

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

**MULTİPLE MİYELOMALI HASTALARDAN ELDE EDİLEN
KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
OSTEOJENİK FARKLILAŞMA KAPASİTELERİNİN
İNCELENMESİ**

AYÇA AKSOY

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ADİL ALLAHVERDİYEV**

İSTANBUL, 2014

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MULTİPLE MİYELOMALI HASTALARDAN ELDE EDİLEN
KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
OSTEOJENİK FARKLILAŞMA KAPASİTELERİNİN
İNCELENMESİ**

Ayça AKSOY tarafından hazırlanan tez çalışması 30.06.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Adil Allahverdiyev
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Prof. Dr. Erdal Karaöz
Kocaeli Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Dilek Balık
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Ercüment Ovalı
Acıbadem Labcell

Doç. Dr. Ömer Faruk Bayrak
Yeditepe Üniversitesi

Yard. Doç. Dr. Gökhan Duruksu
Kocaeli Üniversitesi

Yard. Doç. Dr. Melahat Bağirova
Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu alışma, TÜBİTAK 112S086 nolu projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca akademik bilgileri ve deneyimlerinden yararlandığım ve tüm desteklerini benden esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV'E ve eş danışman hocam Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e;

Tez çalışmalarım boyunca, manevi desteğini, emeğini ve zamanını benden esirgemediği bilgi birikim ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım ve aynı zamanda çalışma arkadaşlarım Yard. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU, Yard. Doç. Dr. Ayla EKER SARIBOYACI ve Yard. Doç. Dr. Gülçin GACAR'a;

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalındaki saygıdeğer hocalarım Yard. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA ve Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK'a;

Tezimin oluşturulmasında destek ve yardımlarıyla katkıda bulunan, birlikte çalışmaktan ve yaşamaktan büyük mutluluk duyduğum sevgili arkadaşlarım, meslektaşlarım, dostlarım; Alparslan OKCU, Uz. Bio. Özlem SAĞLAM, Uz. Bio. Cansu SUBAŞI, Uz. Bio. Zehra Seda ÜNAL HALBUTOĞULLARI, Bio. Gülay ERMAN, Uz. Bio. İrem YILMAZ, Uz. Bio. Gizem TURAÇ, Araş. Gör. Çiğdem İNCİ ve Araş. Gör. Ayşegül BAĞLAR'a;

Tez konumun doğuşunda büyük katkıları olan ve tezimin deney aşamalarında verdiği emeklerden dolayı Uzm. Dr. Özgür MEHTAP'a;

Doktora eğitimime başladığım ilk günden itibaren verdikleri manevi destek ve karşılıksız yaptıkları tüm yardımlarından dolayı eğitimimi bitirmemde büyük katkıları olan sevgili arkadaşlarım Uz. Bio. Olga Nehir ÖZTEL, Uz. Bio. Serap YEŞİLKIR BAYDAR ve Araş. Gör. Emrah Şefik ABAMOR'a;

Doktora hayatımın tüm aşamalarında uzakta olsalar da daima yanımda olan canım dostlarım Pelin BAYRAKTAR, Özkan BAYRAKTAR ve Kıvılcım TAŞOVA'ya;

Hayatım boyunca beni her konuda daima destekleyen, seven, hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve benim bu günlere gelmemi sağlayan annem Oya AKSOY, babam Hüseyin AKSOY ve ablam Aslı AKSOY'a, sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2014

Ayça AKSOY

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xviii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.1.1 Kemik Doku Oluşumu (Ossifikasyon)	3
1.1.2 Osteoblast Farklılaşmasında Rol Oynayan Transkripsiyon Faktörleri ve Moleküler Mekanizmalar.....	7
1.1.2.1 SOX9 (SRY ilişkili HMG box 9).....	7
1.1.2.2 Runx2/Cbfa1	8
1.1.2.3 SP7/Osterix	12
1.1.2.4 Wnt/ β -katenin.....	14
1.1.2.5 TGF- β Süper Ailesi Sinyal Yolakları	16
1.1.3 Multipl Miyelom	17
1.2 Tezin Amacı.....	20
1.3 Hipotez.....	20
BÖLÜM 2	
GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
2.1 GEREÇ	22
2.1.1 MKH'lerin İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar.....	22
2.1.2 Alt-Kültür (Pasajlama) İşleminde Kullanılan Gereçler ve Solüsyonlar.....	23
2.1.3 Hücre Sayımında Kullanılan Gereçler ve Solüsyonlar.....	23

2.1.4	Hücrelerin Dondurulması İşleminde Kullanılan Kimyasallar ve Solüsyonlar	23
2.1.5	Akım Sitometrik Analizlerde Kullanılan Antikor, Solüsyon ve Kimyasallar.....	23
2.1.6	İmmunofloresan (İF) Çalışmalarda Kullanılan Antikor ve Kimyasallar	24
2.1.7	Alkalen Fosfataz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Kimyasallar.....	25
2.1.8	Protein Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Kimyasallar.....	25
2.1.9	Gerçek zamanlı PZR'da Kullanılan Malzemeler	26
2.1.10	<i>In vitro</i> Osteojenik ve Adipojenik Farklılaştırma Çalışmalarında Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasallar	26
2.1.11	Tez Çalışmasında Kullanılan Malzemeler.....	27
2.1.12	Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar	28
2.2	YÖNTEM	29
2.2.1	Yerel Etik Kurul Onayı	29
2.2.2	Hastaların ve Kontrol Gruplarının Seçimi.....	29
2.2.3	Kemik İliği Biyopsilerinden MKH'lerin Eldesi	30
2.2.4	Alt-Kültür İşlemi (Pasajlama)	31
2.2.5	Hücre Dondurma ve Çözme İşlemleri.....	31
2.2.6	MKH'in Karakterizasyon Çalışmaları.....	32
2.2.7	Akım Sitometrik Analizler	32
2.2.8	İmmunofloresan Çalışmalar	33
2.2.9	Farklılaştırma Çalışmaları	33
2.2.9.1	<i>In vitro</i> Adipojenik Farklılaşma.....	33
2.2.9.2	<i>In vitro</i> Osteojenik Farklılaşma.....	34
2.2.10	Deneyde Uygulanan Yöntemler ve Deney Grupları	34
2.2.10.1	Alkalen Fosfataz Enzim Aktivitesi Tayini.....	35
2.2.10.2	Protein Miktarı Tayini.....	36
2.2.10.3	Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi	36
2.2.10.3.1	RNA İzolasyonu.....	36
2.2.10.3.2	cDNA Sentezi.....	37
2.2.10.3.3	Gerçek Zamanlı PZR.....	37
2.2.11	İstatiksel Analizler.....	44

BÖLÜM 3

BULGULAR.....	45
---------------	----

3. BULGULAR.....	45
------------------	----

3.1	S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'inin Karakterizasyon Çalışmaları.....	45
3.1.1	Morfolojik Bulgular.....	45
3.1.2	İmmunofenotipik Bulgular	46
3.1.3	İmmunohistokimyasal Bulgular	54
3.1.4	MKH'lerin Farklılaşma Bulguları	56
3.2	Deney Bulguları	58
3.2.1	Alkalen Fosfataz Aktivitesi Bulguları	58
3.2.2	Gerçek Zamanlı PZR Analizi Bulguları	58
3.2.2.1	Osteojenik İndüksiyon Öncesinde Gen İfade Analizi Bulguları..	60

3.2.2.2 Osteojenik İndüksiyon Sonrasında Gen İfade Analizi Bulguları.	60
3.2.2.2.1 Transkripsiyon Faktörleri ve Düzenleyiciler	60
3.2.2.2.2 İskelet Gelişiminde Rol Oynayan Genler	61
3.2.2.2.3 Kemik Mineral Metabolizması	63
3.2.2.2.4 Hücreler Arası Madde Elemanları	64
3.2.2.2.5 Hücre Adezyon Molekülleri.....	65
3.2.2.2.6 Büyüme Faktörleri	67
BÖLÜM 4	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70
KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ.....	101

SİMGE LİSTESİ

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
C_2H_2	Asetilen
Ca	Kalsiyum
cm	Santimetre
cm^2	Santimetre kare
CO_2	Karbondioksit
g	Gravity (yerçekimi)
gr	Gram
M	Molar
Mg	Magnezyum
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
n	Sayı/adet
$^{\circ}\text{C}$	Celcius degree (Santigrad derece)
<i>p</i>	-para ön eki
pH	Power of hydrogen
v	Volume (Hacim)
β	Beta

KISALTMA LİSTESİ

ACTB	Beta Actin (Beta Aktin)
ALP	Alkaline Phosphatase (Alkalen Fosfataz)
AMH	Anti-Müllerian Hormon
AP-1	Aktivatör protein-1
APC	Adenomatous Polyposis Coli (Adenomatöz Poliposis Koli)
B2M	Beta-2 Microglobulin (Beta-2-Mikroglobulin)
BAPX-1	Bagpipe Homeobox Homolog 1
BCA	Bicinchoninic Acid Assay (Bikinkoninik Asit Yöntemi)
BGLAP	Bone Gamma-carboxyglutamic Acid-containing protein, Osteokalsin (Kemik Gamma-karboksilik Asit İçeren Protein)
BMP	Bone Morphogenetic Protein (Kemik Morfogenetik Protein)
BMPR1B	Bone Morphogenetic Protein Receptor, Type IB (Kemik Morfogenetik Protein Reseptörü IB)
BSA	Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albumini)
BSP	Bone Sialoprotein (Kemik Sialoprotein)
CBFA1	Core-Binding Factor Subunit Beta (Çekirdek Bağlayıcı Faktör Alfa 1)
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony Forming Unit (Koloni Oluşturan Birim)
CFU-F	Colony Forming Unit-Fibroblast (Koloni Oluşturan Birim-Fibroblast)
CFU-OB	Colony Forming Unit-Osteoblast (Koloni Oluşturan Birim-Osteoblast)
COLIA1	Collagen Type I Alpha-1 (Kollajen Tip I Alfa-1)
C _T	Threshold Cycle (Eşik Döngü)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DKK-1	Dickkopf-Related Protein 1 (Dickkopf İlişki Protein 1)
DMEM-LG	Dulbecco's Modified Eagle's Medium- Low Glucose (Dulbecco Modifiye Eagle Medium- Düşük Glikoz)
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
Dnaaz	Deoksiribonükleaz
Dntp	Deoxyribonucleotide Triphosphate (Deoksiribonükleotid Trifosfat)
DSP	Dentin Sialoprotein
DT	Deoxy-Thymine Nucleotide (Deoksi-Timin Nükleotid)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit

FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting (Floresanla Aktive Edilmiş Hücre Ayırıcı)
FBS	Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumu)
FDA	Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Dairesi)
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)
FITC	Fluorescein Isothiocyanate (Floresan İzotiosiyanat)
Frat-1	Frequently Rearranged in Advanced T-Cell Lymphoma-1
FRP	Frizzled Related Protein (Frizzled-İlişkili Protein)
Fz	Frizzled
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (Gliseraldehit-3fosfat Dehidrojenaz)
GDF	Growth Differentiation Factor (Büyüme Farklılaştırma Faktörü)
GSK3 β	Glikojen Sentaz Kinaz 3-Beta
HDAC	Histone Deacetylase (Histon Deasetilaz)
HGF	Hepatocyte Growth Factor (Hepatosit Büyüme Faktörü)
HLA	Human Leukocyte Antigen (İnsan Lökosit Antijeni)
HMG	High Mobility Group (Yüksek Hareketli Grup)
HOX	Homeobox
HPRT1	Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase-1 (Hipoksantin Fosforibosiltransferaz -1)
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthine (3-İzobutil-1-Metilksantin)
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1 (İntersellüler Adezyon Molekülü-1)
ICAP-1	Integrin Cytoplasmic Domain-Associated Protein-1 (İntegrin Sitoplazmik Bölge-İlişkili Protein-1)
IF	İmmunfloresan
Ig	İmmunglobulin
IGF I	Insulin Like Growth Factor I (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü I)
IGF II	Insulin Like Growth Factor II (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü II)
IGFBP	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein
IGF-IR	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü I Reseptörü
IHH	Indian Hedgehog Homolog
IL	İnterlökin
ITGB1	İntegrin Beta-1
Kİ	Kemik İliği
KLF	Kruppel Like Factor (Kruppel Benzeri Faktör)
LRP5/6	Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5/6 (Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü İlişkili Protein 5/6)
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase (Mitojen Aktive Protein Kinaz)
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor (Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör)
MEF	Myeloid <i>Elf-1</i> Like Factor (Myeloid Elf-1 Faktör)
MIP-1 α	Macrophage İnflammatory Protein-1 Alpha (Makrofaj İnflamatuvar Protein-1)
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MM	Multipl Miyelom
MMP	Matriks Metalloproteinaz
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule (Nöral Hücre Adezyon Molekülü)
NFAT	Nuclear Factor Of Activated T-Cells (Nükleer Faktör Aktive T Hücreleri)

Nrf2	Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor (Nükleer Faktör Eritroid 2-İlişkili Faktör)
OCN	Osteokalsin
ON	Osteonektin
OPN	Osteopontin
OSX	Osterix
PBS	Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tampon Solüsyonu)
PCP	Planar Cell Polarity (Planar Hücre Polaritesi)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor (Platelet Türevli Büyüme Faktörü)
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase (Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfat 3-Kinaz)
PTH	Paratiroid Hormon
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligandı)
RNA	Ribonükleik Asit
RPLP0	60S Asidik Ribozomal Protein P0
GZ PZR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT	Reverse Transcriptase (Ters Transkriptaz)
RUNX2	Runt-Related Transcription Factor 2 (Runt ile İlişkili Transkripsiyon Faktörü 2)
SATB2	Special AT-Rich Sequence-Binding Protein 2 (Özel AT-Zengin Sekans-Bağlayıcı Protein 2)
SCID	Severe Combined Immunodeficiency (Şiddetli Kombine İmmün Yetmezlik)
SD	Standart Deviation (Standart Sapma)
SDF1	Stromal Cell-Derived Factor 1 (Stromal Hücre Kaynaklı Faktör-1)
SKİ	Sağlıklı Kemik İliği
SMAD	Small Mothers Against Decapentaplegic
SOX	SRY-Related HMG Box (SRY İlişkili HMG Box)
SP7	Osteriks
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi)
SRY	Sex-Determining Region Y (Cinsiyet Belirleyici Bölge Y)
β-Trcp	Transducin Repeat Containing Protein (Transdusin Tekrarı İçeren Proteini)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription (Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü)
TAZ	Tafazzin
TCF/LEF-1	Transcription Factor/ Lymphoid Enhancer-Binding Factor (Transkripsiyon Faktörü/Lenfoid Arttırıcı Bağlayıcı Faktör)
TGF-B	Transforming Growth Factor Beta (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroz Faktör)
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TNF-İlişkili Apoptozis İndükleyici Ligand)
VCAM	Vascular Cell Adhesion Protein (Vasküler Hücre Adezyon Proteini)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)
VLA	Very Late Antigen (Çok Geç Antijen)

Wif-1
YAP

Wnt İnhibitör Faktör 1
Yes-Associated Protein 1 (Yes-İlgili Protein 1)

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Omurgalı embriyosunda iskelet hücrelerinin kökeni	4
Şekil 1.2 Enkondral ve intramembranöz ossifikasyon	5
Şekil 1.3 Enkondral ossifikasyonda kemik gelişimi	5
Şekil 1.4 Enkondral ossifikasyonda rol oynayan hücreler ve etkileşimleri	7
Şekil 1.5 Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik ve osteojenik farklılaşma sürecinde rol oynayan transkripsiyon faktörleri	9
Şekil 1.6 Runx2'nin kondrosit matürasyonunda ve osteoblast farklılaşmasındaki rolü	13
Şekil 1.7 Kanonik Wnt sinyal yolağı	15
Şekil 1.8 TGF- β sinyal yolağı	17
Şekil 2.1 MKH'lerin gradient yöntemi ile kemik iliğinden eldesi	30
Şekil 3.1 S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerinin zıt faz mikroskobisindeki morfolojik görünüşleri	46
Şekil 3.2 S-Kİ-MKH'nin akım sitometrik verileri (Olgu1)	48
Şekil 3.3 S-Kİ-MKH'nin akım sitometrik verileri (Olgu2)	49
Şekil 3.4 S-Kİ-MKH'nin akım sitometrik verileri (Olgu3)	50
Şekil 3.5 MM-Kİ-MKH'nin akım sitometrik verileri (Olgu1)	51
Şekil 3.6 MM-Kİ-MKH'nin akım sitometrik verileri (Olgu2)	52
Şekil 3.7 MM-Kİ-MKH'nin akım sitometrik verileri (Olgu3)	53
Şekil 3.8 S-Kİ-MKH'lerinin immunfloresan mikroskobik görüntüleri	55
Şekil 3.9 MM-Kİ-MKH'lerinin immunfloresan mikroskobik görüntüleri	56
Şekil 3.10 S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerinin adipojenik ve osteojenik farklılaştırma sonrası zıt faz ve immunfloresan mikroskobik görünüşleri	57
Şekil 3.11 S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerinde osteojenik indüksiyon sonrasında ALP aktivitesinin günlere göre değişimini gösteren çubuk grafiği	58
Şekil 3.12 Osteojenik indüksiyon öncesi ve sonrasında referans genlerin ifade değişimlerinin karşılaştırmalı çubuk grafiği	59
Şekil 3.13 Gerçek zamanlı PZR analizi sonrasında S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerde gen ifadelerinin değişimini gösteren çubuk grafiği	68
Şekil 3.14 S-Kİ-MKH'lerinde gen ifade değişimlerini gösteren ısı haritası	69
Şekil 3.15 MM-Kİ-MKH'lerinde gen ifade değişimlerini gösteren ısı haritası	69

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1	Gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan genlerin referans sekansı, sembolleri, gen tanımı ve gen isimleri	38
Çizelge 2.2	Gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan plakadaki genlerin konumları.....	44
Çizelge 3.1	S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerin tüm olgularından elde edilen hücrelerin akım sitometrik analizi sonuçları	47
Çizelge 3.2	İmmunofloresan yöntemlerde kullanılan antikolar, seyreltme miktarları, S-Kİ MKH ve MM-Kİ-MKH'lerdeki ifadeleri.....	54
Çizelge 3.3	Referans genlerin ostejenik indüksiyon öncesi ve sonrasındaki C_T değerlerinin ortalamaları, standart sapmaları ve p değerleri.....	59
Çizelge 3.4	MM-Kİ-MKH'lerde osteojenik indüksiyon öncesi S-Kİ-MKH'lere oranla kat değişimleri ve p değerleri.....	60
Çizelge 3.5	Transkripsiyon faktörleri ve düzenleyici genlerin S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerde osteojenik indüksiyon sonrası kat değişimleri ve p değerleri	61
Çizelge 3.6	İskelet gelişiminde rol oynayan genlerin S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerde osteojenik indüksiyon sonrası kat değişimleri ve p değerleri	62
Çizelge 3.7	Kemik mineral metabolizmasında rol oynayan genlerin S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerde osteojenik indüksiyon sonrası kat değişimleri ve p değerleri.....	64
Çizelge 3.8	Hücreler arası maddenin yapımında rol oynayan genlerin S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerde osteojenik indüksiyon sonrası kat değişimleri ve p değerleri.....	65
Çizelge 3.9	Hücre adezyonunda rol oynayan genlerin S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerde osteojenik indüksiyon sonrası kat değişimleri ve p değerleri	66
Çizelge 3.10	Büyüme faktörü genlerinin S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerde osteojenik indüksiyon sonrası kat değişimleri ve p değerleri	67

MULTİPL MİYELOMLU HASTALARDAN ELDE EDİLEN KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK FARKLILAŞMA KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ

Ayça AKSOY

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Eş Danışman: Prof. Dr. Erdal KARAÖZ

Multipl miyelom, kemik iliğinde malignant plazma hücrelerinin çoğalımla karakterize bir plazma hücre neoplazisidir. Multipl miyelom insanların yaşadığı coğrafya, sosyo-ekonomik şartlar ve etnik kökene göre değişiklik gösteren bir kanser türü olmasının yanında diğer kanser türlerinde olduğu gibi hücrelerin genetik yapılarındaki değişimler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Erkeklerde kadınlara oranla daha sık rastlanan bu hastalık Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya başta olmak üzere tüm dünya genelinde yaygın olarak görülmektedir. Multipl miyelomda, kemik ağrısı ve kırıklarının gözlendiği osteolitik kemik lezyonlarıyla sonuçlanana yıkıcı bir kemik hastalığı da gelişmektedir. Hastalarda oluşan kemik kırıkları ve yoğun kemik ağrıları hastalığın ilerleyen evrelerinde veya tedavi süreci içerisinde hayat kalitelerini oldukça düşürmektedir. Normal fizyolojik koşullarda kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinden

osteoblastların farklılaşmasıyla kemik yapımı ve osteoklastik aktivite aracılığıyla kemik yıkımı denge halindedir. Multipl miyelom hastalarında ise kemik iliği mikroçevresindeki plazma hücrelerinin salgıladığı çeşitli faktörler tarafından indüklenen osteoklastik aktivitenin artması ve osteoblastik aktivitenin azalması, kemik yapım-yıkım dengesini bozmaktadır. Bunun bir sonucu olarak tümör gelişimi esnasında kemik lezyonları artmaktadır.

Günümüzde multipl miyelom kemik hastalığının tedavisinde kullanılan bisfosfanatlar osteoklastların aktivitelerini inhibe etmekte ve apoptozunu uyarmaktadır. Bunun yanında, osteoklastogenezi engelleyerek osteoklast öncüllerinin oluşumunu inhibe etmektedir. Ancak kemik iliğindeki mezenkimal kök hücrelerden osteoblastların oluşumu ve kemik yapımının artırılmasına yönelik tedavi stratejileri henüz yetersizdir. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kendini yenileme ve kemik, kıkırdak, kas ve yağ hücrelerine farklılaşma kabiliyetleri bilinmektedir. En son gerçekleştirilen çalışmalarda, multipl miyelom hastalarından elde edilen kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin *in vivo* ve *in vitro* olarak osteojenik farklılaşma bozuklukları olduğu belirlenmiştir. Multipl miyelom hastalarının kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin osteoblastlara farklılaşma kabiliyetlerinde ki bu kayıp, kemik deformasyonlarının nedeni olarak açıklanabilmektedir. Ancak günümüze kadar multipl miyelom kemik hastalığında osteoblastogenezdeki bu bozukluklar tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle, multipl miyelom hastalarında kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin *in vitro* osteojenik farklılaşma yollarındaki moleküler mekanizmaların ve gen ifadelerinin ayrıntılı incelenmesi, kemik hastalığının patogenezinin anlaşılmasında ve dolayısıyla hedefe yönelik yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde oldukça önemlidir.

Günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalarda multipl miyelom plazma hücrelerinin kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik farklılaşması üzerindeki olumsuz etkilerini belirlemek amacıyla, ortak kültür sistemleri kullanılarak kemik iliği mikroçevresi *in vitro* ortamda taklit edilmektedir. Gerçekleştirilen çalışmalar, kemik iliği mikroçevresi olmaksızın multipl miyelom kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin sağlıklılarından fenotipik olarak farklı olduğunu ve osteojenik farklılaşma kapasitelerinin düşük olduğunu göstermektedir. Ancak mikroçevrenin etkisi olmaksızın kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik indüksiyon sonrasında osteojenik yollarda rol oynayan gen ifadelerinin ayrıntılı olarak incelendiği bir çalışma literatürde henüz bulunmamaktadır. Kemik yapımından sorumlu olan osteoblastların, multipl miyelom kemik hastalığında mikroçevrenin etkisi olmaksızın *in vitro* koşullardaki davranışlarının belirlenmesi ileride gerçekleşmesi olası kök hücre tedavileri veya rejeneratif tıp yaklaşımları için önemlidir. Aynı zamanda kemik iliği mikroçevresinin önemli bir kısmını oluşturan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin multipl miyelom hastalarındaki *in vitro* karakterizasyonları tümör sağkalımı ve yayılımında da önemli bulgular elde edilmesine öncü olacaktır.

Bu hedefe yönelik olarak amacımız, multipl miyelom hastalarından elde edilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin mikroçevrenin etkisi olmaksızın *in vitro* osteojenik indüksiyon öncesinde ve sonrasında osteojenik yollarda rol oynayan gen ifadelerinin analiz edilmesidir.

Bu amaçla sağlıklı donörlerden ve multipl miyelom hastalarından kemik iliği mezenkimal kök hücreleri elde edilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin karakterize edilmesinden sonra hücreler, gen ifadelerinin ve alkalen fosfataz aktivitelerinin

incelenmesi amacıyla osteojenik farklılaşmaya indüklenmiştir. Alkalen fosfataz aktivitesi tayini 4., 7., 14. ve 21. günlerde ölçülerek sağlıklı ve multipl miyelom grupları karşılaştırılmıştır. Gen ifade analizlerinde özel olarak osteojenik farklılaşma için üretilmiş gerçek zamanlı PZR plakaları kullanılmıştır. Osteojenik indüksiyonun öncesinde ve otuz gün sonrasında osteojenik farklılaşma yolağında rol oynayan genlerin ifadeleri analiz edilmiştir. Veriler istatistiksel olarak eşli *t-test* kullanılarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre multipl miyelom grubunda tüm günlerde ALP aktivitesinin sağlıklılara göre anlamlı olarak düşük olduğu tespit edilmiştir. Gen ifade analizleri karşılaştırıldığında ise sağlıklılara göre MM'da osteojenik yolaklarda rol oynayan 8 genin anlamlı derecede farklı olduğu belirlenmiştir. Bu genlerden *BMP4*, *CSF1*, *ICAM1* ve *VDR* ifadeleri multipl miyeloma grubunda osteojenik indüksiyon sonrasında anlamlı derecede artış gösterirken; *COL3A1*, *ITGB1* ve *VEGFA* gen ifadeleri anlamlı olarak azalmıştır. Ayrıca *TWIST1* gen ifadesi sağlıklı mezenkimal kök hücrelerde osteojenik indüksiyon sonrası anlamlı derecede artış gösterirken, multipl miyelom grubunda değişmemiştir.

Sonuç olarak elde edilen bulgular ile multipl miyelom hastalarında kemik iliğindeki tümörojenik mikroçevrenin etkisi olmaksızın, *in vitro* osteojenik indüksiyonları sonrasında mezenkimal kök hücrelerinin alkalen fosfataz aktivitelerinin sağlıklılara göre düşük oluşu ve osteojenik farklılaşmayla ilişkili gen ifade farklılıklarının multipl miyelomdaki kemik defektleri ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Multipl miyelom, kemik hastalığı, mezenkimal kök hücreler

ABSTRACT

OSTEOGENIC DIFFERENTIATION POTENTIAL OF MULTIPLE MYELOMA PATIENTS DERIVED BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS

Ayça AKSOY

Department of Bioengineering

PhD. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Co-Adviser: Prof. Dr. Erdal KARAÖZ

Multiple myeloma is a plasma cell neoplasia characterized by proliferation of malignant plasma cells in the bone marrow. Multiple myeloma is a kind of cancer; same as the other cancer types, resultant of genetic changes of the cells variants of geography, socio-economic conditions and ethnic origin of human. This disease is more common in men than women which commonly seen across the globe, particularly in Europe, North America and Australia. In multiple myeloma, development of a destructive bone disease that results osteolytic bone lesions, bone pain and fractures is observed. Bone fractures and intense bone pain in later stages of the disease or in treatment process, are considerably reduces the quality of life of patients. Under normal physiological conditions, osteoblast formation and differentiation from bone marrow mesenchymal stem cells and bone resorbtion through osteoclastic activity are in balance. However in multiple myeloma patients, an imbalance between osteoblastic and osteoclastic activity

was present, which is induced by numerous inhibitory factors secreted by plasma cells into bone marrow microenvironment. During tumor progression, bone lesions increase consequently.

Up to date, bisphosphonates which uses for the treatment of multiple myeloma bone disease, inhibits the activity of osteoclasts and induces them to apoptosis. Furthermore, by inhibiting osteoclastogenesis the formation of osteoclasts precursors are inhibited. However, in multiple myeloma, the formation of osteoblasts from mesenchymal stem cells in the bone marrow and bone formation is still unclear for the improvement of treatment strategies. The capability of self-renewal and differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells into bone, cartilage, muscle and fat cells are well known. *In vivo* and *in vitro* osteogenic differentiation and proliferation abnormalities of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma have been shown in latest studies. The loss of differentiation capacity of bone marrow mesenchymal stem cells of multiple myeloma patients into osteoblasts might explain the reason for bone deformations. The comparative gene analysis promise better knowledge in molecular pathways of osteogenic differentiation progress between the normal and diseased cells after *in vitro* osteogenic differentiation without the influence of microenvironment.

Until today, the studies performed co-culture systems for mimicing bone marrow microenvironment *in vitro* to determine negative effects of multiple myeloma plasma cells on bone marrow-derived mesenchymal stem cells osteogenic differentiation. These studies show multiple myeloma bone marrow derived mesenchymal stem cells are different from healthy donors with their phenotype and their osteogenic differentiation capacities' looseness. However, without the influence of the microenvironment, the genes which play roles in osteogenic pathways after osteogenic induction of bone marrow derived mesenchymal stem cells have not report in the literature yet. Osteoblasts responsible for bone formation in multiple myeloma bone disease without the influence of the microenvironment, *in vitro* determination of behavior likely to happen in the future of stem cell therapy or regenerative medicine approaches are important. At the same time constitutes a significant portion of the bone marrow microenvironment of bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* characterization of multiple myeloma patients in the survival and invasion of the tumor to obtain significant findings will be pioneers.

Our aim for this goal is to analyze the gene expressions of bone marrow mesenchymal stem cells derived from multiple myeloma patients, without the influence of the microenvironment, before and after *in vitro* osteogenic induction osteogenic pathways.

For this purpose, bone marrows obtained from healthy donors and multiple myeloma patients in order to isolate mesenchymal stem cells. After the characterization of the mesenchymal stem cells, osteogenic induction will be performed in order to compare the gene expressions of the cells before and after of osteogenic induction. This analyses completed by Real Time PCR using expression arrays specially designed for osteogenic differentiation. The gene expressions which are important in osteogenic differentiation pathways were analysed. Data were statistically evaluated using the paired *t-test*.

The results demonstrate that ALP activity was lower in multiple myeloma group. We compared expressions of genes that play roles in osteogenic pathway between healthy donors and multiple myeloma mesenchymal stem cells and the levels of 8 genes were

significantly different expressed in multiple myeloma mesenchymal stem cells. From these genes; *BMP4*, *CSF1*, *ICAMI* and *VDR* expressions showed a significantly increase in multiple myeloma group after osteogenic induction. But, *COL3A1*, *ITGB1* and *VEGFA* genes significantly decreased. Besides this, *TWIST1* gene expression significantly increased in healthy donors after osteogenic induction, but did not change in multiple myeloma group.

In conclusion the results have shown that the difference of osteogenic gene expressions of in multiple myeloma bone marrow mesenchymal stem cells and defect of alkaline phosphatase activity may be related with osteogenic disorders of multiple myeloma in addition to presence of other tumorigenic microenvironment of bone marrow.

Keywords: Multiple myeloma, bone disease, mesenchymal stem cells

YILDIZ TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

1.1 Literatür Özeti

Multipl miyelom (MM), malignant plazma hücrelerinin kemik iliğinde çoğalmasıyla karakterize bir plazma hücre neoplazisidir [1]. MM hastalarında plazma hücrelerinin kemik iliğinde birikimi ve yayılması ile beraber kemik ağrısı ve kırıklarının da gözlendiği yıkıcı bir kemik hastalığı görülür. Normal fizyolojik koşullar altında, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinden (Kİ-MKH) osteoblastların farklılaşması ile kemik yapımı ve osteoklastik aktivite aracılığıyla kemik yıkımı bir denge halindedir. MM hastalarında, kemik iliği mikroçevresindeki plazma hücreleri tarafından salgılanan çeşitli inhibitör faktörler osteoblastik ve osteoklastik aktivite arasındaki dengeyi bozmakta ve kemik lezyonlarının oluşumuna neden olmaktadır [2]. Bununla birlikte, tümör gelişimi arttıkça kemik lezyonları da artmaktadır [3].

MKH'lerin *in vivo* ve *in vitro* olarak kendini yenileme; kemik, kıkırdak, kas ve yağ hücrelerine farklılaşma özellikleri bulunmaktadır [4]. Kİ-MKH'lerinin kemik iliğindeki temel görevi olan kemik yapımı, MM hastalığında çeşitli faktörlerin etkisi altında bozulmaktadır. Gerçekleştirilen çalışmalarda, MM hastalarından elde edilen Kİ-MKH'lerinin *in vivo* ve *in vitro* koşullarda osteojenik farklılaşma anomalilerinin olduğu gösterilmiştir [2]. MM hastalarında Kİ-MKH'lerinin osteoblastlara farklılaşma kabiliyetlerindeki bu kayıpla birlikte artan osteoklastik aktivite, oluşan kemik lezyonlarının nedeni olarak açıklanabilmektedir[2].

MM hastalığında osteoblastogenezi farklı yollarla durduran birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerin çoğu MM plazma hücreleri tarafından salgılanan faktörlerdir. [5], [6]. Gerçekleştirilen çalışmalarda MM hücrelerinin salgıladıkları inhibe

edici faktörlerin olmadığı *in vitro* ortamda bile MM hastalarından elde edilen Kİ-MKH'lerinde osteojenik farklılaşma defektlerinin olduğu gösterilmiştir. Todoerti ve arkadaşlarının [7] yaptığı bir çalışmada MM hastalarından ve sağlıklı donörlerden elde edilmiş MKH'lerin ve osteoblastların gen ifade profilleri karşılaştırılmıştır. MM hastalarından ve sağlıklı vericilerden elde edilen MKH'ler ve osteoblastlar arasında fenotipik olarak farklılıklar bulunmasının yanı sıra Wnt yolağı inhibitörü olan DKK1 ifade seviyelerinin osteolitik lezyonlar saptanan MM hastalarında yüksek olduğu gösterilmiştir [7]. Gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise, MM hastalarından elde edilen MKH'lerde uzamış kültür periodlarında plastisiteye bağlı olarak DKK1 ve IL-6 gibi genlerin ifade profillerinin değiştiği gösterilmiştir [8]. Buna ek olarak MM hastalarından elde edilen MKH'lerin *in vitro* osteojenik indüksiyon sonrasında mineralize nodül oluşturma ve matür osteoblastlara dönüşme kapasitesinin yetersiz olduğu gözlenmiştir [9], [10].

MM hastalığının tedavi sürecinde uygulanan radyoterapi ve kemoterapik ajanların yanında hastalarda oluşan kemik lezyonlarının ilerlemesinin önlenmesi veya tedavisinde bazı ilaçlar kullanılmaktadır [11], [12]. Ancak bu ilaçlar MM kemik hastalığını kısmi olarak durdurmakta, kalıcı ve devamlı bir tedavi sağlayamamaktadır. Günümüzde, *in vivo* veya *in vitro* olarak normal kemik yapım mekanizmalarının tam olarak aydınlatılamaması, kemik hastalıklarının patogenezinin belirlenmesinde önemli bir engel oluşturmaktadır. Bunun yanında, MM kemik hastalığının patogenezinin aydınlatılması bu hastalığın tedavisinde uygulanacak yöntemlerin ya da ilaçların belirlenebilmesi için oldukça önemlidir. Bu hedef doğrultusunda gerçekleştirilen çalışmalar, kemik oluşumu mekanizmalarında rol oynayan genler ve yolaklar üzerine yoğunlaşmaktadır [13], [14]. Son yıllarda araştırmacılar, bu genlerin tanımlanması ve MM kemik hastalığındaki rollerinin ortaya koyulması amacıyla Kİ-MKH'lerinin *in vitro* osteojenik farklılaşma kapasiteleri üzerine yoğunlaşmışlardır [10].

MM plazma hücrelerinin Kİ-MKH'lerinin osteojenik farklılaşması üzerindeki olumsuz etkilerini belirlemek amacıyla, ortak kültür sistemleri kullanılarak kemik iliği mikroçevresi *in vitro* ortamda taklit edilmektedir [13]. Gerçekleştirilen çalışmalar, kemik iliği mikroçevresi olmaksızın MM-Kİ-MKH'lerinin sağlıklı Kİ-MKH'lerinden fenotipik olarak farklı olduğunu ve osteojenik farklılaşma kapasitelerinin düşük

olduğunu göstermektedir [15]. Ancak günümüze kadar MM kemik hastalığının patogenezi hala belirlenememiştir.

1.1.1 Kemik Doku Oluşumu (Ossifikasyon)

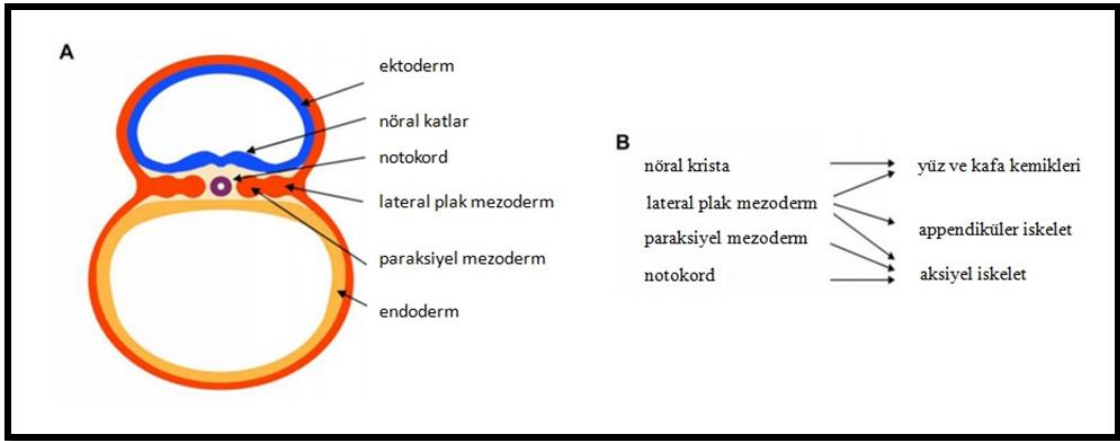
Omurgalılarda iskelet oluşumu, embriyoda ektoderm ve mezodermden kaynaklanan multipotent MKH'lerin vücuttaki özel bölgelere göç etmesiyle başlar. MKH'ler kıkırdak (kondrosit), kemik (osteosit) veya eklem hücreleri (artiküler kondrositler ve sinovial hücreler) gibi birçok iskelet hücresine dönüşürler. Primer iskelet bütünüyle kıkırdak yapıdadır. Bu iskelet fetal ve postnatal gelişim boyunca çok hızlı bir şekilde büyür ve yerini kemik iskelet alır. Bu sürece endokondral ossifikasyon (kemikleşme) adı verilir. Beraberinde, eklemler ve diğer kemikler de gelişir. Kıkırdak ara geçişi olmaksızın MKH tabanlı kemik gelişim sürecine ise intramembranöz ossifikasyon adı verilir [16] [17].

İskelet gelişiminde rol oynayan birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar; hormonlar, büyüme faktörleri, reseptörler, sinyal mekanizmalarına aracılık eden moleküller, transkripsiyon faktörleri, ekstrasellüler matriks bileşenlerinin ve enzimlerin de bulunduğu karmaşık bir mekanizmayı oluşturmaktadırlar. İskelet gelişimdeki ilk basamak bu faktörlerin çeşitli mekanizmalarla iskeleti oluşturacak olan hücrelerin göçünü ve oluşumlarını başlatmasıdır [16], [17].

İnsanda, döllenmeden sonraki yaklaşık üçüncü haftada embriyo üç germ yaprağından (ektoderm, mezoderm ve endoderm) oluşmaktadır. Bu germ yapraklarından ektoderm nöral tüpü oluştururken; mezoderm notokordu; paraksiyel mezoderm ve lateral plak ise diğer organların gelişimleriyle beraber iskeleti de oluşturmaktadır (Şekil 1.1) [16]. Nöral krista, nöral tüpten tabakalar halinde ayrılarak epitelyal-mezenkimal transformasyon gösterip, embriyoda birçok bölgeye göç eden hücreler topluluğundan oluşmaktadır. Nöral krista hücreleri, nöral hücreler, melanositler ve iskelet hücreleri gibi birçok hücre tipini oluşturduktan sonra, baş ve boyunu oluşturacak iskelet elemanlarını oluştururlar [16], [17].

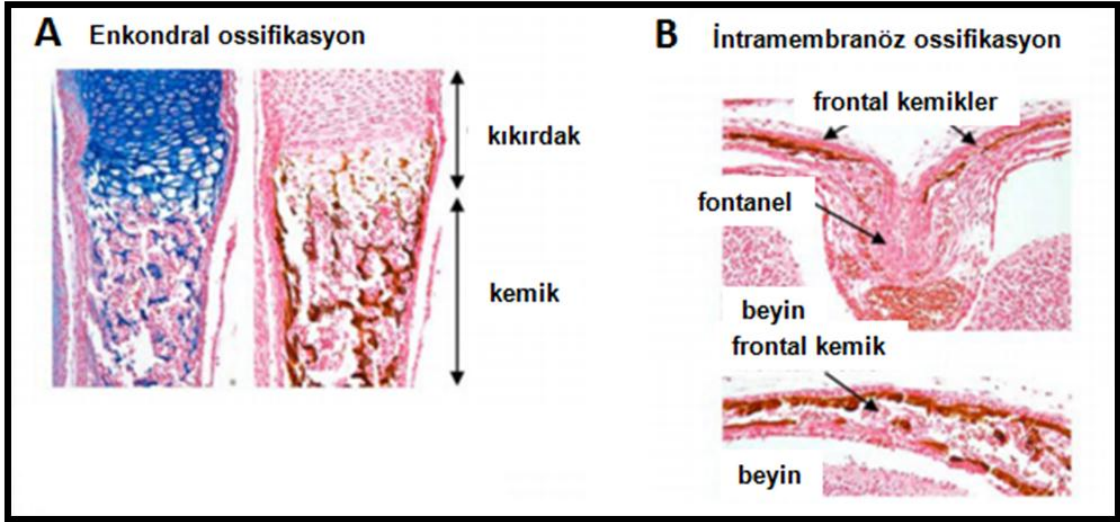
Mezodermin lateral kısmından diğer kraniyofasiyel iskelet yapıları, eklemlerli iskelet elemanları (apendiküler iskelet), sternum ve iskelet dışı yapılar oluşur. Paraksiyel mezodermden somit adı verilen ve daha sonra dermomyotomlara ve sklerotomlara

oluşturacak olan yapılar gelişir. Omurga ve kaburgalar notokordun etrafında oluştuktan sonra, omurga notokordtaki hücrelerin fenotiplerini değiştirmesine; intervertebral boşluklara göç etmelerine ve aynı zamanda intervertebral disklerde nükleus pulpozus gelişimine aracılık eder. İskelet kısımlarına göç etmeden önce nöral krista ve mezoderm hücreleri birçok faktör tarafından kontrol edilerek yönlendirilmektedir. Nöral krista ve mezoderm kaynaklı hücreler iskelet kısımlarına yerleştikten sonra kollajen tip 1, fibronektin ve hyaluronan bakımından zengin bir matriks üretirler ve burada zamanla çoğalıp, farklılaşarak nihai iskeletin şekillenmesi için kontrollü mekanizmalarla ölürler. Bu hücreler özel koşullar altında osteoblast ve kondrosit gibi hücreleri oluşturacak olan osteokondro-progenitörlere farklılaşırken, hücrelerin bir kısmı ise sinovial hücreleri, tenositleri, kemik iliği stromal hücrelerini, endotelial hücreleri ve olasılıkla mezenkimal hücreleri oluştururlar. Daha sonra kırıkta taslakları ve büyüme plakaları oluşmaya başlar (Şekil 1.2) [16], [17].



