

Derleme / Review

Mezenkimal kök hücreler ve veteriner hekimlikte kullanımı

Asuman ÖZEN¹, İrem GÜL SANCAK²

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, ¹Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı; ²Cerrahi Anabilim Dalı, Dışkapı, Ankara.

Özet: Kök hücreler organizmada farklı hücre tiplerine dönüşebilen, canlı kaldıkça yaşamlarını sürdürme özelliğine sahip ve kendi kendilerini yenileyebilen hücrelerdir. Elde edildiği yere göre embriyonal ve yetişkin kök hücresi olmak üzere 2 tip kök hücre bulunmaktadır. Blastositin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonal kök hücreler tüm canlıyı oluşturabilirken differensiyel olmuş bir dokudan elde edilen kök hücre sınırlı bölünme ve farklılaşma potansiyeline sahiptir. Embriyonal kök hücreler ile ilgili etik sınırlamalardan dolayı çalışmalar kısıtlıdır. Mezenkimal kök hücrelerdeki çalışmalar hem elde edilmiş kolaylığı hem de rejeneratif tıpta kullanım alanı bulması ile öne çıkmaktadır. İnsanlarda kök hücre çalışmaları lokalize hastalıklarda, sistemik transplantasyonda, gen tedavisi ile kombine kök hücre tedavisinde ve doku mühendisliğinde olmak üzere dört alanda başlamıştır. Veteriner hekimlikte kök hücre çalışmaları insan hastalıklarına model oluşturması açısından deney hayvanlarında başlamıştır. Klinik olarak atlarda tendo yaralanmalarında köpeklerde ise osteoartritisin/kıkırdak hasarının tedavisinde kullanım alanı bulmaktadır.

Anahtar sözcükler: Kemik iliği, klinik uygulama, kök hücre.

Mesenchymal stem cells (Msc) and stem cell applications in veterinary medicine

Summary: In the living organism stem cells differentiate into diverse specialized cell types, capable of sustaining viability and self-renewal. Stem cells can be categorized as embryonal, and adult due to its origin. Embryonic stem cells obtained from the inner cell mass of the blastocyst has the ability to create the whole organism, differentiated tissue-derived stem cells have the limited growth and differentiation potential and tend to turn into the tissue from which they originated. Due to ethical limitations studies in the embryonic stem cells are limited. Ease of obtaining and common use of the cells in regenerative medicine makes mesenchymal stem cells favorable for studies. In humans; localized disease, systemic transplantations, stem cell therapy in combination with gene therapy and tissue engineering are the four areas of work to be started on stem cells. Stem cell research in veterinary medicine started in experimental animals in terms of being a good model for human diseases. Clinically mesenchymal stem cells are broadly used in horses for tendon injuries and in dogs for osteoarthritis/ injury of the cartilage.

Key words: Bone marrow, clinical application, stem cell.

Farklı hücre tiplerine dönüşme potansiyeli (differensiyasyon), kendi kendini yenileme (self-renewal) gücü ve canlı kaldıkça yaşamlarını sürdürme özelliğine sahip olan hücrelere kök hücre denilmektedir (1,24,27, 28,29). Kök hücrelerin araştırma alanında kullanımının yaygınlaşması ile organların oluşum sürecindeki önemleri, hastalıkların iyileşme süreci ve patogenezlerinin açıklanmasındaki rolleri giderek önem kazanmaktadır. Kök hücreler elde edildikleri kaynaklara göre embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreleri olmak üzere iki grupta toplanırlar. Embriyoda blastositin iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler embriyonik kök hücreler olarak adlandırılırlar. Bu hücreler embriyonun tüm hücre tabakalarını ve ondan köken alacak olan organ sistemlerini oluşturma yeteneğine sahiptir. Gelişmekte olan bir organizmada (fötüs, prenatal dönem, infantil dönem) embriyonal hücreden bahsetmek mümkün

değildir. Hücrelerin farklılaşma etkinliği ve farklılaşma yönü değişmiştir. Differensiyel olmuş bir dokuda farklılaşmamış halde bulunan ve kendini yenileyip köken aldığı organın spesifik hücrelerine dönüşebilen hücrelere yetişkin (erişkin) kök hücreler denir. Bu hücreler somatik kök hücreler olarak da adlandırılırlar ve özel koşullar altında diğer dokulara ait hücre tiplerine de dönüşebilirler. Başta kemik iliği olmak üzere pek çok organda, gerektiğinde çoğalabilen, farklılaşabilen hücreler bulunur. Fötüstan elde edilen fötal kök hücreler de erişkin kök hücrelerin özelliklerine sahiptir (2,24,27,28,29).

