, **10(3)**: 417-428. doi: 10.1007/s12015-013-9494-8
- SCHNABEL, L. V., MOHAMMED, H. O., MILLER, B. J., MCDERMOTT, W. G., JACOBSON, M. S., SANTANGELO, K. S., FORTIER, L. A. (2007). Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *Journal of Orthopaedic Research*, **25(2)**: 230-240. doi: 10.1002/jor.20278
- SMITH, R. K., KORDA, M., BLUNN, G. W., GOODSHIP, A. E. (2003). Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Veterinary Journal*, **35(1)**: 99-102.
- SONCINI, M., VERTUA, E., GIBELLI, L., ZORZI, F., DENEGRI, M., ALBERTINI, A., WENGLER, G. S., PAROLINI, O. (2007). Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *Journal*

- of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **1(4)**: 296-305. doi: 10.1002/term.40
- SOOMEKH, D. J. (2011). Current Concepts for the Use of Platelet-Rich Plasma in the Foot and Ankle. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, **28(1)**: 155-170. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpm.2010.09.001>
- SUTTER, W. W., KANEPS, A. J., BERTONE, A. L. (2004). Comparison of hematologic values and transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. *American Journal of Veterinary Research*, **65(7)**: 924-930.
- TEXTOR, J. (2011). Autologous Biologic Treatment for Equine Musculoskeletal Injuries: Platelet-Rich Plasma and IL-1 Receptor Antagonist Protein. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, **27(2)**: 275-298. doi: 10.1016/j.cveq.2011.05.001
- TEXTOR, J. A., TABLIN, F. (2012). Activation of equine platelet-rich plasma: comparison of methods and characterization of equine autologous thrombin. *Veterinary Surgery*, **41(7)**: 784-794. doi: 10.1111/j.1532-950X.2012.01016.x
- TOGHRAIE, F. S., CHENARI, N., GHOLIPOUR, M. A., FAGHIH, Z., TORABINEJAD, S., DEHGHANI, S., GHADERI, A. (2011). Treatment of osteoarthritis with infrapatellar fat pad derived mesenchymal stem cells in Rabbit. *Knee*, **18(2)**: 71-75. doi: 10.1016/j.knee.2010.03.001
- VAN PHAM, P., BUI, K. H.-T., NGO, D. Q., VU, N. B., TRUONG, N. H., PHAN, N. L.-C., LE, D. M., DUONG, T. D., NGUYEN, T. D., LE, V. T., PHAN, N. K. (2013). Activated platelet-rich plasma improves adipose-derived stem cell transplantation efficiency in injured articular cartilage. *Stem Cell Research & Therapy*, **4(4)**: 91-91. doi: 10.1186/srct277
- VEJLSTED, M. (2010). Comparative placentation. *In Essentials of Domestic Animal Embryology*. Ed.: HYTTEL, P. Edinburgh, New York Saunders/Elsevier. 104–119.
- WANG, J. H. C., NIRMALA, X. (2016). Application of Tendon Stem/Progenitor Cells and Platelet-Rich Plasma to Treat Tendon Injuries. *Operative Techniques in Orthopaedics*, **26(2)**: 68-72. doi: 10.1053/j.oto.2015.12.008

- WASELAU, M., SUTTER, W. W., GENOVESE, R. L., BERTONE, A. L. (2008). Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. *J Am Vet Med Assoc*, **232**: 6. doi: 10.2460/javma.232.10.1515
- WILKE, M. M., NYDAM, D. V., NIXON, A. J. (2007). Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *Journal of Orthopaedic Research*, **25**(7): 913-925. doi: 10.1002/jor.20382
- WITTE, L. D., KAPLAN, K. L., NOSSEL, H. L., LAGES, B. A., WEISS, H. J., GOODMAN, D. S. (1978). Studies of the release from human platelets of the growth factor for cultured human arterial smooth muscle cells. *Circulation Research*, **42**(42): 402-409.
- XIE, X., ZHANG, C., TUAN, R. S. (2014). Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Research & Therapy*, **16**(1): 204. doi: 10.1186/ar4493
- YAGI, H., SOTO-GUTIERREZ, A., PAREKKADAN, B., KITAGAWA, Y., TOMPKINS, R. G., KOBAYASHI, N., YARMUSH, M. L. (2010). Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplantation*, **19**(6): 667-679. doi: 10.3727/096368910x508762
- YAMADA, Y., UEDA, M., NAIKI, T., TAKAHASHI, M., HATA, K.-I., NAGASAKA, T. (2004). Autogenous Injectable Bone for Regeneration with Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma: Tissue-Engineered Bone Regeneration. *Tissue Engineering*, **10**(5-6): 955-964.
- YAZAWA, M., OGATA, H., NAKAJIMA, T., MORI, T., WATANABE, N., HANDA, M. (2003). Basic studies on the clinical applications of platelet-rich plasma. *Cell Transplantation*, **12**(5): 509-518.
- YOSHIDA, K., SUMITA, Y., MARUKAWA, E., HARASHIMA, M., ASAHINA, I. (2013). Effect of platelet-rich plasma on bone engineering with an alloplastic substitute containing BMP2. *Bio-Medical materials and engineering*, **23**: 163-172.
- YU, W., WANG, J., YIN, J. (2011). Platelet-rich plasma: a promising product for treatment of peripheral nerve regeneration after nerve injury. *International*