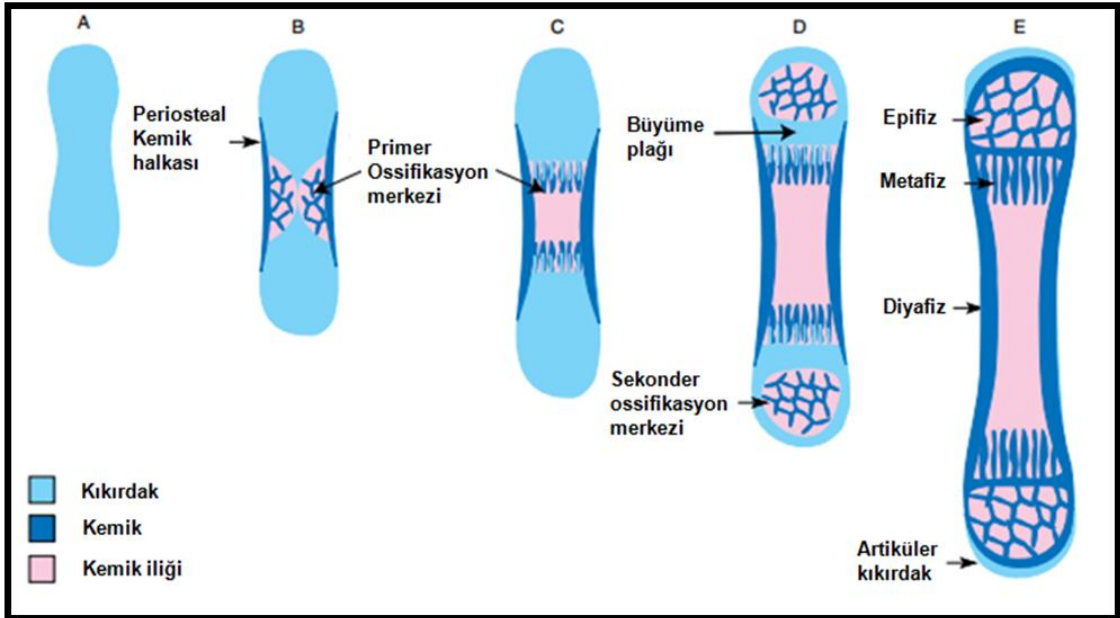
Şekil 1.1 Omurgalı embriyosunda iskelet hücrelerinin kökeni [16]

İskelet kemikleri encondral ve intramembranöz ossifikasyon adı verilen temel olarak iki farklı süreçte gelişirler. İntramembranöz kemikleşme kafatası düz kemiklerinde embriyonik mezenkimal hücrelerin doğrudan osteoblastlara farklılaşması ile gerçekleşir. Encondral kemikleşme süreci ise vücuttaki diğer kemiklerde meydana gelmektedir (Şekil 1.2) [17].



Şekil 1.2 Enkondral (A) ve intramembranöz (B) ossifikasyon [17]

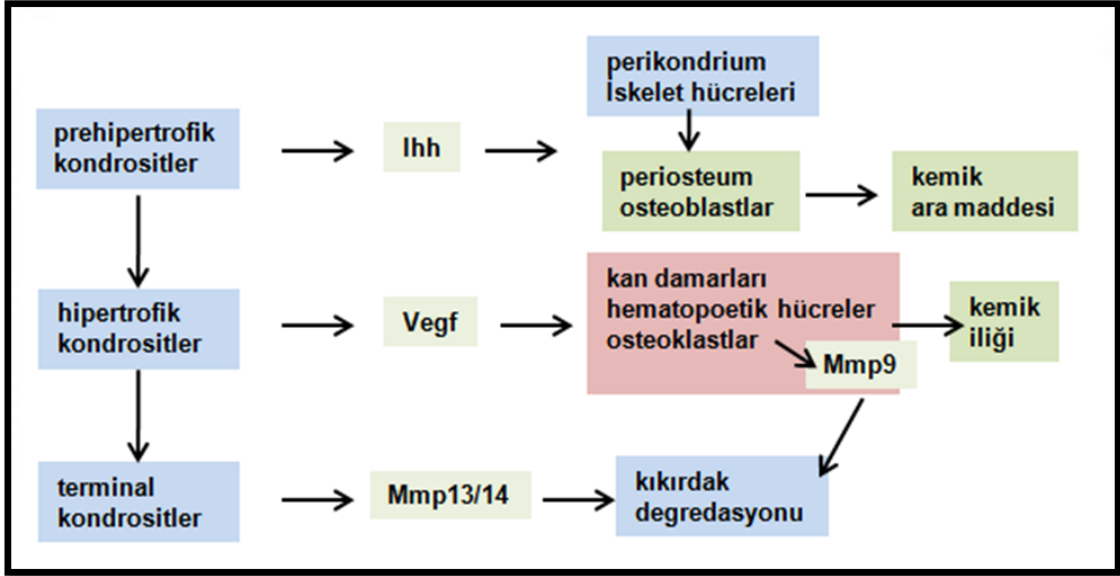
Enkondral kemikleşme, temel olarak kıkırdak büyüme tabakasının yerini kemik dokunun alması olayıdır. İlerideki kemikleri oluşturacak olan kıkırdak modeli, embriyonik mezenkimal hücrelerin toplanarak kondrositlere farklılaşması sonucunda kollajen tip II ve proteoglikanları içeren hücreler arası matriksi sentezlemesi ile oluşur. Kıkırdak modelin ossifikasyonu kemiğin orta eksenindeki kondrositlerin hipertrofisi ile başlar ve periosteal kemik halkası etrafında yeni oluşan osteoblastların farklılaşması ile gerçekleşir [17].



Şekil 1.3 Enkondral ossifikasyonda kemik gelişimi [16]

Büyüme tabakalarının sonuna doğru terminal kondrositler ölürken, lakünaları kemik oluşturacak olan bir kısım hücreler tarafından istila edilir. Bu sırada osteoklastlar kıkırdak matriksinin yok edilmesinde rol oynarken; osteoblastlar kemik matriksini yapmaya başlar. Endotelial hücreler yeni oluşan dokunun vaskülarizasyonunu sağlarken, hematopoetik ve stromal hücreler kemik iliğini oluştururlar. Ayrıca kondrositler de bu sürece aktif olarak katılmaktadırlar. Prehipertrofi sırasında kondrositler tarafından üretilen IHH (Indian hedgehog homolog) perikondriumdaki osteoblast oluşumunu indükler ve bu aşamadan sonra tabaka artık periosteum adını alır. Hipertrofi sırasında ise kondrositler vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) üreterek gelişen kemikte kan damarlarının oluşumunu tetiklerler. Ayrıca yine bu süreçte kıkırdak hücreleri, MMP13 ve MMP14 üreterek, kıkırdak matriksinin degrade edilebilmesi için osteoklastların MMP9 üretmesini tetiklerler. Kondrositlerin kemik oluşumu süreci sonunda ölmelerini sağlayan mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, kemik oluşumu tamamlanmadan bu olayın gerçekleşmemesi, encondral kemikleşme sürecinde kemik hücreleri ve kıkırdak hücrelerinin yakın etkileşimlerinin olduğunu göstermektedir. Fetal uzun kemiklerin diyafizinde bu şekilde kemik dokusunun oluşumuna primer ossifikasyon merkezi adı verilir. Sekonder merkezler ise postnatal olarak epifizde aynı şekilde oluşurlar [16].

Primer ve sekonder ossifikasyon merkezi arasında kalan kıkırdak büyüme plakası kemiklerin boyuna uzamasından sorumludur. İskelet gelişimi primer ossifikasyon merkezi ile sekonder ossifikasyon merkezinin birleşmesiyle sona erer ve büyüme plakası yok olur. Encondral ossifikasyon fetal hayatta başlayarak, erken erişkinliğe kadar devam etmektedir (Şekil 1.4) [17].



Şekil 1.4 Enkondral ossifikasyonda rol oynayan hücreler ve etkileşimleri [17]

1.1.2 Osteoblast Farklılaşmasında Rol Oynayan Transkripsiyon Faktörleri ve Moleküler Mekanizmalar

Mezenkimal progenitörlerden osteoblast hücrelerinin farklılaşması bazı özel transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ve moleküler mekanizmaları ile gerçekleşmektedir. Bu transkripsiyon faktörleri eksprese edildikten sonra farklılaşma süreci içerisinde belirli zamanlarda fonksiyon göstermektedirler [18].

1.1.2.1 SOX9 (SRY ilişkili HMG box 9)

Kondrogenez için gerekli bir transkripsiyon faktörü olan SOX9, osteoblastları oluşturan mezenkimal progenitörlerde belirlenmesinin yanında matür osteoblastlarda ifade edilmemektedir [18].

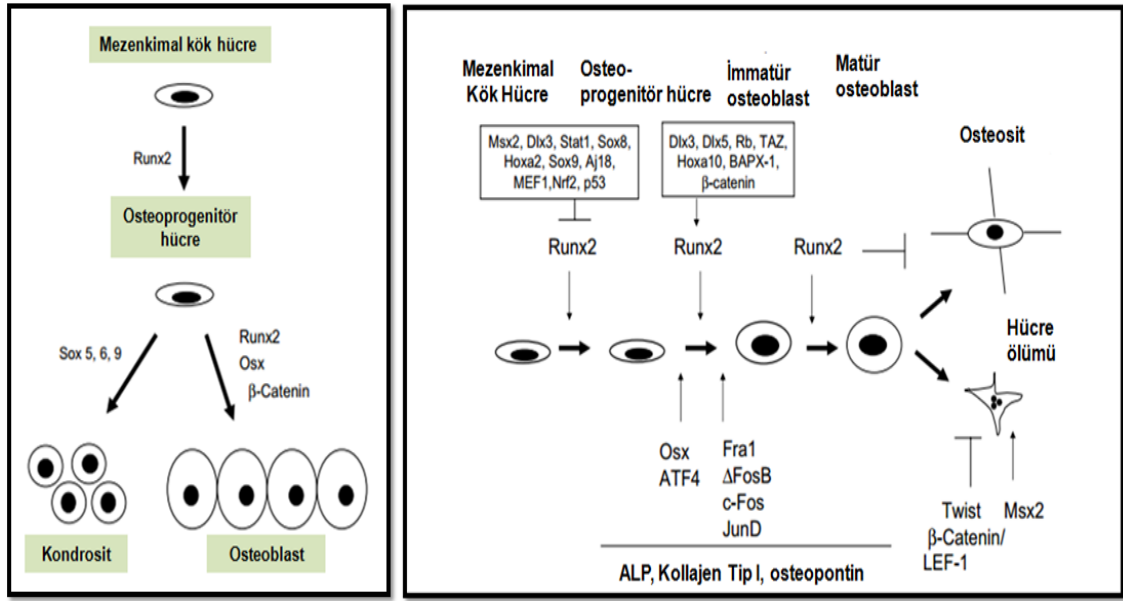
Osteoblastların farklılaşmasında SOX9'un rolü tam olarak aydınlatılmamıştır. Ekstremitte tomurcuğu mezenkimindeki hücrelerden *SOX9* geninin silinmesi kondrosit ve osteoblastların oluşumunun durmasına neden olmaktadır. Fakat bu osteoblast kaybının, buradaki hücrelerin doğrudan SOX9'a ihtiyaç duymasından kaynaklanmasının yanında kıkırdak yokluğuna bağlı olarak sekonder olarak oluştuğu da düşünülmektedir. Buna karşılık *SOX9* kraniofasiyel iskelete katılan nöral krista hücrelerinden silindiğinde ise hücreler osteoblast belirteçlerini ifade etmek yerine normal kondrositleri oluşturmuşlardır. Bu durum, bipotent hücrelerin hangi tip hücreye

farklılaşacağına göre değiştiğini göstermektedir. Ekstremitte tomurcuğu mezenkiminde ve nöral krista hücrelerinde *SOX9* delesyonunun farklı sonuçlarının sebebi tam olarak bilinmemektedir. Bu sonuçların nedenlerinden biri, olasılıkla ekstremitte mezenkiminden *SOX9* bipotent progenitörler oluşmadan önce silinmesidir. Diğer alternatif sonuç ise, nöral krista hücrelerinin bipotent özelliği *SOX9*'dan bağımsız olarak da oluştuğudur. Ayrıca *SOX9*, hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasının engellenmesinde de önemli roller oynamaktadır [18].

Gelişim sürecinde kondrogenez, *SOX9* ve Wnt/ β -Katenin sinyal yolağı arasındaki etkileşimlerle kontrol edilmektedir. Fare embriyolarında kondrositlerde *in vivo* olarak *SOX9*'un fazla ifadesi veya β -Katenin'in inaktivasyonu benzer fenotipte dwarfizme sebep olmaktadır. Bunun sonucunda kondrosit proliferasyonu azalmış, hipertrofik kondrosit farklılaşması ve enkondral kemik oluşumu durmuştur. Ayrıca yine *SOX9*'un inaktivasyonu veya β -Kateninin stabilizasyonu sonucu benzer kondrodisplazilere rastlanmaktadır. *SOX9*, β -Katenin degradasyonunu stimüle ederken ayrıca β -Katenin bağımlı promotorların aktivasyonunu inhibe etmektedir. Bunun yanı sıra β -Katenin ile *SOX9*'un C-terminal trans aktivasyon bölgesinin fiziksel olarak etkileşimleri de gösterilmiştir [19].

1.1.2.2 Runx2/Cbfa1

Runx2 osteoblast ve kondrosit farklılaşmasında önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Runx ailesi Runx1, Runx2 ve Runx3 transkripsiyon faktörlerinden oluşur. Bu transkripsiyon faktörleri C/EBP ile heterodimer oluştururlar ve TGPyGGPyPy konsensus dizisine bağlanırlar. Runx2 FGF, Wnt, IHH ve SP7 gibi majör sinyal yolları ile birlikte kemik gelişimi boyunca osteoblast farklılaşmasında rol oynar (Şekil 1.5) [20].



Şekil 1.5 MKH'lerin kondrojenik (A) ve osteojenik (A-B) farklılaşma sürecinde rol oynayan transkripsiyon faktörleri [20]

Runx2 ve Runx3 kondrosit hipertrofinde de önemli moleküllerdir. Runx2, Runx3'e göre daha fazla ifade edildiğinden Runx2'den yoksun fareler, Runx3'den yoksun olanlara göre daha fazla kıkırdak defekti göstermektedirler. Bundan dolayı Runx2 kondrosit hipertrofinde daha baskın bir moleküldür [21].

MKH'lerden osteoblastların yapımı ve farklılaşması Runx2/Cbfa1 transkripsiyon faktörünün aktivitesine ve fonksiyonuna bağlıdır. Runx2/Cbfa1, Osterix gibi diğer transkripsiyon faktörleriyle birlikte etki göstererek kemik yapımını indüklemektedir. Runx2/Cbfa1'den yoksun farelerde osteoblastlar oluşmamakta ve dolayısıyla kemik yapımı da olmamaktadır. Buna karşılık Runx2'nin fazla ifadesi kemik yapımını bozmaktadır [22].

İnsan osteoblast farklılaşması ilk olarak Runx2/Cbfa1'in protein seviyesinde bir değişiklik olmadan artması ile başlar. Runx2/Cbfa1'in aktivasyonu ile beraber kemik iliğindeki stromal ve osteoblastik hücrelerden bazı osteoblast belirteçlerinin ifadesi indüklenmektedir. Bunlar tip I kollajen, alkalen fosfat (ALP) ve osteokalsin (BGLAP) gibi osteoblast matürasyonunun değişik aşamalarında ifade edilen belirteçlerdir (Şekil 1.5) [22]. Kemik gelişiminin erken aşamalarında ALP hücre yüzeyinde veziküller halinde matrikste bulunmaktadır. Osteogenenezde rol oynayan BGLAP gibi diğer genlerin ifadesinin artması ile doğru orantılı olarak ALP ifadesi de azalmaya başlar [23].

ALP gen ifadesi BMP/Runx2, osteriks ve WNT sinyal yollarının çeşitli etkileşimleriyle kontrol edilmektedir [24], [25]. *ALP* ifadesini kontrol eden diğer mekanizmalarda ise 1,25-(OH)₂-Vitamin D, retinoik asit ve PTH'un çeşitli düzenleyici sistemlerle etkileşmesi sonucunda *ALP* ifadesini düzenler [26], [27], [28], [29], [30], [31], [32]. *ALP* erken kalsifikasyon aşamasında ifade edilen ilk fonksiyonel gen olduğundan osteogenezdeki en önemli rollerinden biri de erken aşamalarda mineralizasyonu sağlamaktır [23].

Osteoblastik farklılaşma, AP-1 (Aktivatör protein-1) gibi birçok molekülün Runx2/Cbfa1 ile etkileşmesi sonucunda düzenlenmektedir. Runx2/Cbfa1 kendini fosforilleyerek regüle olur ve diğer transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek (Smad proteinleri, Hey-1 gibi) fonksiyon göstermektedir [22].

Osteoblastik farklılaşmada majör transkripsiyon faktörü olarak tanımlanan Runx2, iskelet gelişimi sırasında MKH'lerde ifade edilir ve farklılaşma sırasında osteoblastlarda bulunmaktadır. Matür osteoblastlarda Runx2 fazla miktarda bulunurken, osteoblastik seri hücrelerde hem Runx2 hem de Runx3 bulunmaktadır [20].

Gelişimde ve post-natal hayat boyunca Runx2 kemik gelişiminde rol oynamaktadır. Gerçekleştirilen *in vivo* moleküler çalışmalar ve genetik manipülasyonlar MKH'lerin osteoblast serisi hücrelere farklılaşmalarında Runx2'nin çok önemli bir transkripsiyon faktörü olduğunu göstermiştir. Runx2 transkripsiyon faktörü, tüm osteoblast genlerinin promotorlarında bulunur ve tip 1 kollajen alfa 1 zinciri, osteopontin, kemik sialoprotein ve osteokalsin gibi genlerin ifadelerini kontrol ederek osteoblast fenotipinin oluşumunu sağlar. Osteoblastların yüzeyinde bulunan tip 1 kollajenin, alfa 2 beta 1 integrinlere bağlanmasıyla Runx2 mitojen aktive protein kinaz yolağı (MAPK) ile fosforile olur ve aktifleşir. Runx2 osteoblast farklılaşmasını kontrol eden p85 PI3K gibi kinazların ifadelerini de düzenlemektedir. Gerçekleştirilen son çalışmalarda, Runx2'nin birçok regülatör protein ile etkileşerek osteoblastik proliferasyonu ve farklılaşmayı kontrol eden genlerin aktivasyonunda veya baskılanmasında rol oynadığı ortaya koyulmuştur. Bu durum, Runx2'nin birçok mekanizmayla osteoblastogenezi kontrol ettiğini göstermektedir [20].

Runx2'nin ifadesi ve aktivitesi protein-DNA, protein-protein etkileşimleri ve transkripsiyon faktörleri ile kontrol edilir. Runx2, iskelet modellenmesi regüle eden

Hoax2 transkripsiyon faktörü ile kontrol edilmektedir. Hoax2, Runx2 ifadesini ve dolayısıyla kemik oluşumunu inhibe etmektedir. Bir nükleer matriks proteini olan SATB2 ise Hoax2'nin ifadesini baskılayarak Runx2 bağımlı osteoblast farklılaşmasını aktive etmektedir (Şekil 1.5) [20].

Diğer kompleks mekanizmalar ise Runx2 ifadesini negatif olarak düzenler. STAT1 ve SOX9 gibi transkripsiyon faktörleri Runx2 ile etkileşerek, Runx2'nin transkripsiyonel aktivitesini azaltırlar. SOX8 ise Runx2'nin ifadesini azaltarak osteoblastik farklılaşmada negatif bir regülatör olarak rol oynamaktadır. Ayrıca Runx2 aktivitesini Aj18, myeloid Elf-1 faktör (MEF) ve Nrf2' nin de baskıladığı gösterilmiştir. Ek olarak bir tümör baskılayıcı protein olan p53'ün Runx2'yi negatif olarak regüle ettiği, farelerde gerçekleştirilen bir çalışmada p53'ün baskılanması sonucunda osteoblastik farklılaşmanın aktive olması ile belirlenmiştir (Şekil 1.5) [20] .

Runx2 aktivitesi Rb, TAZ, HOXA10 ve BAPX-1 gibi transkripsiyonel aktivatörlerle pozitif olarak kontrol edilmektedir. Özellikle WW domaini içeren bir molekül olan TAZ direkt olarak Runx2 ile etkileşerek Runx2 bağımlı gen transkripsiyonunu aktive etmektedir. Runx2 bağımlı kemik oluşumunda gerekli en önemli ko-aktivatörlerden biride CBF β 1' dir [20].

Runx2 aktivitesinin diğer bir önemli regülatörü ise TGF- β süper ailesi reseptörlerinin sinyal iletilicileri olan SMAD proteinleridir. Runx2, SMAD1 ve SMAD5 ile sinerjistik olarak kemik spesifik genleri düzenlemektedir. Runx2-Smad kompleksinin önemi osteoblastogenez süresince *hem in vitro* hem de *in vivo* olarak gösterilmiştir. Runx2'yi kontrol eden tüm bu önemli mekanizmalara ek olarak C/EB β , C/EB δ ve Menin de Runx2'nin transkripsiyonel ko-aktivasyonunda tanımlanmıştır [20].

Gerçekleştirilen son çalışmalarda, Runx2'nin histon asetil transferaz aktivitesi ile P300 gibi faktörlerle etkileşerek, kromatin asetilasyon ve deasetilasyonu arasındaki denge sayesinde transkripsiyonel aktivitesinin kontrol edildiğini göstermiştir. Runx2, histon deasetilazlar (HDAC) ile etkileşir ve bu etkileşimler osteoblastik farklılaşmada önemli negatif regülatörlerdir [20].

Runx2 regülasyonu protein stabilitesi seviyesinde de oluşmaktadır. Runx2 proteininin C terminus bölgesindeki PY motifi ile ubikuitin ligaz SMURF1 etkileşerek proteozom ile degradasyonu tetikler. Diğer bir protein Schnurri-3 ise, E3 ubikuitin ligaz WWP1'in

Runx2'ye bağlanması ile degradasyonu tetikleyerek Runx2 protein seviyesini kontrol eder. Osteoblast farklılaşmasının düzenlenmesinde moleküler etkileşimlerin rolü, WW domain proteinlerinin (YAP, TAZ, WWP1-Schnurri kompleksi, SMURF1) keşfiyle önem kazanmıştır. Bu proteinler PPxY motifi aracılığı ile Runx2 ile etkileşerek, Runx2'nin transkripsiyonel aktivitesini veya stabilitesini değiştirirler (Şekil 1.5) [20].