Kök hücre alanında 1878 yılında memeli yumurtasının ilk kez organizma dışında döllenmesiyle başlayan invitro çalışmalar bugün canlıların klonlanması veya organ üretimine kadar ulaşmıştır. 1970'lerde fare kemik iliği hücreleri ile yapılan çalışmaları insanlarda başarıyla gerçekleştirilen kemik iliği nakli takip etmiştir (29). 1976

yılında Fridenstein (6) mezenkimal kök hücreleri ilk kez tanımlamıştır. 1994-1996 yılları arasında insanlarda ve Rhesus maymununda embriyonik kök hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir (7, 29). İnsan pluripotent kök hücrelerinin elde edilmesi ile ilgili ilk çalışma 1998 yılında Thomson ve ark., tarafından gerçekleştirilmiştir (7). 2006 yılında indüklenebilir pluripotent kök hücreleri (iPSC)'nin viral ya da nonviral vektörler kullanılarak, kültür ortamına bazı faktörlerin ilavesiyle genleri aktif hale getirilerek geriye farklanması sağlanmıştır (22) (2012, Nobel Ödülü). 2010 yılında da erişkin kök hücrelerin kendi niş ortamında farklılaşmamış ya da özelleşmemiş olarak bulunduğunu ve sinyalleşmeler ile kök hücrelerin kendi aralarındaki ilişkiyi düzenlediğini Gazzon Muvdi ve Quinones tarafından ortaya koyulmuştur (7).

Bölünme ve farklılaşma özelliklerine göre ise kök hücreler totipotent, pluripotent ve multipotent olarak adlandırılır. Hayatın başlangıcı olarak adlandırabileceğimiz zigot totipotent özelliktedir. Yani bir organizmayı oluşturabilecek tüm genleri taşımaktadır. Döllenmeden 16 blastomerli döneme kadar bu totipotent özellik korunur ve bu evreden sonra sınırsız farklılaşma özelliği sınırlanır. 16 blastomerli aşamadaki embriyoda iç hücre kitlesi belirlenmeye başlar. Üç embriyonik tabakayı (ektoderm, endoderm, mezoderm) şekillendirecek hücrelerin öncüleridirler. Bu hücreler pluripotent özelliktedirler, totipotent değildirler. Bir canlıyı oluşturamaz ancak ektoderm, endoderm ve mezodermden oluşan yapıları şekillendirebilirler. Embriyonun daha ileri aşamalarında ve erişkin organizmada kemik iliğinden, yağ dokudan elde edilen kök hücreler, erişkin kök hücreler sınırlı bir bölünme ve farklılaşma gösterirler. Elde edildikleri organa ve dokuya dönüşme eğilimindedir. Multipotent kök hücreler olarak adlandırılırlar (27, 29).

Günümüzde hücre tabanlı tedavilerde insan embriyonik kök hücreleri (hESC) %13, fetal kök hücreler %2, göbek kordonu kök hücreleri %10 ve erişkin kök hücreleri %75 oranında kullanılmaktadır (8). Kök hücre çalışmalarındaki ilerlemeler "Hayat ne zaman başlar?" sorusunu da gündeme getirmiştir. Din adamları ve bilim adamlarının ortaklaşa verdikleri kararlar sonucunda Avrupa ve Amerika'da embriyonik kök hücrelerdeki çalışmalar yasaklanmıştır.