Journal of Neuroscience, **121(4)**: 176-180. doi:
10.3109/00207454.2010.544432

- ZHANG, Y., ZENG, B., ZHANG, C., YUAN, T. (2005). Effects of platelet-rich plasma on proliferation and osteogenetic activity of marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, **19(2)**: 109-113.
- ZIMMERMANN, R., JAKUBIETZ, R., JAKUBIETZ, M., STRASSER, E., SCHLEGEL, A., WILTFANG, J., ECKSTEIN, R. (2001). Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion*, **41**. doi: 10.1046/j.1537-2995.2001.41101217.x
- ZUFFOVA, K., KRISOVA, S., ZERT, Z. (2013). Platelet rich plasma treatment of superficial digital flexor tendon lesions in racing Thoroughbreds. *Veterinarni Medicina*, **58(4)**: 230–239.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: ASM Golam KİBRİA

Adres: CVASU, Veteriner Fakültesi, Anatomi ve Histoloji Departmanı, Zakir Hossen Caddesi, Chittagong – 4225, Bangladeş

Telefon: +8801719378328 / +905393977382

E-Posta: asmgk1982@gmail.com, akibria@yahoo.com

Web: <http://www.cvasu.ac.bd>

Cinsiyet: Erkek, **Doğum Tarihi:** 08 Eylül 1982, **Uyruk:** Bangladeş

Çalışma Bilgileri:

- Doçent** : Anatomi ve Histoloji AD, Chittagong Veteriner ve Hayvan Bilimleri Üniversitesi, Bangladeş, 19.07.2016- .
- Yard. Doç** : Anatomi ve Histoloji AD, Chittagong Veteriner ve Hayvan Bilimleri Üniversitesi, Bangladeş, 16.03.2011 - 18.07.2016.
- Okutman** : Anatomi ve Histoloji AD, Chittagong Veteriner ve Hayvan Bilimleri Üniversitesi, Bangladeş, 21.06.2008 - 15.03.2011.

Eğitim Bilgileri:

Yüksek Lisans-Anatomi : Chittagong Veteriner ve Hayvan Bilimleri Üniversitesi, Bangladeş

Yüksek Lisans-Farmakoloji : Bangladesh Ziraat Üniversitesi, Bangladeş

Lisans : Chittagong Veteriner ve Hayvan Bilimleri Üniversitesi, Bangladeş

Tez Çalışmaları:

- Anatomi Yüksek Lisans Tezi: Siyah Bengal Keçisinde Kastrasyon Yaşına Bağlı Olarak Üretral Yolun Postnatal Gelişimi (Postnatal development of urethral passage in relation to the age of castration in Black Bengal Goat).
- Farmakoloji Yüksek Lisans Tezi: Chittagong Bölgesindeki Broiler Tavuklarda Tetrasiklin, Ciprofloksasin ve Enrofloksasin Kalıntılarının Belirlenmesi (Detection of tetracycline, ciprofloxacin and enrofloxacin residues in broilers of Chittagong district).

Yayınlanan Makaleler

1. **KIBRIA, A.S.M.G.**, ALTUNBAS, K., YAGCI, A. (2015). Research and applications of stem cells in veterinary medicine. *Uludag University Journal of faculty of Veterinary Medicine*, 34 (1, 2): 53-61.
2. **KIBRIA, A.S.M.G.**, RAHMAN, M.L., AHASAN, A.S.M.L., UDDIN, M.M., QUASEM, M.A. (2016). Effects of castration on penile and urethral