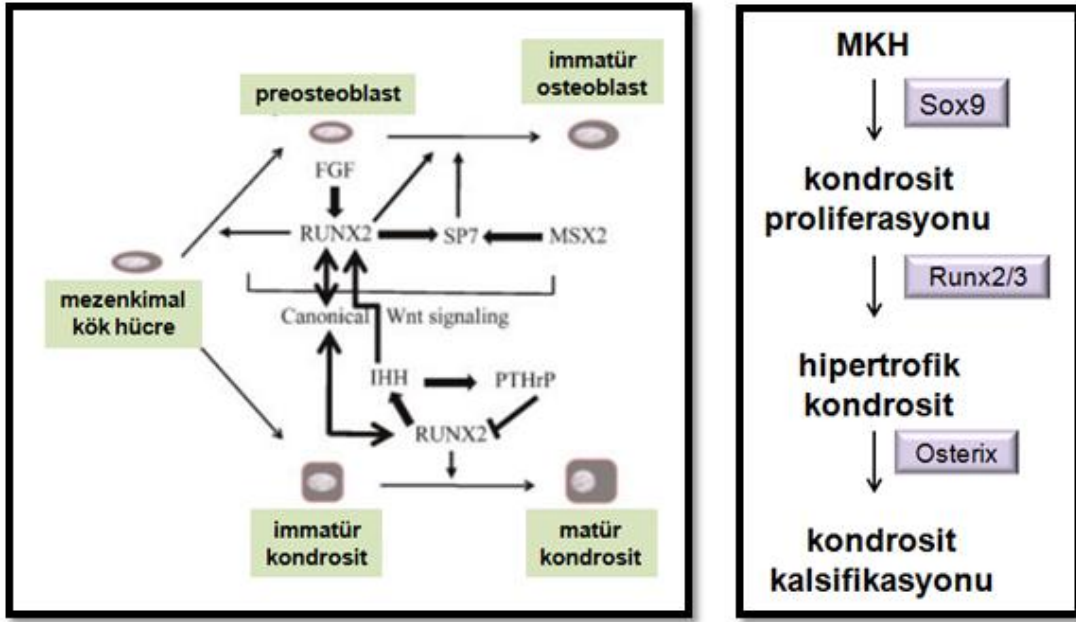
1.1.2.3 SP7/Osterix

Osterix (SP7) Sp/KLF transkripsiyon faktörleri ailesine ait C₂H₂-tipinde çinko parmak içeren ve osteoblastlarda ifade edilen bir proteindir [18], [33].

Runx2'nin fazla ifadesi osterix ifadesini indüklemektedir. Buna ek olarak Smad sinyal yolağı BMP2'nin osterix ile indüklenebilmesi için gereklidir. Ayrıca MSX2 osteriks ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir proteindir. *In vitro* BMP2 uygulaması Msx2'nin fazla ifadesi, Runx2 knockout farelerden izole edilmiş MKH'lerde osterix ifadesinin artmasına neden olmuştur [33], [21]. Runx2 ve osterix aynı osteoblast belirteci genlerin (osteokalsin ve Bsp) ifadelerinin artmasını sağlarken farklı osteoblastik genlerin ifadelerinin artmasını da sağlarlar. Bu sebeple Runx2 ve osterix osteoblast farklılaşması sırasında hem aynı hem de farklı fonksiyonlara sahiptirler [21].

OSX kemik büyüme plaklarında prehipertrofik zonda ifade edilmektedir. OSX knockout farelerde kondrogenез hipertrofik safhada bloke olmaktadır. Bu da SOX9-Runx2/Runx3-osterix yolağının encondral ossifikasyonda önemli bir transkripsiyon yolağı olduğunun göstergesidir [21].

Runx2 hipertrofik kondrositlerin etrafını saran perikondreal alanda yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Buradaki hücreler kıkırdak hücrelerine dönüşürler ve SP7 ifadesi bu hücrelerde rastlanmamaktadır. Buna karşın preosteoblastları oluşturacak perikondreal alanlarda SP7 ifadesinin fazla olması bu molekölün osteoblastogenezde büyük rol oynadığının bir göstergesidir. Sp7 ifadesi ve Sp7 ekifadesinden sonra osteoblast farklılaşması için β -Katenin gerekmektedir [34].



Şekil 1.6 Runx2'nin kondrosit matürasyonunda ve osteoblast farklılaşmasındaki rolü [34]

Sp7 ve Wnt kanonik yolağı hangi MKH'lerin osteoblasta yöneleceğini kondrogenizi bloklayarak belirlerken, RUNX2 bu hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasında ilk görev alan transkripsiyon faktörü olduğunu gösterilmiştir (Şekil 1.6) [34].

SP7 yoksun farelerde osteoblast farklılaşmasının durmasından dolayı kemik oluşumu yoktur. Bu farelerde mezenkimal hücreler perikondreal bölgede toplanmıştır ve kondrosit belirteçlerini ifade ederken kemik matriks proteinlerinin belirteçlerini ifade etmezler. *Runx2+ / SP7-* mezenkimal hücreler (preosteoblastlar) osteoblastlara veya kondrositlere farklılaşabilmektedirler [34].

Osteoblastik farklılaşma süresince SP7 ifadesi, BMP-2 ile düzenlenmektedir. Runx2, SP7'nin yoksun olduğu farelerde ifade olurken, Runx2'nin yoksun olduğu farelerde SP7 ifade olamamaktadır. Bu bulgular SP7'nin osteoblast farklılaşma sürecinde Runx2'nin ifadesini azaltıcı (downstream) bir faktör olarak çalıştığını göstermektedir [34].

BMP ve IGF aracılıklı SP7 ifadesi; MAPK, protein kinaz D yolları ve Runx2 üzerinden olmaktadır [33], [34]. SP7 ifadesi Runx2 bağımlı olduğu gibi Runx2'den bağımsız olarak BMP sinyal yolağı aracılığıyla da olabilmektedir. SP7, Runx2'nin yoksun olduğu mezenkimal hücrelerde Runx2 ile ifadesi azalan birçok genin ifadesini artırarak osteoblast farklılaşmasını promote etmektedir [33].

SP7, COLIA1'in promotor aktivitesini indükleyen aktive T hücreleri nükleer faktör (NFAT) ile kompleks oluşturmaktadır. NFAT'nin aktifleşmesi ise Wnt sinyal yolağını aktive ederek kemik oluşumunu aktive etmektedir. Schnurri-2, SP7'yi negatif olarak düzenlerken, p53 transkripsiyonunu baskılamakta ve osteblastogenezi inhibe etmektedir [20].

1.1.2.4 Wnt/ β -katenin

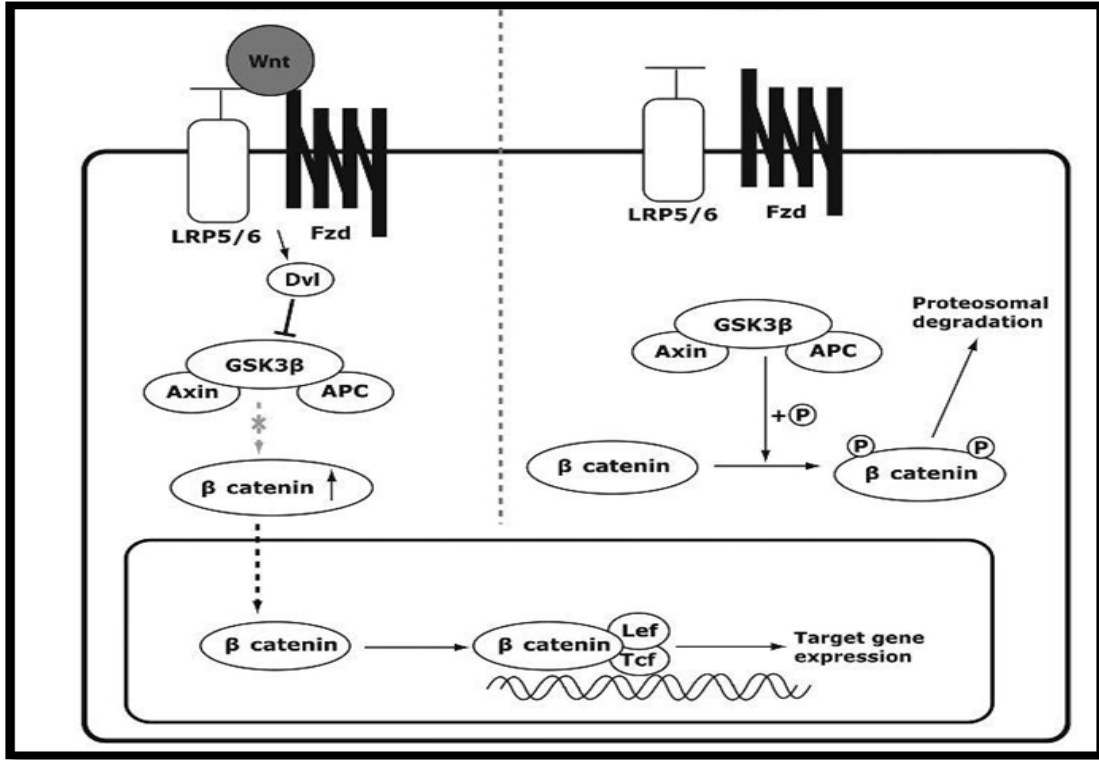
Wnt proteinlerinin hücre büyümesi, hücre adezyonu, hücre hareketi, hücre polaritesi ve farklılaşmasını düzenlediği bilindiği gibi ayrıca hem kök hücrelerinin özelleşmesinde ve değişimlerinde hem de pek çok dokunun embriyonik gelişiminde (özellikle merkezi sinir sistemi, böbrek, meme bezleri ve dokusu, ve ekstremitelerde) önemli rol oynadıkları da gösterilmiştir [35].

Temel olarak 3 çeşit Wnt sinyal yolağı tanımlanmıştır (Şekil 1.7) [36].

1. Wnt/ β -katenin (Kanonik/Klasik) sinyal yolağı
2. Wnt/ Ca^{+2} (Kanonik olmayan) sinyal yolağı
3. Wnt/Planar Hücre Polaritesi (PCP) (Kanonik olmayan) sinyal yolağı [37]

Wnt sinyal yolu ve bu yolda görev yapan moleküllerdeki değişiklikler nedeni ile meydana gelen hastalıklarla ilgili çalışmalar çok geniş kapsamlı olarak literatürde yer almaktadır [38].

Wnt kanonik yolağı osteoblast oluşumunun regülasyonunda önemli rol oynar. Bunu, β -Katenin nükleer translokasyonu veya kanonik olmayan yolakların yardımıyla yapar. Wnt kanonik yolağı Wnt 1/3a ile aktive olur [22]. Wnt3a veya Wnt10b, frizzled reseptörlere bağlanır ve bu aktivasyon Lrp 5-6/Fz reseptör kompleksleriyle etkileşim sonucu olur [4], [22]. Bu etkileşim reseptörün sitoplazmik kuyruğunun fosforilasyonunu indükler, GSK3 β , axin, APC ve β -Katenin kompleksinin oluşumunu ve bağlanmasını bloke eder (Bu kompleks normalde fosforilasyonu promote eder ve β -Katenin degradasyonuna sebep olur). Sitoplazmada artan seviyedeki β -Katenin nükleustaki kendi translokasyonunu indükler, β -Katenin gen ifadesini etkiler ve Lef1/TCF transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu sağlar [38].



Şekil 1.7 Kanonik Wnt sinyal yolağı [36]

Wnt sinyal yolağı preosteoblastik ve immatür osteoblastik hücrelerin hayatta kalımını, proliferasyonunu ve yayılımını sağlar. BMP-2 ve diğer osteogenik moleküller Wnt stimülatörlerinin veya inhibitörlerinin modülasyonu ile osteoblastik farklılaşmayı indüklerler. Birçok molekül Wnt kanonik sinyal yolağını negatif stimüle eder. Dikkopfs (DKK), bunlar arasında DKK-1, frizzled-ilişkili proteinlerin sekresyonu (FRPs), bunlar arasında sFRP1-4 ve Wnt inhibitör faktör 1 (Wif-1) osteoblastlardaki çözünebilir Wnt inhibitörleridir. Bunlar immatür hücrelerin ölmesini sağlar ve osteoblast oluşumunu engeller. Wnt sinyal yolağı ve Runx2/Cbfa1 arasındaki ilişki kemirgen osteoblastlarında gösterilmiştir. Wnt sinyal yolağı aktivasyonu direkt olarak Runx2/Cbfa1 gen ifadesini stimüle ederek osteogenezi promote eder [22].

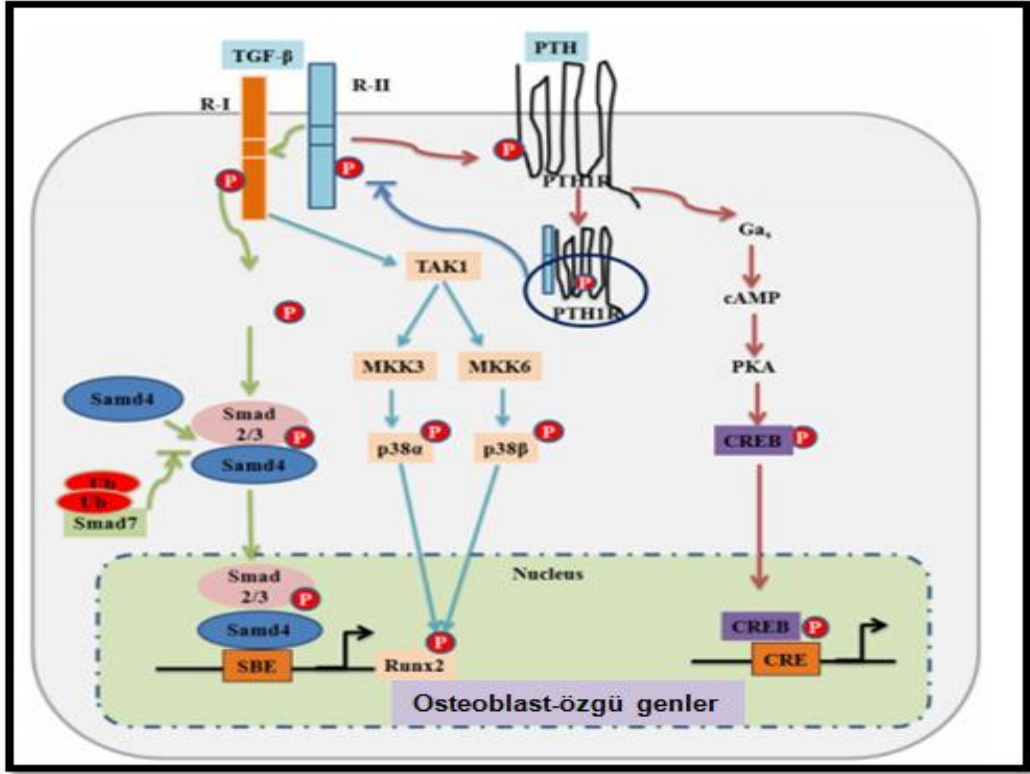
LRP5 Wnt ko-reseptörünü inaktive eden mutasyonların osteoporozu sebep olması kemik oluşumunda Wnt aktivasyonunun önemli olduğunu göstermiştir. Buna karşılık gerçekleştirilen diğer çalışmalar Wnt sinyal yolağının kemik iliği stromal hücrelerinde osteojenik farklılaşmayı baskıladığı ve hücreleri farklılaşmamış aşamada kalmalarını sağladığını göstermektedir [22].

1.1.2.5 TGF- β Süper Ailesi Sinyal Yolakları

TGF- β ailesi gelişimin birçok safhasında önemli roller oynayan yaklaşık 40 farklı proteinden oluşmaktadır. Bu proteinler gelişim boyunca gastrulasyon, organların oluşumu ve doku homeostazına kadar birçok olayda önemli roller oynamaktadırlar. TGF- β ailesi kemik morfogenezik proteinleri (BMP), büyüme ve farklılaşma faktörleri (GDF), anti-müllerian hormon (AMH), aktivinler, nodal ve TGF'lerden oluşmaktadır. Hücresel seviyede TGF- β ailesi proteinleri hücrelerin büyümesi, farklılaşması, adezyonu, göçü ve ölümünü düzenlemektedir [39], [40].

TGF- β sinyal yolağı, ilk olarak TGF- β 'nın plazma membranında tip I ve tip II serin/treonin kinaz reseptörlerine bağlanmasıyla başlar. Tip I reseptör fosforillenerek tip II reseptörü aktive eder ve hücre içi sinyalleşme Smad proteinlerinin fosforillenmesi ile devam eder (R-Smad). Aktive olan R-Smad'lar ko-Smad ve Smad4 ile kompleks oluşturarak transkripsiyonu başlatmak üzere nükleusa girerler (Şekil 1.8) [40].

TGF- β 'nın otokrin ve parakrin olarak etkileri osteoblast progenitörleri olan MKH'in idamesi ve yayılımı için önemlidir. Kemik ve kıkırdakta yüksek miktarlarda TGF- β ve buna cevap verecek hücre popülasyonları bulunmaktadır. TGF- β osteoprogenitör hücrelerin proliferasyonunu, erken farklılaşmasını ve osteoblastik seri hücrelere yönelmelerini MAPK, Smad2/3 yolakları ve PTH, Wnt, BMP, FGF sinyal yolakları üzerinden promote etmektedir (Şekil 1.8) [40].



Şekil 1.8 TGF- β sinyal yolağı [40]

1.1.3 Multipl Miyelom

Multipl miyelom daha çok orta yaş ve yaşlılarda görülen, kemik iliğindeki plazma hücrelerinin tek bir klonunun neoplastik olarak çoğalmasıyla karakterize olan bir plazma hücre kanseridir [1], [41]. Miyelom plazma hücreleri kemik iliği mikroçevresinin de etkisiyle burada zamanla çoğalarak M proteini adı verilen ve işlevsel olmayan bir immünglobulin üretirler. MM hastalığının en önemli belirtilerinden biri de kemik lezyonları ve kemik ağrılarıdır. Hastalığın erken evrelerinde bazı hastalarda kemik lezyonlarına rastlanmasa da, MM kemik hastalığı belirtileri MM tanısında önemli bir yer tutmaktadır. MM plazma hücreleri çoğalarak kemik iliğinde kümeleşir ve normal kemik yapım-yıkım dengesini bozacak birçok faktör salgırlar. Bunun sonucunda kemik yapımı azalırken aynı zamanda kemik yıkımının artar ve litik kemik lezyonları oluşur [1].

MM plazma hücrelerinin salgıladıkları sitokinler ve diğer faktörler MKH'lerin osteoblastik farklılaşmasını engellemektedir. Aynı zamanda bu faktörler osteoklastik aktivitenin artmasına neden olmaktadır. Bunlardan en önemlisi osteoklast

farklılaşmasında rol oynayan RANKL ve osteoklastik aktiviteyi arttıran IL-6'dır. MM plazma hücrelerinin RANKL'yi salgılamasının yanı sıra stromal ve endotelial hücrelerle olan doğrudan etkileşimleri RANKL salınımını arttırmaktadır. IL-6 ise MM hastalığının ilerlemesi ile doğru orantılı olarak, MM plazma hücreleri ve stromal hücrelerden salınarak osteoklastik aktivitenin artmasına neden olmaktadır [5].

Gerçekleştirilen çalışmalarda, MM plazma hücreleri *in vitro* koşullarda osteoprogenitör hücrelerle ortak kültüre edildiğinde, MM hücreleri osteoblast farklılaşmasını inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca ortak kültür sonucunda osteoblast prekürsörlerinin, CFU-fibroblast ve CFU-osteoblast hücrelerinin sayısını azalmıştır. Aynı zamanda osteoblast farklılaşma belirteçleri olan ALP, OCN, COL1 ifadeleri de ortak kültür sonrasında azalmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, MM kemik hastalığındaki bu etkilerin, osteoprogenitör hücrelerde Runx2/Cbfa1'in aktivasyonunu bloke edilmesinden kaynaklandığı rapor edilmiştir. Buna ek olarak, Runx2/Cbfa1 osteoprogenitör hücrelerin bir osteoklast inhibitörü olan osteoprotegerin salgılamasını stimüle etmektedir. Buna bağlı olarak da Runx2/Cbfa1'in inhibisyonu osteoklastogenezini arttırabilir [22], [42].

MM plazma hücrelerinin Runx2/Cbfa1 aktivitesine etkisi ilk olarak, MM hücreleri ve osteoprogenitör hücrelerin hücre-hücre temasıyla olmaktadır. Bu hücre-hücre teması MM hücreleri üzerindeki VLA-4 ve osteoprogenitör hücrelerdeki VCAM-1 etkileşimiyle olur [42]. Ayrıca MM hücrelerinin osteoblast hücreleri tarafından salgılanan osteokalsin sekresyonunu inhibe ettiği ve bununda yine hücre-hücre teması yoluyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir [43]. Hücre-hücre temasıyla VLA-4/VCAM-1'in etkileşimleri sonucu oluşan osteoklast aktivitesi ve kemik lezyonları *in vivo* fare modellerinde gösterilmiştir [44], [45]. İnsan MM hücre dizisi olan JJN 3, VLA-4 ifadesinin yüksek olması bu etkileşimi desteklemektedir. Gerçekleştirilen bir çalışmada, JJN 3 hücrelerinin SCID (irradiye) farelere verilmesinin ardından, farelerde litik lezyonlar ve önemli derecede azalmış kemik yapımı görülmüştür. MM'da VLA-4 ve VCAM-1'in yanı sıra başka adezyon molekülleri de osteoblastogenezini inhibe etmektedir. MM ve stromal hücreler arasındaki NCAM-NCAM etkileşimleri osteoblastik hücrelerin kemik matrisi üretimini azaltmaktadır [46], [47].