Kök hücrelerin en önemli özelliği; farklılaşma özelliklerinin yüksek oluşudur. Farklanma; çok hücreli organizmalarda hücrelerin olgunlaşma ve uzmanlaşma sürecinde sitokinler, büyüme ve farklılaşma faktörlerinin, hücre dışı matris proteinlerinin ve hücreler arası iletişimlerini de içeren değişimler bütünü olarak tanımlanabilir (24). Bir canlının tüm hücrelerinde genom aynı olmasına rağmen, hücrelerin farklılaşmasını sağlayan, genlerin ifade edilmesi ya da ifade edilmemesidir. Erken embriyonik bölünme sırasında; ilk oluşan hücreler arasında, yumurtada bulunan sitoplazmik bileşenlerin eşit bir şekilde dağılması, farklılıklar meydana getirir.

Hüresel farklılaşmada hücrelerin birbiri ve çevre ile olan etkileşimleri de rol oynamaktadır (24, 29). Laboratuvar ortamında kök hücrelerin belli bir yönde farklanması için belli kimyasal ve fiziksel şartların yerine getirilmesi gerekir. Örneğin; mezenkimal kök hücrenin yağ hücrelerine farklanması için kültür ortamına deksametazon, indometazon, izobutylmetilksantin ve insülin gibi doğal hormonlar ve kimyasal maddeler kullanılır. İn vivo farklılaşmanın bir başka yolu çeşitli vektörler (virus ya da plazmidler) kullanarak yeniden genetik programlama yapmaktır. İndüklenebilir pluripotent kök hücreleri (iPSC) buna örnek verebiliriz (24).

Embriyonik kök hücreler (EKH)

Blastositin dış kısmı ayrılıp, iç hücre kitlesinden elde edilen hücrelerin kültüre edilmesi sonucu pluripotent hücreler elde edilir, kendini yenileme ve çoğalma özelliğine sahiptirler ve pek çok hücre tipine dönüşebilirler. Klinikte embriyonal kök hücreleri hastaya uygulama aşamasında iki sorunla karşılaşmaktadır. Birincisi embriyonal kök hücreler hastaya uygulandıklarında teratomalara sebep olmaktadır. Diğer ise hastanın immun sistemi tarafından tanınmadığı, yabancı genotipte olduğundan immun reaksiyona sebep olmasıdır (10, 27, 29).

Thomson ve ark., (1998) ilk insan EKH üretimini gerçekleştirmişlerdir (7). Embriyonal kök hücrelerinin, erişkin kök hücrelerde bulunan pluripotent özellik ve hematopoietik kök hücrelerin kültürde çoğaltılma zorlukları gibi bazı dezavantajları olmaması nedeniyle hüresel tedavi ve doku mühendisliğine iyi kaynak oldukları düşünülmektedir. EKH'ler invitro ortamda sınırsız sayıda çoğaltılıp, istenilen hücre tipine farklılaştırılabilir. Ayrıca somatik hücre çekirdek transferi denilen yöntemle hastaya özel EKH'lerin üretilebilme olanağında bulunmaktadır. Bu yöntemde; somatik bir hücrenin çekirdeğinin, çekirdeği çıkartılmış bir yumurta hücrelerine aktarılması, oluşan bu yeni hücrenin blastosist aşamasına kadar çoğaltılması ve sonrasında ya buradan iç hücre kitlesinin hüresel tedavide kullanılması ya da bu blastositin uterusu yerleştirilmesi sonucu (klonlama) yeni bir canlı oluşturulması şeklinde özetlenebilir (üreme amaçlı kopyalama). Üreme amaçlı kopyalama, 1997 yılında Wilmut VD tarafından 'Dolly' adı verilen bir kopya koyunun üretilmesiyle gerçekleştirilmiş daha sonra bu başarı pek çok canlıda tekrarlanmıştır. Dolly somatik bir hücrenin embriyonik hale yeniden programlanabileceğini göstermesi bakımından önem taşımaktadır (27, 29). Embriyonik kök hücreleri tanımlamak için; mikroskopik inceleme, yüzey marker varlığının saptanması, karyotip analizi ve pluripotent özelliklerinin test edilmesi gerekmektedir. Erken dönemde EKH'lerin belirlenebilmesi için tanımlanan markırlar (SSEA-1,3,4, TRA-1-60 ve 81) veya gen ürünlerinin (OCT-4) immu-

nohistokimyasal yöntemlerle boyanması tekniği uygulanmaktadır (21).