- development in Black Bengal Goat. *Pakistan Journal of Zoology*, 48 (2): 501-506.
3. ASGAR, A., HAQUE, R., KHAN, S.I., **KIBRIA, A.S.M.G.**, ANOWER, A.K.M.M. (2013). Effects of Citric Acid, Antibiotic Growth Promoter and Probiotics on Growth Performance of Broilers. *Wayamba Journal of Animal Science*, 5(1): 729-735.
 4. KHAN, M.S.I., BEGUM, M.R., HAQUE, M.R., ASGAR, M.A., ISLAM, M.S., **KIBRIA, A.S.M.G.** (2013). Study on Contamination of Roadside Food by E coli and Salmonella in Chittagong City Area. *Journal of Environmental Science and Natural Resources*, 6(1): 11-14.
 5. SHIL, S.K., AHASAN, A.S.M.L., RAHMAN, M.L., **KIBRIA, A.S.M.G.**, UDDIN, M., QUASEM, M.A. (2013). Studies on the Skeleton of an Indian Rock Python (*Python molurus molurus*). *Indian Journal of Veterinary Anatomy*, 25 (1): 25-26.
 6. SHIL, S.K., AHAD, A., **KIBRIA, A.S.M.G.**, SHAIKAT, A.H., QUASEM, M.A. (2013). Macroanatomy of Bones of Large Frugivorous Bat (*Pteropus giganteus*). *Indian Journal of Veterinary Anatomy*, 25 (1): 18-20.
 7. AHASAN, A.S.M.L., ISLAM, M.S., **KABRIA, A.S.M.G.**, RAHMAN, M.L., HASSAN, M.M., UDDIN, M. (2012). Major Variation in Branches of the Abdominal Aorta in New Zealand White Rabbit (*Orycotolagus Cuniculus*). *International Journal of Natural Sciences*, 2(4): 91-98.
 8. SARKER, M.S., PRODHAN, M.A.M., HUQUE, K.S., ISLAM, S.K.M.A., ASGAR, M.A., **KIBRIA, A.S.M.G.** (2011). Glucose and total protein of Red Chittagong Cattle and Local Cattle at Chittagong. *Asian Journal of Biological Sciences*, 4(1): 1-5.
 9. ASGAR, M.A., HAQUE, M.R., JHARNA, D.E., **KIBRIA, A.S.M.G.**, KHAN, M.S.I. (2010). Effects of dietary supplementation of citric acid, antibiotic growth promoter (Avilamycin) and probiotic (Protexin) on certain biochemical parameters of broilers. *Journal of Bangladesh Society for Agricultural Science and Technology*, 7 (1&2):1-6.
 10. ALAM, M., GREGORY, N.G., JABBAR, M.A., UDDIN, M.S., **KIBRIA, A.S.M.G.**, SILVA-FLETCHER, A. (2010). Skin injuries identified in cattle and water buffaloes at livestock markets in Bangladesh. *Veterinary Record*, 167(11): 415-419.
 11. ALAM, M.R., GREGORY, N.G., JABBAR, M.A., UDDIN, M.S., WIDDICOMBE, J.P., **KIBRIA, A.S.M.G.**, KHAN, M.S.I., MANNAN, A. (2010). Frequency of dehydration and metabolic depletion in cattle and water buffalo transported from India to a livestock market in Bangladesh. *Animal Welfare*, 19(3): 301-305.
 12. UDDIN, M.M., KHAN, M.Z.I., ISLAM, K.N., **KIBRIA, A.S.M.G.**, ADHIKARY, G.N., PARVEZ, M.N.H., BASU, J., UDDIN, M.B., RAHMAN, M.M. (2010). Distribution of lymphocytes in the mucosa associated lymphoid

tissues (MALT) of naturally occurring infectious bursal disease (IBD) in chicken. *Pakistan Veterinary Journal*, 30(2): 67-71.

13. SIKDER, S., AHMED, S.S.U., **KIBRIA, A.S.M.G.**, PALLAB, M.S., UDDIN, M.B., BASU, J., UDDIN, M.M. (2010). Anatomical measurements for the blocking sites of paravertebral regional anesthesia in Black Bengal Doe. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 8(1): 81-86.
14. **KIBRIA, A.S.M.G.**, MONY, T.J., KASHEM, M.A., ELAHI, M.F., ASGAR, M.A. (2010). Determination of selected hemato-biochemical parameters of broilers. *International Journal of Animal and Fisheries Science*, 3(6): 350-353.
15. SARKER, M.S., **KIBRIA, A.S.M.G.**, ALAM, M.M., RAHMAN, M.L., KHAN, S.H. (2010). Milk marketing system of Red Chittagong Cattle breeding tract in Chittagong. *Journal of Socio-economic Research and Development*, 7(1): 748-753.
16. **KIBRIA, A.S.M.G.**, KHOKON, M.S.I., ALAM, M.M., RAHMAN, M.L., SARKER, M.S. (2010). A comparative study on prevalence of various clinical diseases and disorders of cattle and goat in Pabna district. *International Journal of Animal and Fisheries Sciences*, 3(1):257-261.
17. **KIBRIA, A.S.M.G.**, AWAL, M.A., MOSTOFA, M., SAIFUDDIN, A.K.M., KHAN, M.S.I. (2009). Detection of tetracycline residues in broilers of Chittagong. *Journal of Environmental Science and Natural Resources*, 2(2): 41-44.
18. **KIBRIA, A.S.M.G.**, AWAL, M.A., MOSTOFA, M., SAIFUDDIN, A.K.M., ALAM, M.R., ASGAR, M.A. (2009). Detection of ciprofloxacin and enrofloxacin residues in broilers of Chittagong. *International Journal of Bioresearch*, 2 (12): 33-35.

Sözlü Sunumları:

- **ASM Golam KIBRIA**, Tayfun DIKMEN, Hacı Ahmet CELİK, Artay YAGCI. Equine Amniotic Membrane derived stem cells and its multilineage differentiation. One-health International conference (OHC-2017). Lahore, Pakistan. 13-15 November 2017.
- **ASM Golam KIBRIA**, Korhan ALTUNBAS, Ozlem Ozden AKKYA, Shah NAWAZ, Tayfun DIKMEN, Artay YAGCI Amniotic Fluid derived stem cells and its multilineage differentiation. One-health International conference (OHC-2017). Lahore, Pakistan. 13-15 November 2017.