MM plazma hücreleri tarafından salgılanan çözülebilir faktörlerinde Runx2/Cbfa1'nin aktivitesi ve osteoblast farklılaşması üzerinde etkileri olduğu gösterilmiştir [42]. Bunlardan biri olan IL-7'nin, osteoblastik hücrelerde Runx2/Cbfa1 promotör

aktivitesini ve osteoblast belirteçlerinin ifadelerini azalttığı gösterilmiştir [47]. Ayrıca IL-7'nin *in vivo* olarak uygulanması farelerde kemik oluşumunu inhibe ettiği belirlenmiştir [48]. IL-7, CFU-F ve CFU-OB oluşumunu inhibe eder ve osteoprogenitör hücrelerdeki Runx2/Cbfa1 aktivitesini azaltır [42]. Sağlıklı insanlarla karşılaştırıldığında MM hastalarında plazma IL-7 seviyeleri oldukça yüksektir. Bu bulgulardan yola çıkılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, IL-7 antikorlarının bloklanmasının, MM hücrelerinin osteoblast farklılaşmasına olan inhibisyonunun azaltılmasında etkili olduğu belirlenmiştir [49]. Sonuç olarak, araştırmalar MM hücrelerinin Runx2/Cbfa1 yolağını ya hücre-hücre temasıyla ya da IL-7 ile inhibe ettiğini göstermektedir [22].

MM kemik hastalığındaki mekanizmalardan biri de, plazma hücrelerinin Wnt inhibitörlerini salgılamalarıdır. Wnt sinyal yolağı osteoblastların büyümesi, gelişmesi ve fonksiyon göstermesinde etkili olan en önemli yollardan biridir. Bir Wnt inhibitörü olan DKK-1'i fazla ifade eden MM plazma hücrelerine sahip hastalarda litik kemik lezyonlarına daha sık rastlanmıştır. Ayrıca kemik lezyonlarının varlığıyla korele olarak MM hastalarının periferik serumlarında ve kemik iliklerinde de DKK-1 seviyeleri yüksektir. İlginç olarak hastalığın ilerleyen dönemlerinde MM plazma hücrelerinde DKK-1 ifadesine rastlanmamaktadır. Bu bulgudan yola çıkılarak, DKK-1'in hastalığın erken safhalarında kemik hasarına sebep olduğunu belirlenmiştir [8],[22].

MM plazma hücrelerinin ürettiği DKK-1'in MM hücrelerinin stromal hücrelere adezyonunu sağlaması, osteoklast aktivasyonu ve Runx2/Cbfa1 yoluyla osteoblast inhibisyonu için kritik bir önem taşımaktadır [22]. Bunun yanında, MM hücreleri ile mikroçevrenin etkileşiminin *in vitro* koşullarda hem DKK-1 hem de IL-6 üretimini ile arttığı belirlenmiştir [50].

Gerçekleştirilen çalışmalarda, IL-3'ün MM hücrelerinde osteoblast inhibitörü olduğu gösterilmiştir [51]. Hem insanda hem de kemirgenlerde IL-3, bazal ve BMP-2'nin stimüle ettiği osteoblast oluşumunu inhibe etmektedir. MM hastalarının plazmasında bulunan seviyelerde IL-3'ün *in vitro* olarak preosteoblastların matür osteoblastlara farklılaşmasını bloke ettiği gösterilmiştir [51]. IL-3 ayrıca MM kemik iliği mikroçevresindeki T lenfositler tarafından da üretilmektedir. Buna ek olarak, IL-3'ün inhibitör etkisi TNF- α 'nın bulunmasına bağlı olarak da artmaktadır. IL-3, stromal hücre kültürlerinde CD45⁺ hücrelerin sayısını arttırmaktadır ve CD45⁺ hücrelerinin *in vitro*

olarak azaltılması IL-3'ün osteoblastlar üzerindeki inhibitör etkisini yok etmektedir. Osteoblastogenezi inhibe etmesinin yanı sıra, IL-3 aynı zamanda *in vitro* osteoklast formasyonunu ve aktivasyonunu stimüle etmektedir [22].

Kemik lezyonları bulunan hastalardan elde edilen osteoblastların, kemik lezyonları olmayan hastaların osteoblastlarıyla karşılaştırıldığında apoptoze daha yatkın olduğu gösterilmiştir. MM hücrelerinin osteoblastları apoptoza götürmesinin yanı sıra osteoblastik hücreler MM hücrelerini TRAIL aracılıklı apoptozisinden korumaktadır [22].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında, mikroçevrenin etkileri olmaksızın MM-Kİ-MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasitelerinin, ostejenik yollarda rol oynayan gen ifadeleri temel alınarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda sağlıklı vericilerden ve MM hastalarından alınan kemik iliği aspiratlarından elde edilen MKH'ler *in vitro* koşullarda osteojenik olarak indüklenerek gen ifadeleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Elde edilen bulgular literatürdeki mevcut çalışmalarla karşılaştırılarak tartışılmıştır. Bu çalışma, MM kemik hastalığının patogenezinde rol oynayan kilit genlerin/yolakların ortaya koyulmasına ve ileride gerçekleştirilmesi amaçlanan çalışmalara yardımcı bir kaynak olacaktır.

1.3 Hipotez

Günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalar, MM kemik hastalığının patogenezinin aydınlatılması ve bu hastalığın tedavisinde uygulanacak yöntemlerin ya da ilaçların belirlenebilmesi açısından oldukça yetersizdir. Bu amaçla araştırmacılar son yıllarda, MM kemik hastalığındaki hedef genlerin ve kemik oluşum mekanizmasındaki bozuklukları ortaya koyulması amacıyla Kİ-MKH'lerinin *in vitro* osteojenik farklılaşma kapasiteleri üzerine yoğunlaşmışlardır [10].

Bu hedef doğrultusunda hipotezimiz, mikroçevrenin etkileri olmaksızın MM-Kİ-MKH'lerin osteojenik yollarda rol oynayan gen ifadelerinin S-Kİ-MKH'lerden farklı olmasıdır. Elde edilen bulgular literatürdeki mevcut çalışmalarla karşılaştırılarak tartışılmıştır. Bu çalışma, MM kemik hastalığının patogenezinde rol oynayan kilit

genlerin/yolakların ortaya koyulmasına ve ileride gerçekleştirilmesi amaçlanan çalışmalara yardımcı bir kaynak niteliğindedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 GEREÇ

Çalışmamızda, hücre kültürü çalışmaları ve diğer yöntemler için uygun, steril ve tek kullanımlık malzemeler kullanılmış ve işlemler laminar akışlı steril kabinde, steril koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Tüm çalışmalar; aseptik koşullara uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.1.1 MKH'lerin İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar

- Kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi (DPBS; Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ free, Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- Biocoll Separation Solution (Biochrom, Berlin, Germany)
- Primocin (Invivogen, San Diego, USA)
- DMEM-LG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose) (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- Fetal sığır serumu (FBS; Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)

MKH Besi Ortamının Hazırlanması

Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin kültüründe, %10 oranında FBS ve %0,2 oranında Primocin eklenmiş ve taze olarak hazırlanmış DMEM-LG besiyeri kullanılmıştır. FBS besiyerine eklenmeden önce, sırasıyla 0,45 ve 0,22 μ m por çaplı filtrelerden geçirilerek içerdiği büyük partiküller uzaklaştırılmış ve sterilize edilmiştir.

2.1.2 Alt-Kültür (Pasajlama) İşleminde Kullanılan Gereçler ve Solüsyonlar

- Kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi (DPBS; Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ free, Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- Primocin (Invivogen, San Diego, USA)
- DMEM-LG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium- Low Glucose) hücre kültürü besiyeri (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- Fetal sığır serumu (FBS; Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)

2.1.3 Hücre Sayımında Kullanılan Gereçler ve Solüsyonlar

- Tripan mavisi solüsyonu (Biological Industries, Beit Haemek, Israel)
- Thoma lamı

2.1.4 Hücrelerin Dondurulması İşleminde Kullanılan Kimyasallar ve Solüsyonlar

- Kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi (DPBS; Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ free, Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- DMEM-LG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose) (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- Fetal sığır serumu (FBS; Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- Dimetilsülfoksit (DMSO; AppliChem, Dermstadt, Germany)
- %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- Tripan mavisi solüsyonu (Biological Industries, Beit Haemek, Israel)

2.1.5 Akım Sitometrik Analizlerde Kullanılan Antikor, Solüsyon ve Kimyasallar

- Kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi (DPBS; Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ free, Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- MKH besi yeri

- CD45/CD14 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD117 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD11b (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD34 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD44 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 90 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 15 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 33 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 54 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 73 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 29 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 146 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 38 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 138 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 166 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 59 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- CD 105 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- IgG1 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- IgG1/G2a (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- Hücre yıkama solüsyonu (Cell wash, BD Biosciences Pharmingen, California, USA)
- Soğuk fosfat tampon solüsyonu (PBS; pH7,4; (BD Biosciences Pharmingen, California, USA)

2.1.6 İmmunofloresan (İF) Çalışmalarda Kullanılan Antikor ve Kimyasallar

- CD 29 (Thermo Scientific, Rockford, USA)
- CD 34 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA)

- CD 44 (Thermo Scientific, Rockford, USA)
- Konneksin 43 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA)
- Aktin (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA)
- Fibronektin (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA)
- Nestin (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA)
- Vimentin (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA)
- HLA-DR (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA)
- Metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- İmmunofloresan DAPI (Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA)

2.1.7 Alkalen Fosfataz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Kimyasallar

- Kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi (DPBS; Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ free, Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- Memeli Protein Ekstraksiyon Ayırıcı (M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific, Rockford, USA)
- *p*-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

2.1.8 Protein Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Kimyasallar

- Kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi (DPBS; Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ free, Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- Memeli Protein Ekstraksiyon Ayırıcı (M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific, Rockford, USA)
- Protein Tayini için Bikinkoninik Asit Kiti (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

2.1.9 Gerçek zamanlı PZR’da Kullanılan Malzemeler

- Human Osteogenesis PZR Array (Qiagen Sciences, Maryland, USA)
- RNA İzolasyon Kiti (High Pure RNA Isolation Kit; Roche, Mannheim, Germany)
- cDNA Sentez Kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit; Roche, Mannheim, Germany)

2.1.10 *İn vitro* Osteojenik ve Adipojenik Farklılaştırma Çalışmalarında Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasallar

- DMEM-LG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose) (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- Fetal sığır serumu (FBS; Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- 3-İzobutil-1-metilksantin (IBMX)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Absolu etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Deksametazon (Fluka, Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)
- İnsülin (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA)
- İndometazin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Primocin (Invivogen, San Diego, USA)
- Askorbat-2-fosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- β -gliserofosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Oil red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Alizarin kırmızısı (Fluka-Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)
- Aseton (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- İzopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

%3'lük Oil Red O Solüsyonunun Hazırlanması

300 mg oil red O, 100 ml izopropanol (%99) içinde çözülerek %3'lük oil red O solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyon 3/2 oranında distile su ile seyreltilmiş ve 0,22 μ m por çaplı filtre ile süzülüp çalışmada kullanılmıştır.

%0,02'lik Alizarin Kırmızısı-S Solüsyonunun Hazırlanması

20 ml distile suda; 0,4 mg alizarin kırmızısı-S çözülmüş ve 0,22 μm filtre ile süzölmüştür. Hidrojen peroksit (%10 oranında) eklenip, pH 4,1-4,3 olarak ayarlanarak kullanılmıştır.

2.1.11 Tez Çalışmasında Kullanılan Malzemeler

- 15 ml konik tabanlı kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- 50 ml konik tabanlı kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- 6 kuyucuklu hücre kültür plakaları (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- 12 kuyucuklu hücre kültür plakaları
- 96 kuyucuklu hücre kültür plakaları (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- 8 kuyucuklu hücre kültür odacıkları (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- 25cm²'lik hücre kültür flaskları (BD Biosciences Labware, Le Pont De Claix, France)
- 75cm²'lik hücre kültür flaskları (BD Biosciences Labware, Le Pont De Claix, France)
- Tip I kollajen kaplı lameller (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- 0,20 μm filtre (Sartorius, Goettingen, Germany)
- 0,45 μm filtre (Sartorius, Goettingen, Germany)
- 70 μm por çaplı hücre süzgeci (Cell Strainer, BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- Pipet tutucu (200-1000 μl) ve pipet uçları (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Çok kanallı pipet ve pipet uçları (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Tek kullanımlık steril pipetler (5, 10,25 ve 50 ml'lik) (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- Kriyotüpler (Greiner-bio-one, Carolina, USA)
- Hücre sayım kamarası (Thoma Lamı)
- Lamel (22x22mm)

2.1.12 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

- CO₂ inkübatör (Sanyo, Etten Leur, The Netherlands)
- Laminar akışlı steril kabin (Class II, Heraeus, Hanau, Germany)
- Inverted mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan; CKX41)
- Binoküler mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany; CME)
- Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon (Real Time PZR) cihazı (LC 480II Roche, Mannheim, Germany)
- Picodrop (Picodrop Limited, 40 High Street, Hinxton, CB10 1QY, UK)
- Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon (Termal Cyclers; Takara Bio inc., Shiga, Japan) cihazı
- Monokromatik sistemli mikroplaka okuyucu (VersaMax, Molecular Device, USA)
- Vorteks (Labart, Berlin, Germany; MVS1)
- Mikrosantrifuj (Sigma, Osterode, Germany; 1-14 ve Hettich, Gartenstr, Germany; Micro 120)
- Soğutmalı santrifuj (Universal 320 R, Hettich, Germany)
- Masaüstü santrifuj (Sigma, Osterode, Germany; 2-16PK)
- Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Heildoph Electro GmbH&Co., Kelheim, Germany; MR Hei-Standard)
- Hassas terazi (AW120 model; Shimadzu, Makati, Philippines)
- Çalkalamalı su banyosu (Nüve, Ankara, Türkiye; ST 402)
- Çalkalamalı tabla (Peqlab, Building 34, Universal Marina,UK)
- Floresans mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany; DMI 4000)
- FACS Calibur akım sitometri cihazı (BD Biosciences, California, USA)
- BD Cell Quest TM software programı (BD Biosciences, California, USA)
- Saklama dolabı (+4°C) (Sanyo, Etten Leur, The Netherlands; SRR-49FD-MEDE)
- -20°C derin dondurucu (Sanyo, Etten Leur, The Netherlands)

- -86°C derin dondurucu (Sanyo, Etten Leur, The Netherlands; MDF-U5386S Model)
- -150°C derin dondurucu (Sanyo, Etten Leur, The Netherlands)
- Sıvı azot tankı (MVE Chart Industries, Minnesota, USA)
- Buz yapma makinesi (Scotsman, Milan, Italy; AF 80)
- Bidistile su cihazı (GFL, Burgwedel, Germany; 2104)
- pH metre (WTW Inolab, Weilheim, Germany; PH720 Set)

2.2 YÖNTEM

2.2.1 Yerel Etik Kurul Onayı

Bu çalışma için; Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu'ndan KAEK 2012/38 protokol numaralı yazısı ile çalışmanın etik yönden bir sakınca taşımadığı, uygulamaya koyulabileceğini belirten onay raporu alınmıştır. Kemik iliği aspirasyonu işlemi öncesinde tüm hastalara çalışma hakkında ayrıntılı bilgi verilmiş ve gönüllü onam formu imzalatılmıştır.

2.2.2 Hastaların ve Kontrol Gruplarının Seçimi

Bu çalışma kapsamına, yaşları 50-65 arasında değişen sağlıklılardan (n=3) ve yeni tanı almış, kemik defektleri olan MM hastalarından (n=3) alınan kemik iliklerinden MKH izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

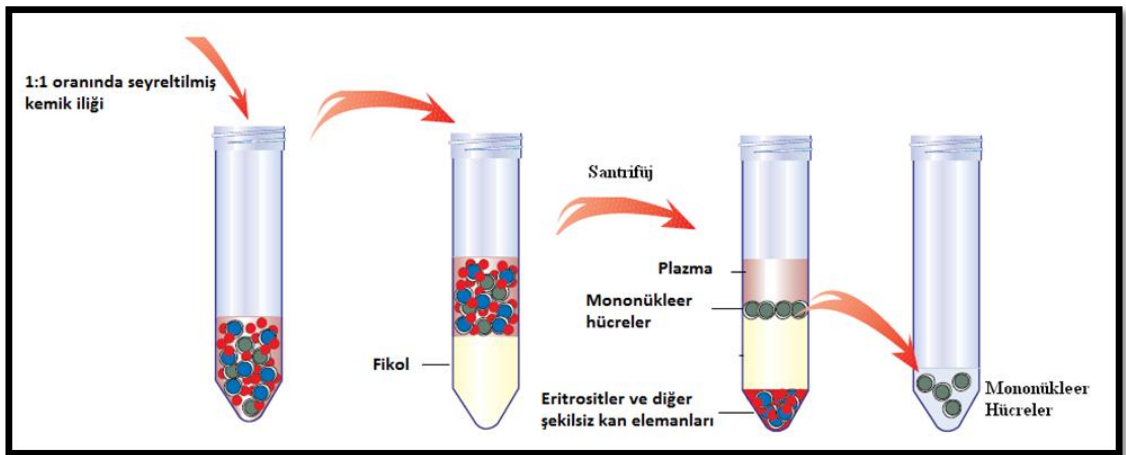
Kontrol grubu (sağlıklı) olarak kullanılan kemik ilikleri, hematoloji kliniğinde tanı amaçlı olarak alınan kemik iliği aspiratlarından, laboratuvar ve klinik bulgulara göre sağlıklı olarak tespit edilen gönüllülerden seçilmiştir. Multipl miyelom hastalarında ise kemik iliği biyopsisi hastalığın tanısı, evrelemesi ve devam eden tedavi durumunun değerlendirilmesi için yapılmaktadır. Bu amaçlarla yeni tanı almış hastaların, posterior iliak krestten alınan kemik iliği biyopsilerinin bir kısım çalışmamızda MKH izolasyonu için kullanılmıştır.

2.2.3 Kemik İliği Biyopsilerinden MKH'lerin Eldesi

Kemik iliği aspiratları EDTA'lı tüpler içerisinde, uygun koşullarda aynı gün içinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Laminar akışlı steril kabin altında aseptik koşullarda kemik iliği steril bir tüp içerisine alınmış ve hastanın bilgileri not edilmiştir.

Kemik iliği 1:1 oranında PBS ile seyreltikten sonra yoğunluğu 1.077g/ml olan fikol solüsyonu üzerine iki faz birbirine karıştırılmadan yavaşça yayılmıştır. Mononükleer hücrelerin ayrıştırılması için 1100g'de 20 dakika süresince hızlanma ve fren sistemleri en aza indirilerek santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında oluşan bulutsu tabaka ayrı bir tüpe toplanmış ve üzerine besiyeri eklenerek fikolün tamamen uzaklaştırılması için 400g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu yıkama işlemi iki kez tekrarlandıktan sonra elde edilen hücre peleti üzerine besiyeri eklenerek 25 cm² yüzey alanına sahip doku kültür kaplarına ekilmiştir.

Hücrelerin kültüründe, %10 fetal sığır serumu (FBS), % 0,2 Primocin eklenmiş düşük glikozlu DMEM (LG-DMEM) besiyeri kullanılmıştır. Hücreler, 37°C, %5 CO₂, % 95 hava ve %90 nem içeren inkübatör ortamında kültüre edilmiştir. Hücrelerin kültür kaplarına yapışmaları için 24 saat beklendikten sonra hücre kültür besiyerinin yarısı çekilerek yerine taze besiyeri eklenmiştir. Bu işlemden 24 saat sonra ise besiyeri tamamen tazelenmiştir. İlerleyen günlerde hücrelerin yüzeye tutunmaları ve çoğalmaları faz mikroskobu ile incelenmiştir. Kültür süresince hücrelerin haftada 3 defa besiyerleri değiştirilmiştir.



Şekil 2.1MKH'lerin gradient yöntemi ile kemik iliğinden eldesi

2.2.4 Alt-Kültür İşlemi (Pasajlama)

İlk kültür sıfırcı pasaj (P0) olarak kabul edilerek, takip eden her alt kültür işlemi sonrasında pasaj sayıları P1, P2, ve P3 olarak belirtilmiştir. Hücreler kültür kabının tabanını %70-80 oranında doldurduğunda (%70-80 konfluent olduğunda) pasajlama işlemine geçilmiştir.

Besiyeri ile birlikte tutunmayan hücreler uzaklaştırıldıktan sonra, kültür kabı yüzeyi Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkanmıştır. Enzimatik olarak hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu kullanılmıştır. Hücre kültür kapları, tripsin eklendikten sonra 2-3 dk süre ile inkübatörde bekletilmiştir. Yapışan hücrelerin yüzeyden ayrıldığı mikroskopta gözlemlendikten sonra, tripsinin inaktivasyonu için, FBS içeren besiyeri 1:1 oranında kültür kaplarına eklenmiştir. Daha sonra hücreler 15ml'lik konik tabanlı tüplere alınmış ve 400 g'de 5dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peletine 1ml besiyeri eklenmiş ve pipetlenerek homojenize olması sağlanmıştır. Daha sonra 25 μ l hücre süspansiyonu alınıp hücre sayımı için ayrı bir tüpe koyulmuştur. Hücrelerin canlılığının belirlenmesi amacıyla hücre süspansiyonuna 1:1 oranında tripan mavisi eklenmiştir. Hücre sayımı Thoma lamı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Işık mikroskopunda canlı hücreler sayılarak toplam hücre sayısı hesaplanmıştır. Hücreler uygun oranda besiyeri ile seyreltilerek, 75cm² lik hücre kültür kaplarına 0,5x10⁶ hücre olacak şekilde ekilmiştir.

2.2.5 Hücre Dondurma ve Çözme İşlemleri

Her pasaj sonrasında hücreleri yedeklemek ve daha sonra yapılacak olan işlemler için depolamak amacıyla hücre dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hücreler dondurulmak üzere -196°C'de sıvı nitrojen tanklarında veya -150 °C'de saklanmıştır.

Dondurma işlemi öncesinde, hücre kültür kaplarının yüzeyini %70-80 oranında kaplayan hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak santrifüj edildilmiş ve süpernatant tamamen uzaklaştırılmıştır. Önceden hazırlanmış olan %60 oranında DMEM-LG ve %35 oranında FBS karışımı hücre peleti üzerine eklenmiş ve pipetaj yapılarak homojenize edilmiştir. Daha sonra, %5 oranında dimetilsülfoksit (DMSO) damlalar halinde eklenerek toplam hacim 1 ml olacak şekilde kriyotüplere aktarılmıştır.

Kriyotüpler -80°C 'de 24 saat bekletildikten sonra sıvı nitrojen tankına alınmış veya direkt olarak -150°C dondurulmuştur.