Erişkin Kök Hücreler

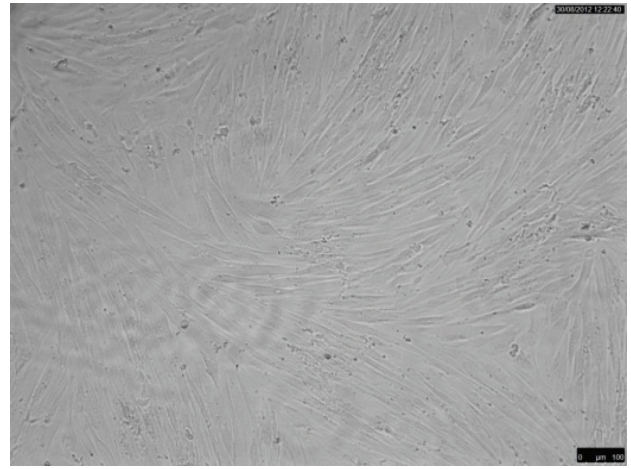
Yetişkinlerde farklılaşmış dokularda farklılaşmamış halde bulunan, kendini yenileme özelliğine sahip multipotent hücrelerdir. Bu hücreler ihtiyaç halinde farklılaşma göstererek doku ve organların yenilenmelerini sağlamaktadırlar. Erişkin kök hücrelerin en güzel örneği kemik iliğinde bulunan hematopoietik kök hücrelerdir. Perifer kanda, kan damarlarında, iskelet kasında, diş pulpasında, miyokardiyum içinde, karaciğerde, gastro-intestinal sistemde, ovaryum epitelinde, testiste, akciğerde, meme dokusunda, deride, beyinde, gözde limbus bölgesinde, medulla spinaliste ve tükrük bezinde de yapılan çalışmalarla bu hücrelerin varlığı gösterilmiştir. Örnek olarak viral hepatitten sonra karaciğer kök hücrelerinin yeni hepatositler yaparak karaciğerin normale dönmesini sağlaması ya da cerrahi işlemlerden sonra derinin normal yapısı ve fonksiyonunu kazanması gösterilebilir. Gözde korneal yaralanma, yanık sonrası limbal kök hücre transplantasyonunu takiben korneal saydamlığın yeniden sağlandığı ve buna limbal bölgede yer alan kök hücrelerin sebep olduğu gösterilmiştir (9, 24, 27, 29). Yetişkin kök hücrelerini tanımlamak için; farklılaşarak oluşturdukları hücre tiplerinin saptanması, izole edilip kültür yapılarak bir başka canlıya aktarılması ve orjin hücreleri yeniden oluşturup oluşturmadıklarının kontrolü, izole edilip kültür ortamına yeni maddeler ekleyerek hangi hücrelere farklılaştıklarının gözlenmesi testleri yapılır (29).

Mezenkimal kök hücreler (MKH)

Erişkin kök hücresi tipidir. Bağ dokunun ana hücreleridir. Birçok dokudan elde edilebilirler. Yağ, kıkırdak, kemik, kas, nöron gibi hücrelere farklılaşabilirler (1). Bu hücreler elde edildikleri dokularda sayıca çok az oldukları için kültür ortamında pasajlanarak sayıları çoğaltılmaktadır. Bu işlem sırasında bu hücrelerin fenotipik, immunolojik ve biyolojik özelliklerinde birtakım değişiklikler olabilmekte bu da bu hücrelerde çalışmanın dezavantajını oluşturmaktadır. İlk kez 1976 yılında Fridenstein (6) tarafından fetal buzağı serumu kullanılarak kemik iliği kültüründe adezyon yeteneği gösteren, morfolojik yapıları fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin kemik ve yağ hücrelerine farklılaşabildiklerini göstermiştir. Bu hücrelerin sonradan yapılan çalışmalarla non-hematopoietik pluripotent kök hücreler olduğu belirlenmiş ve MKH olarak adlandırılmışlardır (1, 24). MKH ayırımını yapabilmek için kullanılan temel özellikler; plastik yüzeye yapışma, stromal karakterde yüzey antijenlerinin ekspresyonu ve multipotent farklılaşma potansiyelidir (1). Bilinen en iyi MKH kaynağı olan kemik iliğinde bu hematopoietik kök hücre ve kemik iliği stromal kök hücresi olmak üzere iki tur

kök hücresi yanında multipotent erişkin progenitor hücre tanımlanmıştır-MAPC- (11).