Çözme işleminde, kriyotüpler sıvı nitrojen tanklarından veya -150°C dondurucudan çıkarıldıktan hemen sonra 37°C 'deki su banyosunda buz tamamen eriyene kadar çözdürülmüştür. Bu işlemin hemen ardından dondurma solüsyonunun uzaklaştırılması amacıyla hücre kültür besiyeri içeren tüplere aktarılmış ve 400 g 'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti besiyeri ile seyreltilerek sayım sonrasında kültür kaplarına uygun miktarlarda ekilmiştir. Çözülen hücreler deney aşamalarına geçilmeden en az iki gün süresince uygun koşullarda inkübe edilmişlerdir.

2.2.6 MKH'in Karakterizasyon Çalışmaları

Kemik iliği aspiratlarından elde edilip 3.pasaja getirilen hücrelerin morfolojik özellikleri çalışma süresince zıt faz mikroskobu ile incelenmiştir. Ayrıca Kİ-MKH'lerin karakterizasyonu amacıyla osteojenik ve adipojenik farklılaştırma çalışmaları; immunofenotipik özelliklerin belirlenmesi amacıyla akım sitometrik analizler ve immunflorasan çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

2.2.7 Akım Sitometrik Analizler

SKİ-MKH'in ve MM-Kİ-MKH'in, fenotipik özelliklerinin belirlenmesi ve yüzey antijenlerinin tanımlanması amacıyla akım sitometri yöntemi kullanılmıştır. Hücreler 3. pasaja geldiklerinde, *FACS Calibur* akım sitometri cihazı kullanılarak analizleri gerçekleştirilmiştir.

Hücreler tripisinizasyon işlemi sonrasında sayılarak yaklaşık $0,2 \times 10^6$ hücre/ $100\mu\text{l}$ besiyerinde olacak şekilde tüplere alınmıştır. Her tüpe ilgili floresan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE) konjuge monoklonal antikolar (CD45, CD 59, CD14, CD117, CD11b, CD34, CD44, CD90, CD15, CD33, CD 105, CD54, CD73, CD29, CD146, CD38, CD138 ve CD 166) ve uygun izotip kontrollerinden (IgG1, IgG1/G2a) $10\mu\text{l}$ eklenerek hücreler 45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler üzerine %0,1 sodyum azid içeren PBS eklenmiş, 800 g 'de 5 dakika santrifüj edilerek bağlanmayan antikolar uzaklaştırılmıştır. Ardından hücreler, $400\mu\text{l}$ yıkama solüsyonu ile resüspanse edilerek *FACS Calibur* akım sitometri cihazında okutulmuş ve *BD Cell Quest TM software* programı ile analizleri gerçekleştirilmiştir.

2.2.8 İmmunofloresan Çalışmalar

Farklılaşmamış kök hücelere ait belirteçlerin protein seviyesindeki ifadelerini belirlemek amacıyla immunofloresan boyamaları ve analizleri gerçekleştirilmiştir. S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerin immunfenotipik özelliklerinin belirlenmesi için; CD29, CD34, CD44, konneksin 43, fibronektin, aktin, vimentin, nestin, HLA-DR için immunfloresan boyamaları gerçekleştirilmiştir. İmmunfloresan çalışmalarında, floresan işaretli sekonder antikorlar kullanılmıştır.

Hücreler P3'de 8 kuyucuklu hücre kültür odacıklarına 2×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildikten sonra tutunmanın sağlanması için bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kültür besiyeri uzaklaştırılarak soğuk PBS ile 3 kere yıkanıp, -20°C 'de 10 dakika süresince metanol ile fiksasyon işlemi yapılmıştır.

Hücreler, PBS ile yıkandıktan sonra primer antikorların özgün olmayan yerlere bağlanmasını önlemek amacıyla %1,5 normal blok serum içeren PBS'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiş, uygun dilüsyon oranlarında primer antikorlar eklenmiştir (Çizelge 3.1). Bu işlemden sonra hücreler 4°C 'de 1 gece ve oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edilerek PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra uygun floresan (FITC) işaretli sekonder antikorlarla oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında çekirdek boyaması amacıyla DAPI Ultracruz mounting medium ile kapatılmıştır. Aynı yöntem negatif kontroller için de uygulanmış fakat primer antikor yerine PBS kullanılmıştır. Boyanmış örnekler, floresan mikroskop (Leica DMI 4000 Microsystems) altında incelenmiştir.

2.2.9 Farklılaştırma Çalışmaları

2.2.9.1 *In vitro* Adipojenik Farklılaşma

Hücreler 3.pasajda tripsinizasyon işlemi sonrasında 6 kuyucuklu doku kültür kaplarında 3×10^4 hücre/cm² yoğunlukta, tip I kollajen kaplı lamellere ekilmiştir. Hücrelerin kültür kabının tabanına tutunmaları için 1 gece beklendikten sonra kültür besiyeri, %10 FBS, 0.5 mM isobutil-metilksantin, 10^{-6}M deksametazon, 10 $\mu\text{g/ml}$ insulin, 200 μM indometazin ve %0.2 Primocin eklenmiş DMEM-LG olarak değiştirilerek, hücreler adipojenik farklılaşmaya indüklenmiştir. Besiyeri, haftada iki kez değiştirilerek 2 hafta süresince hücreler zıt faz mikroskobu ile gözlenmiştir. Bu süre sonunda, besiyeri

uzaklaştırılarak lameller PBS ile 3 kere yıkanmıştır. %4'lük paraformaldehitte oda sıcaklığında 30 dakika süreyle fiksasyon işlemi uygulandıktan sonra, PBS ve distile su ile lameller yıkanmıştır. Lameller, izopropanolda (%60 v/v) 5 dakika bekletildikten sonra, 50 dakika süresince hücrelerdeki nötral lipidler için özgül olan oil red O solüsyonu ile ve ardından %30'luk izopropanol ile muamele edilmiştir. Distile su ve PBS ile yıkamanın ardından örnekler kurumaya bırakılmış ve DAPI ile lamaların üzerine kapatılmıştır. Mikroskopik görüntüleme, yağ damlacıkları kırmızı renkte ve hücrelerin nükleusları mavi renkte gözlenmiştir.

2.2.9.2 *In vitro* Osteojenik Farklılaşma

S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH, P3'de 3000 hücre/cm² yoğunlukta, 6 kuyucuklu doku kültür kaplarında tip I kollajen kaplı lamellere ekilmiştir. Osteojenik induksiyon besiyeri olarak %10 oranında FBS, 10⁻⁸ M deksametazon, 50 µg/ml askorbat-2-fosfat, 10 mM β-gliserofosfat, %0,2 oranında Primocin eklenmiş DMEM-LG kullanılmıştır. Hücreler ekildikten sonra kültür kabına tutunmaları için bir gece beklendikten sonra osteojenik induksiyona alınmıştır. Otuz gün süresince haftada iki kez besi ortamı değiştirilmiştir. Bu süre sonunda lameller, %70 alkolle oda sıcaklığında 5 dakika fikse edilmiş, daha sonra distile su içine 20 kez batırılıp Alizarin kırmızısı solüsyonunda 45 saniye bekletilmiştir. Örnekler, önce aseton, daha sonra ksilol-aseton karışımı ve son olarak ksilol içine 20 kez batırılıp çıkartılmış, karanlık odada kurutulduktan sonra Crystal mounting medium ile kapatılarak ışık mikroskopunda görüntülenmiştir. Kültürdeki hücre dışı kalsifikasyon (primer kemik nodülleri), Alizarin kırmızısı ile boyanan kalsiyum fosfat depolarının tespiti ile gösterilmiştir.

2.2.10 Deneyde Uygulanan Yöntemler ve Deney Grupları

S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'in P3'de osteojenik induksiyon sonrasında osteojenik farklılaşma kapasitelerinin karşılaştırılmalı incelenmesi amacıyla kalitatif olarak Alizarin Kırmızısı boyası ve kantitatif olarak alkalen fosfataz enzim aktivitesi tayini gerçekleştirilmiştir. Ayrıca gen ifade düzeyleri, Real-time PZR Array ile kantitatif olarak belirlenmiştir.

ALP aktivitesi tayini amacıyla hücreler 12 kuyucuklu kültür kaplarına 2x10⁴ hücre/cm² olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler %80-90 oranında kuyucuk tabanını doldurduktan

sonra besiyeri değiştirilerek osteojenik farklılaşmaya indüklenmişlerdir. Osteojenik indüksiyon için, osteojenik indüksiyon besiyeri kullanılmış ve besiyeri haftada iki kez değiştirilmiştir. Kontrol grupları (osteojenik indüksiyona alınmamış hücreler) eş zamanlı olarak %10 oranında FBS, %0,2 oranında Primocin içeren DMEM-LG besiyerinde kültüre edilmiştir. Her grup için 3 biyolojik tekrar amacıyla 3 kuyucuk ekilmiştir.

Osteojenik indüksiyon öncesinde gerçekleştirilen PZR Array için S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH P3'de tripsinizasyon işlemi sonrasında sayılarak 15ml'lik tüpler içerisine 3×10^6 hücre olacak şekilde koyulmuş ve 400g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Hücre kültür besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine PBS eklenerek 400g'de 5 dk santrifüj edilmiş ve bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. İlerleyen zamanlarda RNA izolasyonlarının ve cDNA sentezinin gerçekleştirilmesi amacıyla hücre peletleri sıvı azot içerisinde birkaç saniye bekletilerek dondurulmuş ve -80°C 'de saklanmıştır. Osteojenik indüksiyon sonrasında gerçekleştirilen PZR Array için, S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'i P3'de 75 cm^2 taban alanına sahip kültür kaplarına 2×10^4 hücre/ cm^2 olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler %90 oranında tabanını doldurduktan sonra besi ortamı değiştirilerek osteojenik farklılaşmaya indüklenmişlerdir. Otuz gün süresince osteojenik besiyerinde kültüre edilen hücreler, tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak 400g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Hücre kültür besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine PBS eklenerek 400g'de 5 dk santrifüj edilmiş ve bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. İlerleyen zamanlarda RNA izolasyonlarının ve cDNA sentezinin gerçekleştirilmesi amacıyla hücre peletleri sıvı azot içerisinde birkaç saniye bekletilerek dondurulmuş ve -80°C 'de saklanmıştır.

2.2.10.1 Alkalen Fosfataz Enzim Aktivitesi Tayini

Osteojenik indüksiyonun 4., 7. ve 14. ve 21. günlerinde ALP aktivitesi tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, belirtilen günlerde hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak iki kere PBS ile yıkandıktan sonra hücre kazıyıcısı kullanılarak hücreler kaldırılmıştır. Pipet ile hücreler toplanarak 15ml'lik tüplere aktarıldıktan sonra 5dk 400g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantın tamamen uzaklaştırılmamasının ardından total protein izolasyonu için hücre peletinin üzerine Mammalian Protein Extract Reagent (M-PER) eklendikten sonra 5 dakika çalkalayıcı tablada bekletilmiş ve 14000 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar 1ml'lik tüplere aktararak -

80°C'de dondurularak saklanmıştır. Tüm grupların toplam protein izolasyonları gerçekleştirildikten sonra ALP aktivitesi tayini için 96 kuyucuklu kültür kaplarına protein solüsyonları 25 µl eklenmiş ve üzerine p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate 200 µl eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda absorbanslar 405nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu kullanılarak okutulmuştur. Absorbanslar toplam protein miktarına (mg) oranlanmıştır.

2.2.10.2 Protein Miktarı Tayini

Toplam protein miktarı, lineer konsantrasyon aralığı 200-1000µg/ml olan Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit kullanılarak tayin edilmiştir. Daha önce -80 derecede saklanan toplam protein solüsyonları ve hazırlanan BSA (Bovine Serum Albumin) standartları 96 kuyucuklu kültür kaplarına 25 µl eklenmiştir. Çalışma solüsyonu 1:50 oranında Reagent B ve Reagent A'nin karışımı ile hazırlanmıştır. Kitin talimatlarına göre hazırlanmış çalışma solüsyonundan, proteinlerin üzerine 200 µl eklenerek inkübatörde 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda mikropilaka okuyucuda protein quantification BCA Assay analiz sistemi kullanılarak µg protein miktarları belirlenmiştir.

2.2.10.3 Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, osteojenik yollarda rol oynayan gen ifadelerinin belirlenmesi amacıyla hazır olarak üretilmiş 96 kuyucuklu PZR plakaları kullanılmıştır. Bu amaçla osteojenik indüksiyonun öncesinde ve sonrasında dondurularak -80 °C'de saklanan hücrelerden, RNA İzolasyon Kiti kullanılarak RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzolasyondan sonra RNA konsantrasyonu picodrop spektrofotometre cihazı ile ölçülerek cDNA sentez kiti ile cDNA'ya çevrilmiştir.

2.2.10.3.1 RNA İzolasyonu

Hücre pelletleri 200 µl PBS içerisinde homojenize edildikten sonra 400 µl lizis solüsyonu eklenerek 15 saniye süresince vortekslenmiştir. Daha sonra örnekler, iç içe geçirilen toplama ve filtreli tüplere aktarılmış ve 8000g'de 15 sn santrifüj yapılmıştır. DNAaz ve DNAaz inkübasyon tampon solüsyonu 1:10 oranında karıştırılarak her örneğe 100 µl eklendikten sonra oda sıcaklığında 25 dk inkübe edilmiştir. Yıkama 1

tampon çözeltisinden (Wash 1) her örneğe 500 μ l eklendikten sonra 8000g'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Daha sonra yıkama 2 tampon çözeltisinden (Wash 2) her örneğe 200 μ l eklendikten sonra 13000g'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Yıkamalar sonrasında her defasında toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılmış ve bu aşamardan sonra tüpler bir kere 13000g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Örneklerin toplama tüpleri atılarak filtreli tüpler temiz toplama tüplerine aktarılmıştır. Tüplere ayrıştırma (elution) tamponu eklenerek 10000g'de 2dk santrifüj edilmiştir ve 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra işlem tekrarlanmıştır. Bu işlemlerden sonra filtreli tüpler atılarak toplama tüplerindeki örnekler buza alınmıştır. Örneklerin konsantrasyonu picodrop spektrofotometre ile ölçülerek ve 1 μ g total RNA olacak şekilde cDNA'ya çevrim gerçekleştirilmiştir.

2.2.10.3.2 cDNA Sentezi

RNA konsantrasyon ölçümünden sonra hesaplanan RNA miktarına karşılık gelen miktarda RNA alınarak toplam miktar su (PZR için uygun saflıkta) ile 8.4 μ l olacak şekilde tamamlanmıştır. Örnekler PZR tüplerine aktarıldıktan sonra örnek başına 1 μ l Oligo DT, 2 μ l Random hexamer eklenmiştir. İlk aşamada ısıtıcı blokta 65°C'de 10 dk primerlerin örnek RNA'ya bağlanmaları için beklendikten hemen sonra örnekler buza alınmıştır. İkinci aşamada, her bir örneğe eklenecek reaksiyon solüsyonu için 4 μ l tampon çözeltisi, 0.5 μ l RNAaz inhibitörü, 2 μ l dNTP, 1 μ l DTT ve 1.1 μ l ters transkriptaz (RT) hazırlanarak, buz üzerindeki RNA içeren PZR tüplerine aktarılmıştır. Bundan sonraki reaksiyon 55°C'de 30 dk, 85°C'de 5 dk gerçekleştirilmiş ve 4°C'de sonlandırılmıştır. Elde edilen cDNA'lar -20 °C'de saklanmıştır.

2.2.10.3.3 Gerçek Zamanlı PZR

Gerçekleştirilen cDNA sentezi sonrasında -20°C'de saklanan örnekler çözdürüldükten sonra 20 μ l alınarak 4 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Üzerine 1205 μ l su ve 1225 μ l master mix (DNA Polimeraz, PZR Tamponu, dNTP içeren karışım) eklenerek PZR plakalarına 25 μ l/kuyucuk olacak şekilde pipetlenmiştir. Kuyucukların üzeri film ile kaplandıktan sonra 1000g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Plakalar Gerçek zamanlı PZR cihazına yerleştirilmiş ve Sabioscience Array veritabanı kullanılarak C_T değerleri hesaplanmıştır. Kiti talimatlarına göre sıcaklık aktivasyonu, 95°C'de 10 dk; PZR döngüsü (45 döngü), 95 °C'de 15 sn ve 60 °C 1 dk; erime eğrisi (melting curve) 60°C ve

95 °C; soğutma 40 °C olarak belirlenmiştir. Referans gen olarak HPRT kullanılmıştır. C_T değerleri Roche Light Cycler 480 cihazı yazılımıyla hesaplanarak sonuçlar Sabioscience PZR Array Dataanalysis V4 analiz programıyla analiz edilmiştir. Kullanılan genlerin isimleri, tanımları, referans sekansları ve sembolleri Çizelge 2.1’de; PZR plakalarının dizaynı Çizelge 2.2’de; gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan genlerin referans sekansı, sembolleri, gen tanımı ve gen isimleri

<i>Referans sekans</i>	<i>Sembol</i>	<i>Gen Tanımı</i>	<i>Gen İsimleri</i>
<i>NM_001105</i>	ACVR1	Aktivin A reseptörü, tip I	ACTRI, ACVR1A, ACVRLK2, ALK2, FOP, SKR1, TSRI
<i>NM_001622</i>	AHSG	Alfa-2-HS-glikoprotein	A2HS, AHS, FETUA, HSGA
<i>NM_000478</i>	ALPL	Alkalen fosfataz, karaciğer/kemik/böbrek	AP-TNAP, APTNAP, HOPS, TNAP, TNSALP
<i>NM_001154</i>	ANXA5	Anneksin A5	ANX5, ENX2, HEL-S-7, PP4, RPRGL3
<i>NM_199173</i>	BGLAP	Kemik gama-karboksiglutamat (gla) protein	BGP, OC, OCN
<i>NM_001711</i>	BGN	Biglikan	DSPG1, PG-S1, PGI, SLRR1A
<i>NM_006129</i>	BMP1	Kemik morfogenetik protein 1	OI13, PCOLC, PCP, PCP2, TLD
<i>NM_001200</i>	BMP2	Kemik morfogenetik protein 2	BDA2, BMP2A
<i>NM_001201</i>	BMP3	Kemik morfogenetik protein 3	BMP-3A
<i>NM_130851</i>	BMP4	Kemik morfogenetik protein 4	BMP2B, BMP2B1, MCOPS6, OFC11, ZYME
<i>NM_021073</i>	BMP5	Kemik morfogenetik protein 5	-
<i>NM_001718</i>	BMP6	Kemik morfogenetik protein 6	VGR, VGR1
<i>NM_001719</i>	BMP7	Kemik morfogenetik protein 7	OP-1
<i>NM_004329</i>	BMPR1A	Kemik morfogenetik protein reseptörü, tip IA	10q23del, ACVRLK3, ALK3, CD292, SKR5
<i>NM_001203</i>	BMPR1B	Kemik morfogenetik protein reseptörü, tip IB	ALK-6, ALK6, CDw293

Çizelge 2.1 Gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan genlerin referans sekansı, sembolleri, gen tanımı ve gen isimleri (devamı)

<i>Referans sekans</i>	<i>Sembol</i>	<i>Gen Tanımı</i>	<i>Gen İsimleri</i>
<i>NM_001204</i>	BMPR2	Kemik morfogenetik protein reseptörü, tip II (serin/treonin kinaz)	BMPR-II, BMPR3, BMR2, BRK-3, PPH1, T-ALK
<i>NM_001742</i>	CALCR	Kalsitonin reseptörü	CRT, CT-R, CTR, CTR1
<i>NM_000072</i>	CD36	CD36 molekülü (trombospondin reseptörü)	BDPLT10, CHDS7, FAT, GP3B, GP4, GPIV, PASIV, SCARB3
<i>NM_001797</i>	CDH11	Kaderin 11, tip 2, OB-kaderin (osteoblast)	CAD11, CDHOB, OB, OSF-4
<i>NM_003741</i>	CHRD	Kordin	-
<i>NM_000493</i>	COL10A1	Kollajen, tip X, alfa 1	-
<i>NM_021110</i>	COL14A1	Kollajen, tip XIV, alfa 1	UND
<i>NM_001855</i>	COL15A1	Kollajen, tip XV, alfa 1	-
<i>NM_000088</i>	COL1A1	Kollajen, tip I, alfa 1	O14
<i>NM_000089</i>	COL1A2	Kollajen, tip I, alfa 2	O14
<i>NM_001844</i>	COL2A1	Kollajen, tip II, alfa 1	ANFH, AOM, COL11A3, SEDC, STL1
<i>NM_000093</i>	COL5A1	Kollajen, tip V, alfa 1	-
<i>NM_000095</i>	COMP	Kıkırdak oligometrik matriks proteini	EDM1, EPD1, MED, PSACH, THBS5
<i>NM_000757</i>	CSF1	Koloni stimule edici faktör 1 (makrofaj)	CSF-1, MCSF
<i>NM_000758</i>	CSF2	Koloni stimule edici faktör 2 (granülosit- makrofaj)	GMCSF
<i>NM_000759</i>	CSF3	Koloni stimule edici faktör 3 (granülosit)	C17orf33, CSF3OS, GCSF

Çizelge 2.1 Gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan genlerin referans sekansı, sembolleri, gen tanımı ve gen isimleri (devamı)

<i>Referans sekans</i>	<i>Sembol</i>	<i>Gen Tanımı</i>	<i>Gen İsimleri</i>
<i>NM_000396</i>	CTSK	Katepsin K	CTS02, CTSO, CTSO1, CTSO2, PKND, PYCD
<i>NM_005221</i>	DLX5	Distal-less homeobox 5	SHFM1D
<i>NM_001963</i>	EGF	Epidermal büyüme faktörü	HOMG4, URG
<i>NM_005228</i>	EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü	ERBB, ERBB1, HER1, PIG61, mENA
<i>NM_000800</i>	FGF1	Fibroblast büyüme faktörü 1 (asidik)	AFGF, ECGF, ECGF-beta, ECGFA, ECGFB, FGF-1, FGF-alfa, FGFA, GLIO703, HBGF-1, HBGF1
<i>NM_002006</i>	FGF2	Fibroblast büyüme faktörü 2 (bazik)	BFGF, FGF-2, FGFB, HBGF-2
<i>NM_015850</i>	FGFR1	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1	BFGFR, CD331, CEK, FGFR, FGFR-1, FLG, FLT-2, FLT2, HBGR, HH2, HRTFDS, KAL2, N-SAM, OGD, bFGF-R-1
<i>NM_000141</i>	FGFR2	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2	BBDS, BEK, BFR-1, CD332, CEK3, CFD1, ECT1, JWS, K-SAM, KGFR, TK14, TK25
<i>NM_002019</i>	FLT1	Fms-ilişkili tirozin kinaz 1 (vasküler endotelyal büyüme faktörü/ vasküler permabilite faktörü reseptörü)	FLT, FLT-1, VEGFR-1, VEGFR1
<i>NM_002026</i>	FN1	Fibronektin 1	CIG, ED-B, FINC, FN, FNZ, GFND, GFND2, LETS, MSF
<i>NM_004962</i>	GDF10	Büyüme farklılaşma faktörü 10	BMP-3b, BMP3B
<i>NM_000618</i>	IGF1	İnsulin benzeri büyüme faktörü 1 (somatomedin C)	IGF-I, IGF1A, IGFI

Çizelge 2.1 Gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan genlerin referans sekansı, sembolleri, gen tanımı ve gen isimleri (devamı)

<i>Referans sekans</i>	<i>Sembol</i>	<i>Gen Tanımı</i>	<i>Gen İsimleri</i>
<i>NM_000875</i>	IGF1R	İnsulin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü	CD221, IGF1R, IGFR, JTK13
<i>NM_000612</i>	IGF2	İnsulin benzeri büyüme faktörü 2 (somatomedin A)	C11orf43, IGF-II, PP9974
<i>NM_002181</i>	IHH	Indian hedgehog	BDA1, HHG2
<i>NM_181501</i>	ITGA1	İntegrin, alfa 1	CD49a, VLA1
<i>NM_002203</i>	ITGA2	İntegrin, alfa 2 (CD49B, alfa 2 altünit of VLA-2 reseptörü)	BR, CD49B, GPIa, HPA-5, VLA-2, VLAA2
<i>NM_002204</i>	ITGA3	İntegrin, alfa 3 (antigen CD49C, alfa 3 altünit of VLA-3 reseptörü)	CD49C, GAP-B3, GAPB3, ILNEB, MSK18, VCA-2, VL3A, VLA3a
<i>NM_000632</i>	ITGAM	İntegrin, alfa M (komplement komponent 3 reseptörü 3 altünit)	CD11B, CR3A, MAC-1, MAC1A, MO1A, SLEB6
<i>NM_002211</i>	ITGB1	İntegrin, beta 1 (fibronektin reseptörü, beta polipeptid, antijen CD29 includes MDF2, MSK12)	CD29, FNRB, GPIIA, MDF2, MSK12, VLA-BETA, VLAB
<i>NM_002425</i>	MMP10	Matriks metallopeptidaz 10 (stromelysin 2)	SL-2, STMY2
<i>NM_004530</i>	MMP2	Matriks metallopeptidaz 2 (jelatinaz A, 72kDa jelatinaz, 72kDa tip IV kollajenaz)	CLG4, CLG4A, MMP-II, MONA, TBE-1
<i>NM_002424</i>	MMP8	Matriks metallopeptidaz 8 (nötrofil kollajenaz)	CLG1, HNC, MMP-8, PMNL-CL
<i>NM_004994</i>	MMP9	Matriks metallopeptidaz 9 (jelatinaz B, 92kDa jelatinaz, 92kDa tip IV kollajenaz)	CLG4B, GELB, MANDP2, MMP-9

Çizelge 2.1 Gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan genlerin referans sekansı, sembolleri, gen tanımı ve gen isimleri (devamı)

<i>Referans sekans</i>	<i>Sembol</i>	<i>Gen Tanımı</i>	<i>Gen İsimleri</i>
<i>NM_003998</i>	NFKB1	Nükleer faktör kappa hafif zincir polipeptid gen enhancer B hücresi 1	EBP-1, KBF1, NF-kB1, NF-kappa-B, NF-kappaB, NFKB-p105, NFKB-p50, NFKappaB, p105, p50
<i>NM_005450</i>	NOG	Noggin	SYM1, SYNS1
<i>NM_002607</i>	PDGFA	Platelet kaynaklı büyüme faktörü alfa polipeptid	PDGF-A, PDGF1
<i>NM_000444</i>	PHEX	Fosfat düzenleyici endopeptidaz homoloğu, X-bağımlı	HPDR, HPDR1, HYP, HYP1, LXHR, PEX, XLH
<i>NM_004348</i>	RUNX2	Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2	AML3, CBF-alfa-1, CBFA1, CCD, CCD1, CLCD, OSF-2, OSF2, PEA2aA, PEBP2aA
<i>NM_001235</i>	SERPINH1	Serpin peptidaz inhibitörü, clade H (ısı şoku protein 47), üye 1, (kollajen bağlayıcı protein 1)	AsTP3, CBP1, CBP2, HSP47, OI10, PPROM, RA-A47, SERPINH2, gp46
<i>NM_005900</i>	SMAD1	SMAD ailesi üyesi 1	BSP-1, BSP1, JV4-1, JV41, MADH1, MADR1
<i>NM_005901</i>	SMAD2	SMAD ailesi üyesi 2	JV18, JV18-1, MADH2, MADR2, hMAD-2, hSMAD2
<i>NM_005902</i>	SMAD3	SMAD ailesi üyesi 3	HSPC193, HsT17436, JV15-2, LDS1C, LDS3, MADH3
<i>NM_005359</i>	SMAD4	SMAD ailesi üyesi 4	DPC4, JIP, MADH4, MYHRS
<i>NM_005903</i>	SMAD5	SMAD ailesi üyesi 5	DWFC, JV5-1, MADH5
<i>NM_000346</i>	SOX9	SRY (cinsiyet belirleyici bölge Y)-box 9	CMD1, CMPD1, SRA1
<i>NM_152860</i>	SP7	Sp7 transkripsiyon faktörü	OI11, OI12, OSX, osterix
<i>NM_000582</i>	SPP1	Salgılanmış fosfoprotein 1	BNSP, BSPI, ETA-1, OPN

Çizelge 2.1 Gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan genlerin referans sekansı, sembolleri, gen tanımı ve gen isimleri (devamı)

<i>Referans sekans</i>	<i>Sembol</i>	<i>Gen Tanımı</i>	<i>Gen İsimleri</i>
<i>NM_000660</i>	TGFB1	Transforme edici büyüme faktörü, beta 1	CED, DPD1, LAP, TGFB, TGFbeta
<i>NM_003238</i>	TGFB2	Transforme edici büyüme faktörü, beta 2	LDS4, TGF-beta2
<i>NM_003239</i>	TGFB3	Transforme edici büyüme faktörü, beta 3	ARVD, ARVD1, RNHF, TGF-beta3
<i>NM_004612</i>	TGFBR1	Transforme edici büyüme faktörü, beta reseptörü 1	AAT5, ACVRLK4, ALK-5, ALK5, LDS1A, LDS2A, MSSE, SKR4, TGFR-1
<i>NM_003242</i>	TGFBR2	Transforme edici büyüme faktörü, beta reseptörü II (70/80kDa)	AAT3, FAA3, LDS1B, LDS2B, MFS2, RIIC, TAAD2, TGFR-2, TGFbeta-RII
<i>NM_000594</i>	TNF	Tümör nekroz faktörü	DIF, TNF-alfa, TNFA, TNFSF2
<i>NM_003701</i>	TNFSF11	Tümör nekroz faktörü (ligand) superailisi, üye 11	CD254, ODF, OPGL, OPTB2, RANKL, TRANCE, hRANKL2, sOdf
<i>NM_000474</i>	TWIST1	Twist homolog 1 (Drosophila)	ACS3, BPES2, BPES3, CRS1, SCS, TWIST, bHLHa38
<i>NM_001078</i>	VCAM1	Vasküler hücre adezyon molekülü 1	CD106, INCAM-100
<i>NM_000376</i>	VDR	Vitamin D (1,25- dihidroksivitamin D3) reseptörü	NR1H1
<i>NM_003376</i>	VEGFA	Vasküler endotelyal büyüme faktörü A	MVCD1, VEGF, VPF
<i>NM_003377</i>	VEGFB	Vasküler endotelyal büyüme faktörü B	VEGFL, VRF

Çizelge 2.2 Gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan plakadaki genlerin konumları

ACVR1 A01	AHSG A02	ALPL A03	ANXA5 A04	BGLAP A05	BGN A06	BMP1 A07	BMP2 A08	BMP3 A09	BMP4 A10	BMP5 A11	BMP6 A12
BMP7 B01	BMPR1A B02	BMPR1B B03	BMPR2 B04	CALCR B05	CD36 B06	CDH11 B07	CHRD B08	COL10A1 B09	COL14A1 B10	COL15A1 B11	COL1A1 B12
COL1A2 C01	COL2A1 C02	COL3A1 C03	COL5A1 C04	COMP C05	CSF1 C06	CSF2 C07	CSF3 C08	CTSK C09	DLX5 C10	EGF C11	EGFR C12
FGF1 D01	FGF2 D02	FGFR1 D03	FGFR2 D04	FLT1 D05	FN1 D06	GDF10 D07	GLI1 D08	ICAM1 D09	IGF1 D10	IGF1R D11	IGF2 D12
IHH E01	ITGA1 E02	ITGA2 E03	ITGA3 E04	ITGAM E05	ITGB1 E06	MMP10 E07	MMP2 E08	MMP8 E09	MMP9 E10	NFKB1 E11	NOG E12
PDGFA F01	PHEX F02	RUNX2 F03	SERPINH1 F04	SMAD1 F05	SMAD2 F06	SMAD3 F07	SMAD4 F08	SMAD5 F09	SOX9 F10	SP7 F11	SPP1 F12
TGFB1 G01	TGFB2 G02	TGFB3 G03	TGFBR1 G04	TGFBR2 G05	TNF G06	TNFSF11 G07	TWIST1 G08	VCAM1 G09	VDR G10	VEGFA G11	VEGFB G12
ACTB H01	B2M H02	GAPDH H03	HPRT1 H04	RPLP0 H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

2.2.11 İstatiksel Analizler

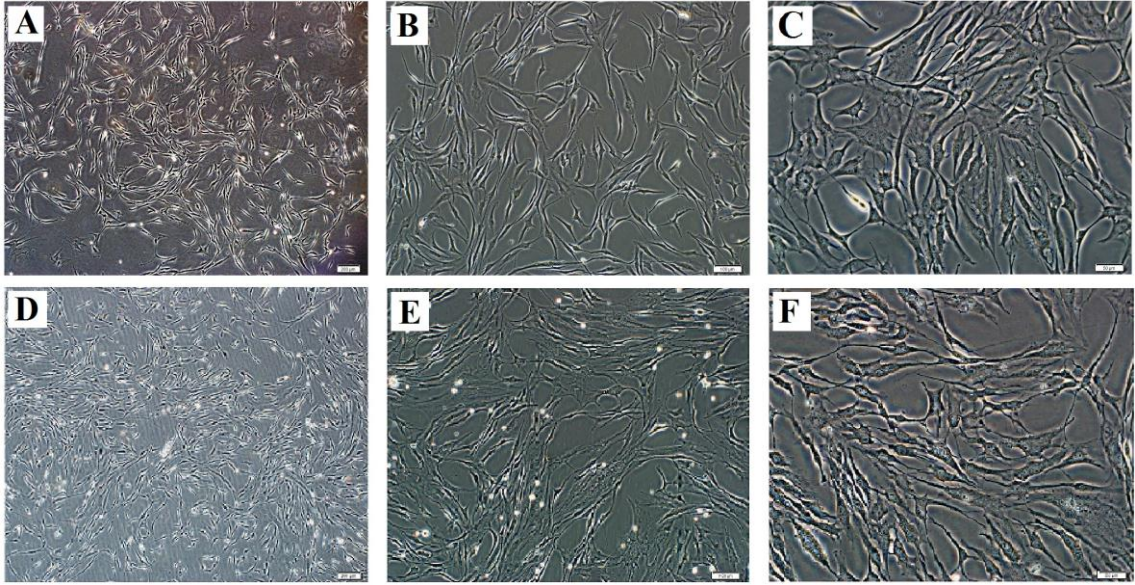
Her deney için en az 3 adet biyolojik tekrar yapılmıştır. Çalışmaların verileri, standart sapma (\pm SS) gözönünde bulundurularak rapor edilmiştir. Tüm istatiksel analizler, SPSS 13.0 ile gerçekleştirilmiştir. Veriler, eşli *t-test* kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma ve kontrol grupları arasındaki farklar için, $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı, $p \leq 0.01$ istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı sayılmaktadır.

3. BULGULAR

3.1 S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'nin Karakterizasyon Çalışmaları

3.1.1 Morfolojik Bulgular

Sağlıklı vericilerden ve MM hastalarının kemik iliği aspiratlarından başarılı bir şekilde MKH izolasyonu gerçekleştirildikten sonra ilk kültürden itibaren çalışma süresi boyunca zıt faz mikroskopu ile her gün morfolojileri incelenmiştir. Tüm gruplarda kültürün ilk günlerinden itibaren hücreler, fibroblast benzeri ve iğsi yapıda gözlenmiştir. İlerleyen günlerde hücrelerin koloniler oluşturarak çoğaldığı ve ortalama 6'ncı günden itibaren T25 kültür kabının yüzeyinin, yaklaşık %80 oranında doldurdukları gözlenmiştir. Hücreler ilerleyen pasajlarda da fibroblast benzeri ve iğsi morfolojilerini korumuşlardır. Ayrıca hücreler ökromatik çekirdekli ve sitoplazmalarında granüller izlenmiştir (Şekil 3.1).



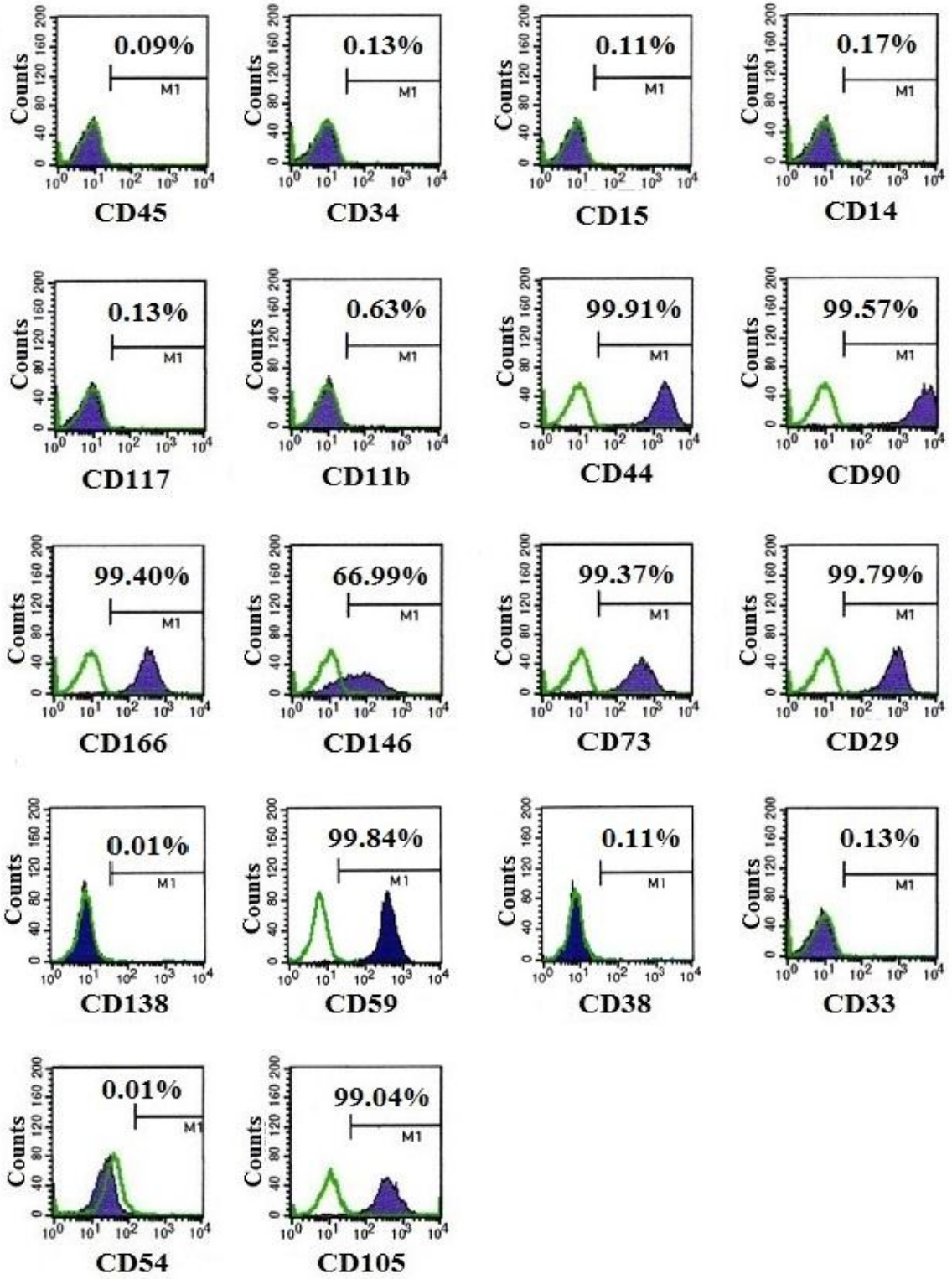
Şekil 3.1 S-Kİ-MKH (A, B, C) ve MM-Kİ-MKH'lerinin (D, E, F) zıt faz mikroskopisindeki morfolojik görünüşleri. S-Kİ-MKH (A: P0, 9.gün; B: P1, 2.gün; C: P2, 4.gün), MM-Kİ-MKH (D: P0, 8 gün; E: P1, 3.gün; F: P2, 4.gün). Orijinal Büyütme: A, D: 4X; B, E: 10X; C, E: 20X)

3.1.2 İmmunofenotipik Bulgular

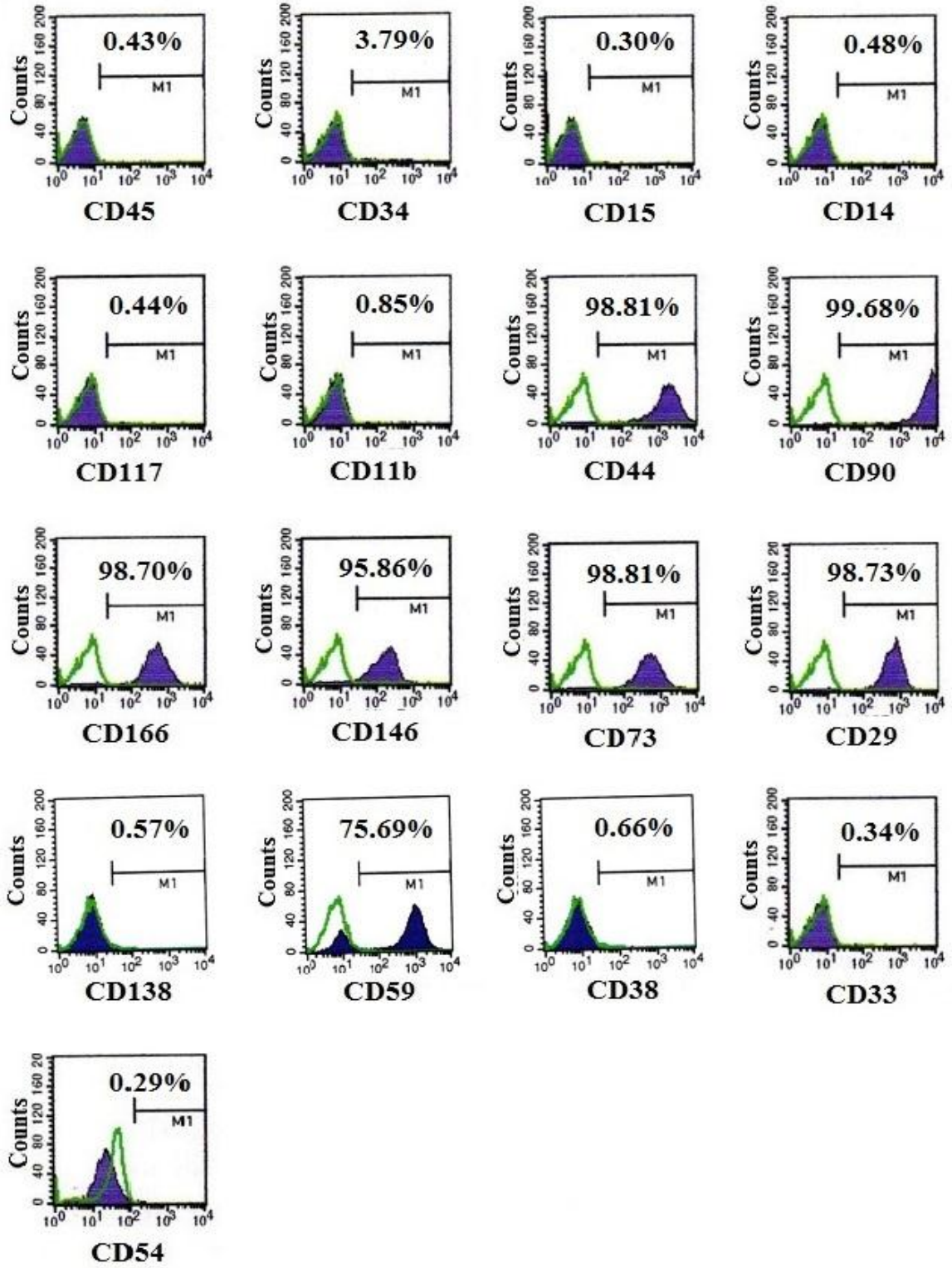
S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'inin P3'de gerçekleştirilen akım sitometrik analizleri sonucundaki histogram grafikleri Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de ve sonuç tablosu Çizelge 3.1'de görülmektedir. Akım sitometri incelemeleri sonucunda hücrelerin, MKH'ler için sıklıkla kullanılan CD44 ve CD90'ı ifade ederken CD14, CD34, CD45, CD117 gibi belirteçleri ifade etmedikleri tespit edilmiştir. Ayrıca hem S-Kİ-MKH hem de MM-Kİ-MKH'inin plazma hücre belirteçleri olan CD 38 ve CD 138'i ifade etmedikleri belirlenmiştir. Tüm olgularda CD15, CD11b, CD33 belirteçlerinin ifadelerinin negatif oldukları; CD166, CD146, CD73, CD29, CD59, CD105 belirteçlerinin ise pozitif ifade gösterdikleri tespit edilmiştir. CD54 ifadesinin değeri ise olgular arasında farklılıklar göstermektedir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerin tüm olgularından elde edilen hücrelerin akım sitometrik analizi sonuçları