Kemik iliği aspirasyonunda 1×10^6 mononükleer hücreye karşı 2-100 arasında değişen sayıda MKH bulunduğu gösterilmiştir. MKH'lerin sayıca az olmalarından dolayı invitro olarak çoğaltılmaları gerekmektedir. Kemik iliği dışında dokularda hücre izolasyonu yapılırken enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Kemik, kas, diş pulpası, karaciğer, yağ dokusu, kordon kanı, plasenta, amnion sıvısı, sinovial sıvı ve periferik kandan da adhezyon özellikleri kullanılarak ayrıştırılıp, çoğaltılmaları mümkündür (4,13,16). Hücreler kültür ortamında incelendiklerinde iğ şeklinde ve fibroblast benzeri topluluklar olduğu görülmüştür (Şekil 1).



Şekil 1. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (At) (40 X).

Figure 1. Bone marrow derived mesenchymal cells (Horse) (40 X).

MKH'lerin İzolasyonu

Kemik iliği genel anestezi altında atlarda sternal bölgeden, koyunlarda iliak bölgeden, köpeklerde ise femurdan türlere göre farklı miktarlarda elde edilmektedir. Invitro kültür ortamında hücreler % 10-15 FCS içeren ortamda flask tabanına yapışma özelliği gösterip, çoğalabilmektedirler. Heparin içeren enjektör içine alınan kemik iliği örnekleri Hanks Balanced Salin Solution (HBSS) ile 1:2 oranında sulandırılarak Ficol gradient yöntemi ile ayrılır (14,17,18) ve MKH eldesi sağlanır (15). Elde edilen kök hücreler Thoma lamı kullanılarak hücre canlılık oranı ve sayısı belirlenir ve $5.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ olacak şekilde T75 kültür flaskına ekilir. Hücre süspansiyonları %5 CO₂ ve 37°C'lik, %95 nemli inkubatörde inkubasyona bırakılır. Ekim sonrasında DMEM-LG, %1 Penisilin G (100U/ml)/ Streptomisin (100 µg/ml), %10 FCS içeren vasat içine alınır ve her 3 günde bir vasat değişimi yapılır. %70-80 konfluent olan flasklar %0.25 tripsin EDTA ile kaldırılır ve 1:2 oranında yeni flasklara ekilir. İstenilen aşamada hücreler dondurularak saklanabilir. Dondurma vasatı olarak DMEM-LG, %20

FBS, ve %10 DMSO karışımı kullanılır. Hücreler her saat için bir derece olacak şekilde kademeli olarak -80°C 'de 24 saatte dondurulur. Bu amaçla izopropanol içeren ve kademeli düşüş sağlayan ekipmanlar kullanılır (Mr frosty) veya sıvı nitrojene konur. Pasajların artmasıyla birlikte hücrelerde sitogenetik bozukluklar ve telomer kısalması (hücre yaşlanması) görüldüğü bildirilmiştir. Bu nedenle üçüncü pasajdan sonra bu hücrelerin kullanılması tercih edilmemektedir (14, 17, 18, 24). MKH ler özellikle rejeneratif tıp uygulamaları açısından önem taşımaktadırlar. İn vitro koşullarda uygun situmulanlarla osteojenik, adipojenik, kondrojenik, miyojenik, nörojenik farklılaşma gösterebilmektedirler (3, 4, 13, 24).

Adipojenik farklılaşma için; %90-100 oranında (flaskı tamamen kaplayacak kadar) çoğalma sağlandıktan sonra MKH'ler üzerine DMEM-LG içerisinde %10 FCS, 1 μm deksametazon, 0.5 mM indometazin, 0.5 mM 3-izobutil-1-metilksantin (IBMX) ve 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insülin ile hazırlanan solusyon konularak 3 hafta sonra farklılaşmış hücreler elde edilir.

Osteojenik farklılaşma için; % 70-80 oranında üremiş MKH'ler üzerine DMEM- LG içerisinde % 10 FCS, 100 nM deksametazon, 10 mM sodyum betagliserofosfat ve 0,05 mM askorbik asit ile hazırlanan osteojenik farklılaşma vasatı konur ve 3 hafta sonra ekstraselüler matrikste kalsifikasyon ve kalsiyum depoları tespit edilir.

Kondrojenik farklılaşma için; DMEM- HG içerisinde 100 nM deksametazon, 10 ng/ml TGF β 1, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ askorbat-2 fosfat, 1.25 mg/ml bovine serum albümin (BSA) ve 50 mg/ml ITS⁺ premiks ilave edilerek hazırlanmış olan kıkırdaklaşma vasatı konularak kondrosit farklılaşması tespit edilir. Yukarıdaki vasatlar da, 37°C de ve % 5 CO_2 ortamda 3 hafta farklılaşmaya bırakılıp, bu süre sonunda kıkırdak, kemik, yağ dokusu için özel boyalar yapılabilir. Histolojik olarak yapılan incelemede sırasıyla Alcian blue (pH 2.5), Von Kossa, Oil red O şeklinde uygulanır (Şekil 2). Ayrıca immunohistokimyasal ve immunfloresan yöntemler kullanılarak farklılaşmanın olup olmadığı araştırılır (3, 14, 24, 29).

MKH'lerin veteriner hekimlikte kullanımı

Veteriner hekimlikte MKH tabanlı tedaviler atlarda ve köpeklerde tendon ve ligament yaralanmalarında kıkırdak ve eklem hasarlarında, muskuler distrofiye (25), veteriner diş hekimliğinde pulpanın rejenerasyonu amacıyla (11), dermatolojide doku kayıplı yara ve yanıklarda deri iyileşmesi amacıyla (12) kullanım alanı bulmaktadır. Günümüzde veteriner hekimlik alanında çalışmalar genellikle araştırma tabanlı olarak deney hayvanlarında yapılmaktadır. Kullanılan hayvanların insanlardan biyomekanik ve biyolojik olarak farklılıkları bir takım problemleri de beraberinde getirmektedir (1).

Kök hücreler günümüzde nörodejeneratif hastalıklardan kardiyak yetmezliğe kadar değişen birçok hastalıkta kullanılmaktadır. Spinal cerrahide MKH kullanımı genellikle intervertebral disk tedavisi ve rejenerasyonu ile spinal artrodez üzerine odaklanmaktadır (1). Spinal kord yaralanmalarında kök hücrelerin etkinliğinin araştırıldığı köpekler üzerine yapılan bir çalışmada yağ, kemik iliği, Wharton peltesi ve umbilikal kord kaynaklı kök hücreler kullanılmıştır. 8 hafta sonunda hastalarda lokomasyonda belirgin artış gözlenmiştir. Fonksiyonel iyileşmede belirgin bir farklılık saptanmaz iken umbilikal kord kaynaklı kök hücrelerde sinir rejenerasyonunun ve anti inflamatuvar aktivitenin arttığı gözlenmiştir (19,20).

Köpeklerin model olarak kullanıldığı bir diğer çalışmada doku mühendisliği ile üretilen özefagal dokuya ekilen mezenkimal kök hücrelerin epitel yenilenmesi, damarlaşma ve musküler rejenerasyonu uyardığı gösterilmiştir (23).

MKH'lerin taşınması amacıyla yeni yaklaşımlarda denlenmektedir. Son çalışmalarda fibrin ve kollajen scaffoldlara ekilen MKH'lerin koyunlarda kalça protezinde yeni kemik oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiştir (5).

MKH'lerin infüzyonundan sonra, hücrelerin kaderi pek incelenmemiştir. Wood ve ark tarafından yapılan çalışmada kök hücreler sistemik dolaşıma verilmiş ve takip edilmiştir. Hücrelerin timus ve gastrointestinal kanal lokalizasyonu belirlenmiştir (26). MKH'lerin



Şekil 2: Kondrojenik görünüm 21. gün (Alcian blue boyama) (a), Osteojenik görünüm 21. gün (Von kossa boyama) (b), Adipojenik görünüm 14. gün (C boyama) (c) Koyun 20x.

Figure 2. Chondrogenic view of 21. day (Alcian blue dye) (a), Osteogenic view of 21. Day (Von kosa dye) (b), Adipogenic view of 14. Day (view of 21. Day dye) (c) Sheep 20x.

hasarlı dokuya doğru mobilizasyonunu, hasarlı dokunun değişen mikroçevresinden gelen uyarıların sağladığı gösterilmiştir. İlaveten, hücrelerin hasarlı bölgeye migrasyonunu sağlayan uyarıların MKH'lerden de sağlandığı düşünülmektedir. MKH'lerin doku hasarı iyileştirilmesinde; MKH'lerin olgun hücrelere dönüşümü, hasarlı hücre- MKH füzyonu sonucu hücre fonksiyonunun yeniden kazanılması, MKH'lerin hasarlı dokuda hücre-hücre, hücre-ekstraselüler matriks ilişkileri, anti-inflamatuvar, antiapoptotik, anjiogenik etki göstermek yoluyla doku iyileşmesine katkıları sayılabilir (17, 21, 24).

MKH transplantasyonunun hastalıklarda kullanımı için çok fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Hayvanlarda denenilen materyallerden alınan pozitif sonuçlara rağmen insanlar ve hayvanlar arasındaki farklılıklardan dolayı kullanım alanları sınırlı olup, günümüzde bu konuda yapılacak çalışmaların gerekliliğinin gittikçe arttığını inancındayız.

Kaynaklar

1. **Andrades JA, Claros S, Palomo PJ, Lopez-Puerta JM, Zamora-Navas P, Guerado E, Monleon M, Araque MC, Becerra J** (2011): *Skeletal Regeneration by Mesenchymal Stem Cells: What Else?* Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials.5:107-144. DOI: 10.5772/20889.
2. **Beksaç M** (2003): *Cord blood as a source of stem cells.* Blood Banking Transfusion Med,1:155-158.
3. **Caplan AI, Dennis JE** (2006) : *Mesenchymal stem cells as trophic mediators.* J Cell Biochem, 98:1076-84.
4. **Csaki C, Matis U, Mobasher A, Ye H** (2007): *Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cell: a biochemical, morphological and ultrastructural study.* Histochem Cell Biol,128: 507-20.
5. **Dozza B, Di Bella C, Lucarelli E, Giavaresi G, Fini M, Tazzari PL, Giannini S, Donati DK** (2011): *Mesenchymal stem cells and platelet lysate in fibrin or collagen scaffold promote non-cemented hip prosthesis integration.* J Orthop Res, 29: 961-8.
6. **Friedenstein AJ, Gorskaja U, Kalugina NM** (1976): *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.* Exp Hematol, 4: 267-274.
7. **Gearhart JD, Addis RC** (2010): *The use of Animals in Human Stem Cells Research: Past, Present and Future,* ILAR Journal,51:1-2.
8. **George B** (2011): *Regulations and guidelines governing stem cell based products: Clinical considerations.* Perspect Clin Res, 2:94-96.
9. **Gruen L, Grabel L** (2006) *Concise review: scientific and ethical roadblocks to human embryonic stem cell therapy.* Stem Cells, 24: 2162-9.
10. **Gul Sancak I, Bozkurt FM** (2010): *Yeni Zelanda Tavşanında (Oryctolagus cuniculus) kornea konjunktival transpozisyon (KKT) tekniğinin korneal iyileşmeye etkisi.* Ankara Üniv Vet Fak Derg, 57: 235-240.
11. **Inukai T, Katagiri W, Yoshimi R, Osugi M, Kawai T, Hibi H, Ueda M** (2013) *Novel application of stem cell-derived factors for periodontal regeneration.* Biochem Biophys Res Commun, 430:763-8.
12. **Karaöz E, Aksoy A, Ayhan S, Sarıboyacı AE, Kaymaz F, Kasap M** (2009): *Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers.* Histochem Cell Biol, 132:533-46.
13. **Kim JW, Lee JH, Lyoo YS, Jung DI, Park HM** (2013) *The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds.* Vet Dermatol, 24: 242-253.
14. **Lettry V, Hosoya K, Takagi S, Okumura M** (2010): *Coculture of equine mesenchymal stem cells and mature equine articular chondrocytes results in improved chondrogenic differentiation of the stem cells.* Jpn J Vet Res, 58: 5-15.
15. **Ozen A, Gul Sancak I, Koch S, Von Rechenberg B** (2013): *Ultrastructural characteristics of sheep and horse mesenchymal stem cells (MSCs).* Microscopy Research, 1, 17-23.
16. **Pasquinelli G, Tazzari P, Ricci F, Vaselli C, Buzzi M, Conte R** (2007): *Ultrastructural Characteristics of Human Mesenchymal Stromal (Stem) Cells Derived from Bone Marrow and Term Placenta.* Ultrastructural Pathology, 31: 23-31.
17. **Pittenger MF, Maçkay AM, Beck SC et al** (1999): *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.* Science, 284:143-147.
18. **Prockop DJ** (1997): *Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues.* Science, 276: 71-74.
19. **Qiao SM, Chen GH, Wang Y, Wu DP** (2012): *Ultrastructure of human umbilical cord mesenchymal stem cells.* Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 20: 443-447.
20. **Ryu HH, Kang BJ, Park SS, Kim Y, Sung GJ, Woo HM, Kim WH, Kweon OK** (2012), *Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow, Wharton's jelly, and umbilical cord blood for treating spinal cord injuries in dogs,* 74: 1617-30.
21. **Sarraf CE, Otto WR, Eastwood M** (2011): *In vitro mesenchymal stem cell differentiation after mechanical stimulation.* Cell Prolif, 44: 99-108.
22. **Takahashi K, Yamanaka S** (2006): *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult fibroblast Cultures by Defined Factors.* J Cell, 126: 663-676.
23. **Tan B, Wei RQ, Tan MY, Luo JC, Deng L, Chen XH, Hou JL, Li XQ, Yang ZM, Xie HQ** (2012) *Tissue engineered esophagus by mesenchymal stem cell seeding for esophageal repair in a canine model.* J Surg Res. [Epub ahead of print]
24. **TÜBA Kök Hücre Çalışma Grubu** (2009): *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik uygulamalar.* Türkiye Bilimler Akademisi Raporları. Sayı:20, Yalçın matbaacılık, Türkiye Bilimler Akademisi Raporlar, sayı: 20, Ankara.
25. **Vieira NM, Valadares M, Zucconi E, Secco M, Bueno CR Jr, Brandalise V, Assoni A, Gomes J, Landini V, Andrade T, Caetano HV, Vainzof M, Zatz M** (2012): *Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin.* Cell Transplant, 21: 1407-17.

26. **Wood JA, Chung DJ, Park SA, Zwingenberger AL, Reilly CM, Ly I, Walker NJ, Vernau W, Hayashi K, Wisner ER, Cannon MS, Kass PH, Cherry SR, Borjesson DL, Russell P, Murphy CJ** (2012): Periocular and intra-articular injection of canine adipose-derived mesenchymal stem cells: an in vivo imaging and migration study. *J Ocul Pharmacol*, **28**: 307-17.
27. **Anonymous** (2004): *Stem Cells*, Proquest Information and Learning and Learning CSA.
www.csa.com/discoveryguides/stemcell/overview.php.
Erişim tarihi: 01.02 .2013.
28. **Anonymous** (2001): *Kök hücre nedir*, Kök Hücre Derneği.
www.kokhucrederneği.org.tr. Erişim tarihi: 12.02.2013.
29. **Anonymous** (2011): *Kök hücreler*, Hacettepe Üniversitesi.
yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_stem.pdf.
Erişim tarihi: 15.02.2013.

Geliş tarihi: 26.04.2013 / Kabul tarihi: 01.07.2013

Yazışma adresi:

*Prof. Dr. Asuman Özen
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı
Dışkapı, Ankara.
e-mail: asumanozen@gmail.com*