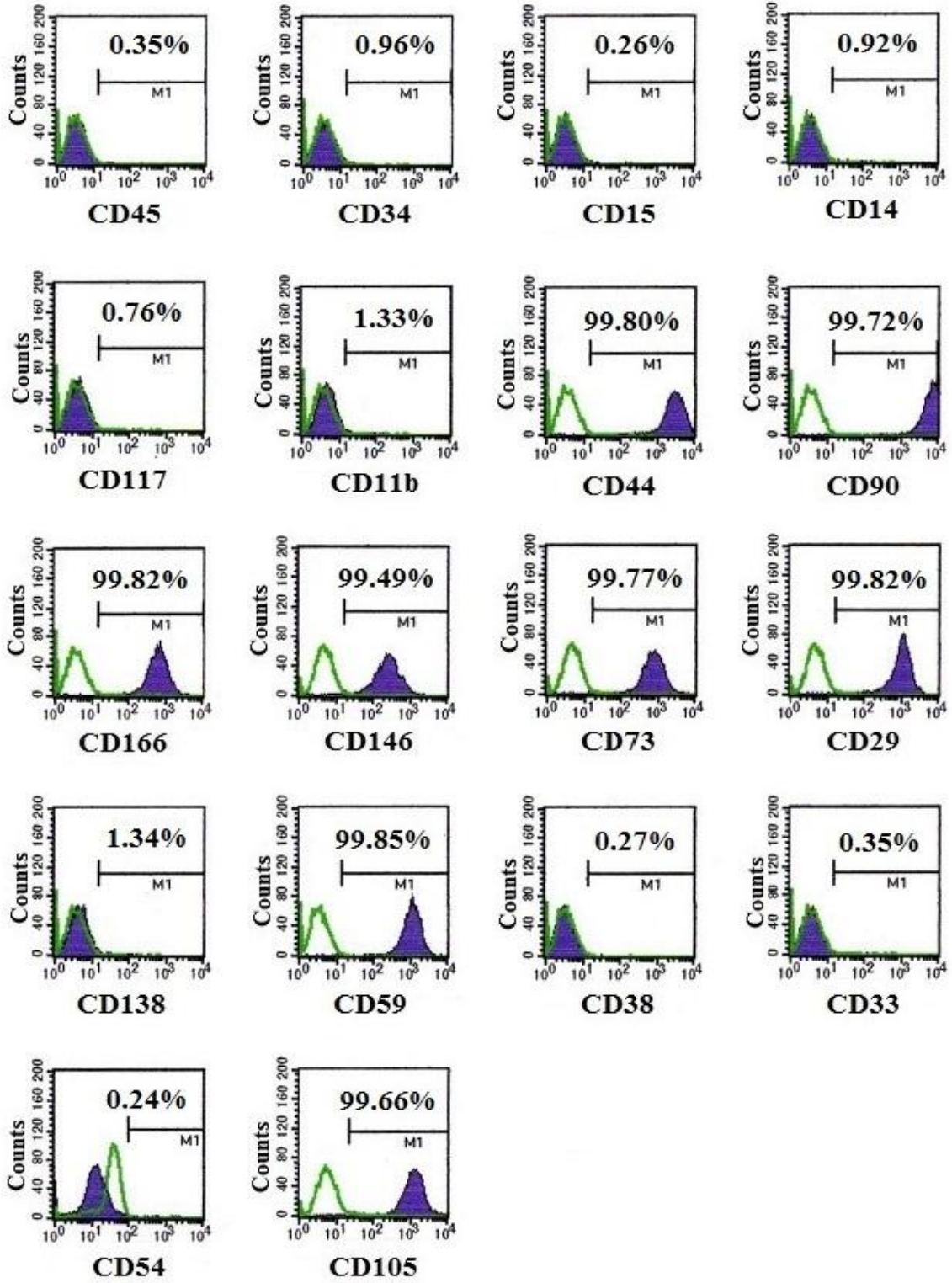
Antikor/Belirteç Adı	S-Kİ-MKH			MM-Kİ-MKH		
	Olgu 1	Olgu 2	Olgu 3	Olgu 1	Olgu 2	Olgu 3
CD 45	% 0.09	% 0.43	% 0.35	% 1.48	% 0.39	% 0.01
CD 34	% 0.13	% 3.79	% 0.96	% 0.98	% 0.37	% 0.16
CD 15	% 0.11	% 0.30	% 0.26	% 1.52	% 0.39	% 0.11
CD 14	% 0.11	% 0.48	% 0.92	% 0.73	% 0.44	% 0.54
CD 117	% 0.13	% 0.44	% 0.76	% 0.78	% 0.37	% 0.44
CD 11b	% 0.63	% 0.85	% 1.33	% 1.46	% 0.55	% 0.69
CD 44	% 99.91	% 98.81	% 99.80	% 98.31	% 99.74	% 99.85
CD 90	% 99.57	% 99.68	% 99.72	% 99.47	% 93.76	% 99.49
CD166	% 99.40	% 98.70	% 99.82	% 88.74	% 99.59	% 99.75
CD 146	% 66.99	% 95.86	% 99.49	% 48.25	% 42.32	% 87.42
CD 73	% 99.37	% 98.81	% 99.77	% 85.08	% 99.44	% 99.88
CD 29	% 99.79	% 98.73	% 99.82	% 98.81	% 99.95	% 99.92
CD 138	% 0.01	% 0.57	% 1.34	% 0.63	% 0.40	% 0.86
CD 59	% 99.84	% 75.69	% 99.85	% 98.53	% 99.97	% 99.78
CD 38	% 0.11	%0.66	% 0.27	% 0.47	% 0.46	% 0.06
CD 33	% 0.13	%0.34	% 0.35	% 0.82	% 0.33	% 0.20
CD 54	% 0.01	%0.29	% 0.24	% 20.49	% 6.88	% 0.75
CD 105	% 99.04	%98.46	% 99.66	% 93.10	% 99.81	% 99.60



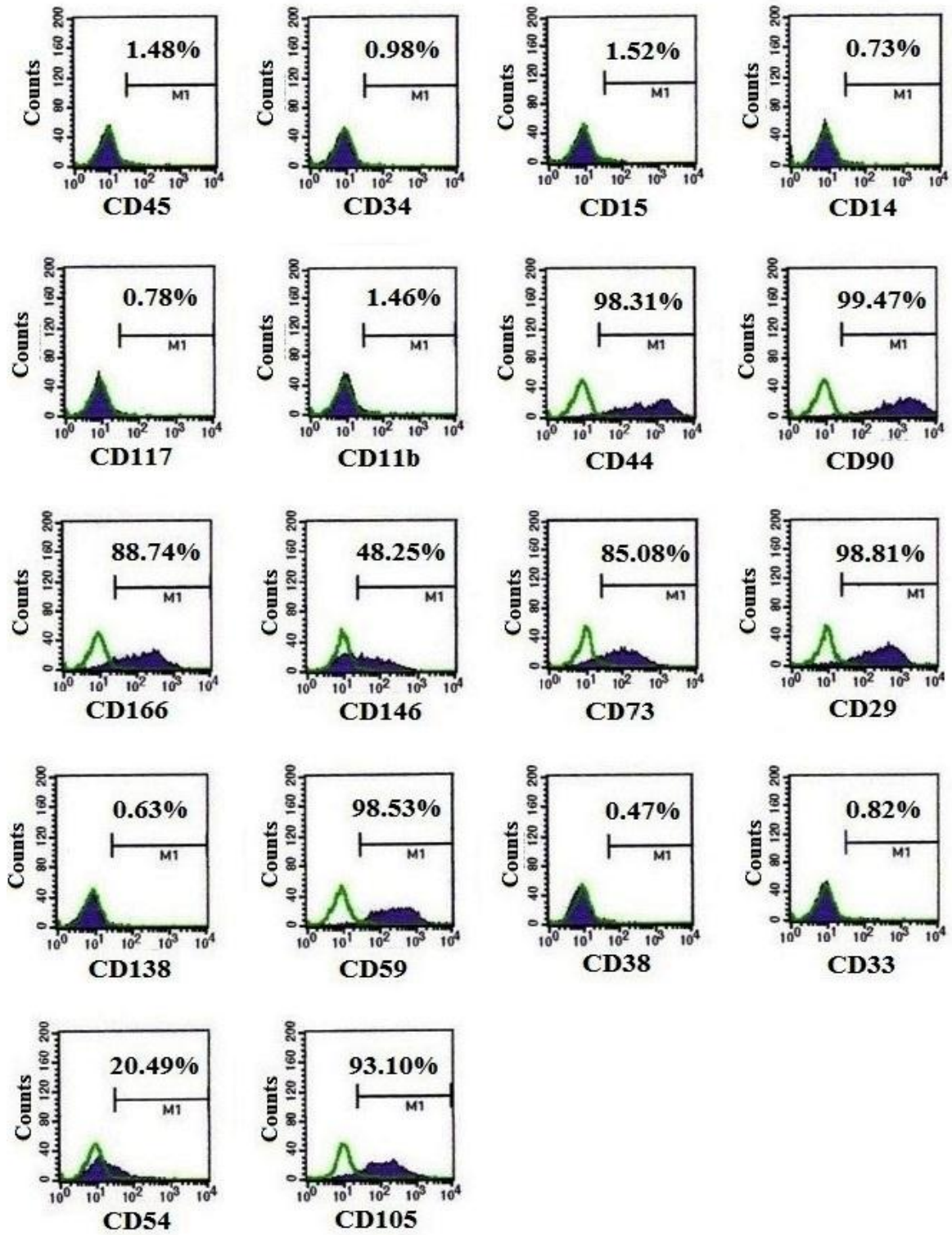
Şekil 3.2 S-Kİ-MKH'nin akım sitometrik verileri (Olgu1)



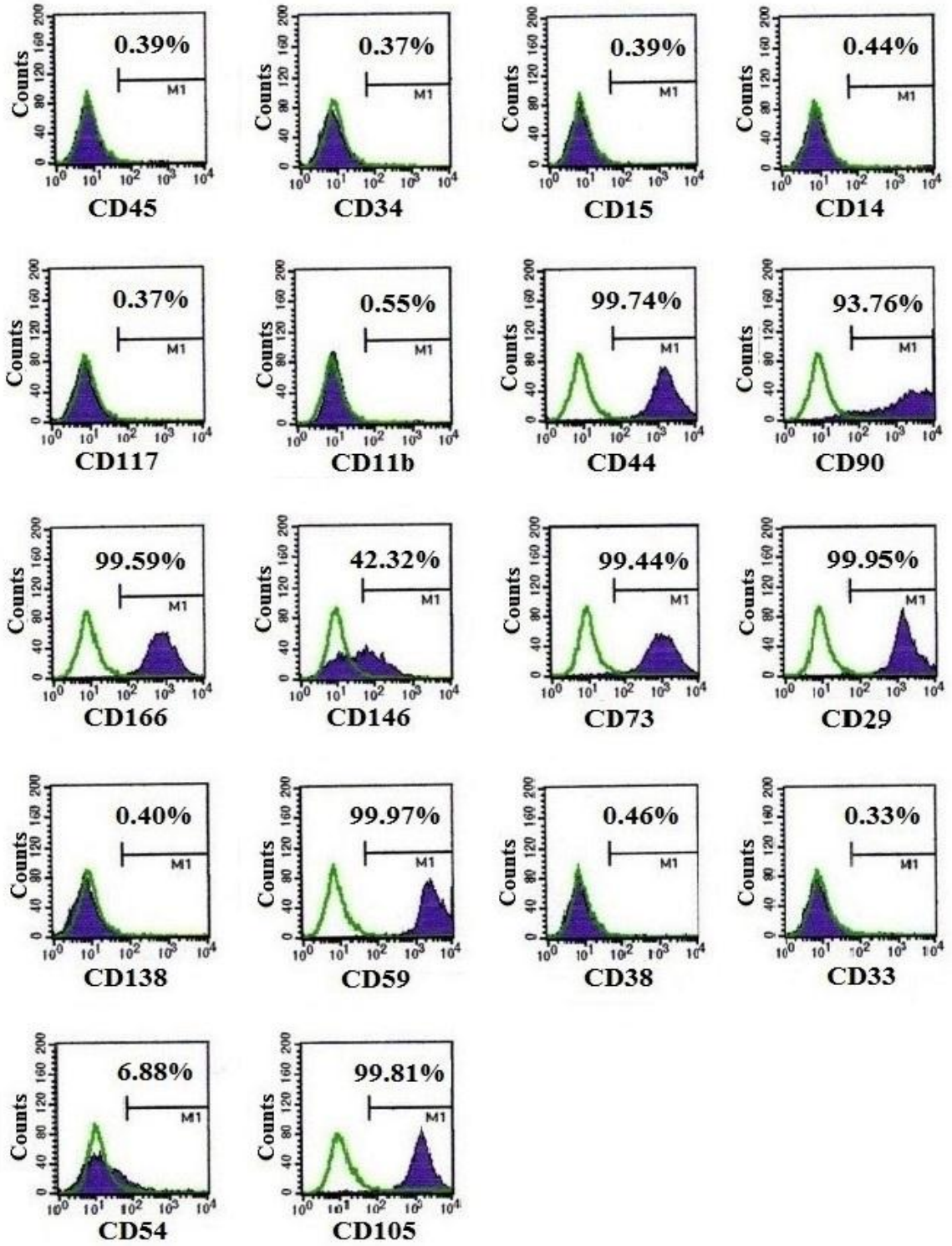
Şekil 3.3 S-Kİ-MKH'nin akım sitometrik verileri (Olgu2)



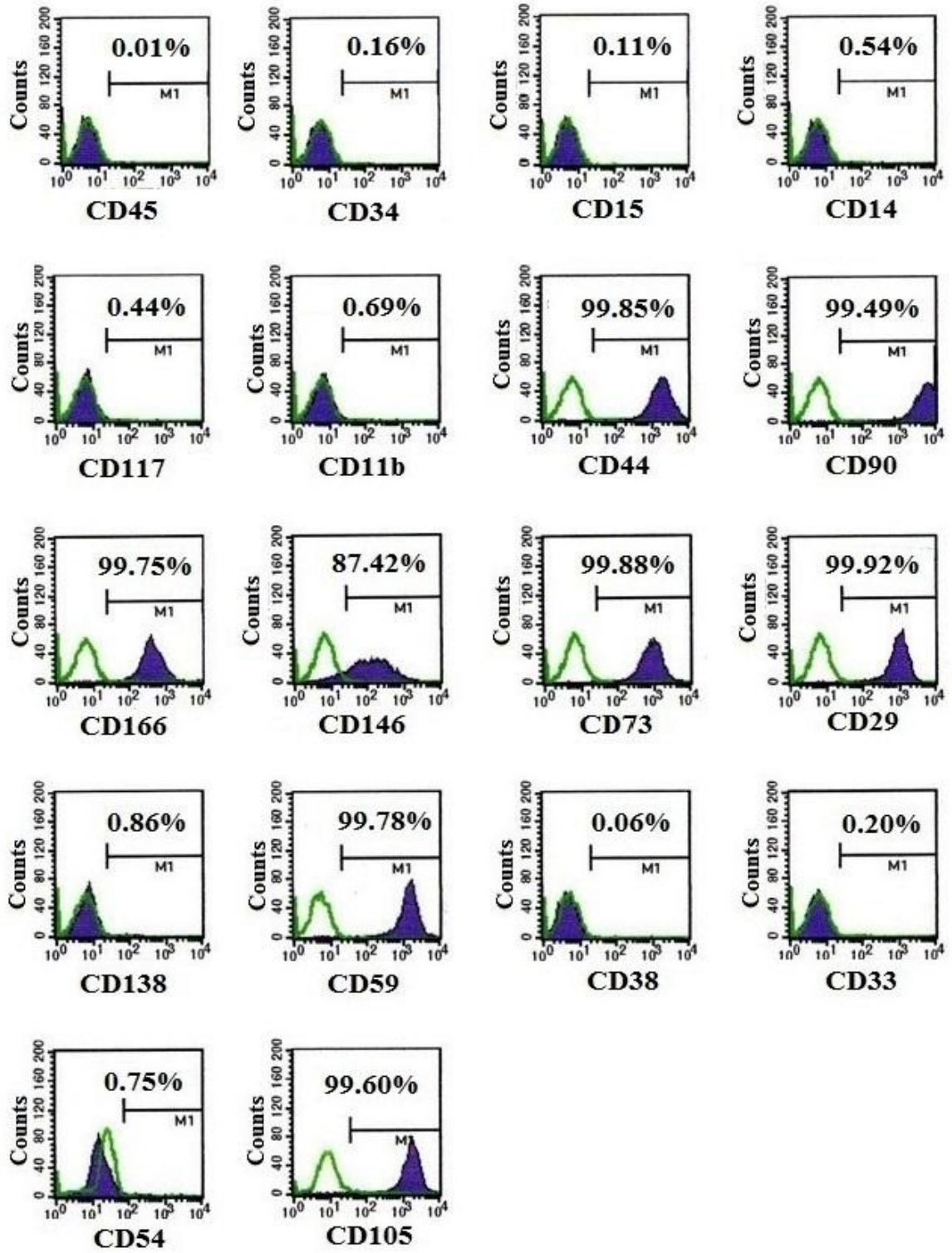
Şekil 3.4 S-Kİ-MKH'nin akım sitometrik verileri (Olgu3)



Şekil 3.5 MM-Kİ-MKH'nin akım sitometrik verileri (Olgu1)



Şekil 3.6 MM-Kİ-MKH'nin akım sitometrik verileri (Olgu2)



Şekil 3.7 MM-KI-MKH'nin akım sitometrik verileri (Olgu3)

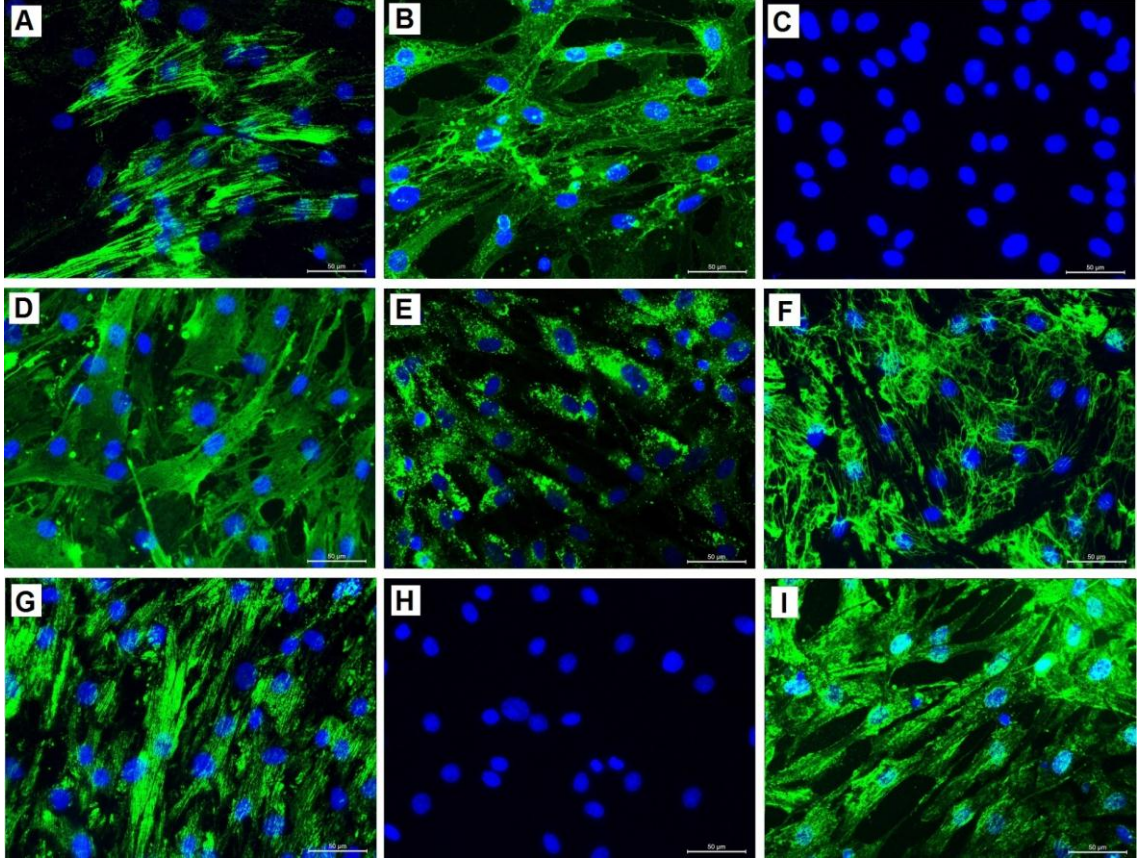
3.1.3 İmmunohistokimyasal Bulgular

MKH'de akım sitometri cihazında gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen bulguların bir kısmı immunohistokimyasal karakterizasyon çalışmaları ile desteklenmiştir. S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'in immunohistokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için; CD29, CD34, CD44, konneksin 43, fibronektin, aktin, vimentin, nestin, HLA-DR için immunfloresan boyamaları gerçekleştirilmiştir. S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'i, MKH'lerde sıklıkla pozitif olarak kabul edilen aktin, nestin, vimentin, fibronektin, CD44, CD 29 belirteçleri için kuvvetli pozitif reaksiyonlar göstermiştir. Bunun yanında HLA-DR ve CD34 belirteçlerinin ifadeleri ise negatif olarak belirlenmiştir. Ayrıca bir gap junction proteini olan connexin 43 ifadesinin S-Kİ-MKH'lerde pozitif olduğu buna karşın MM-Kİ-MKH'lerde negatif olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.2) (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9).

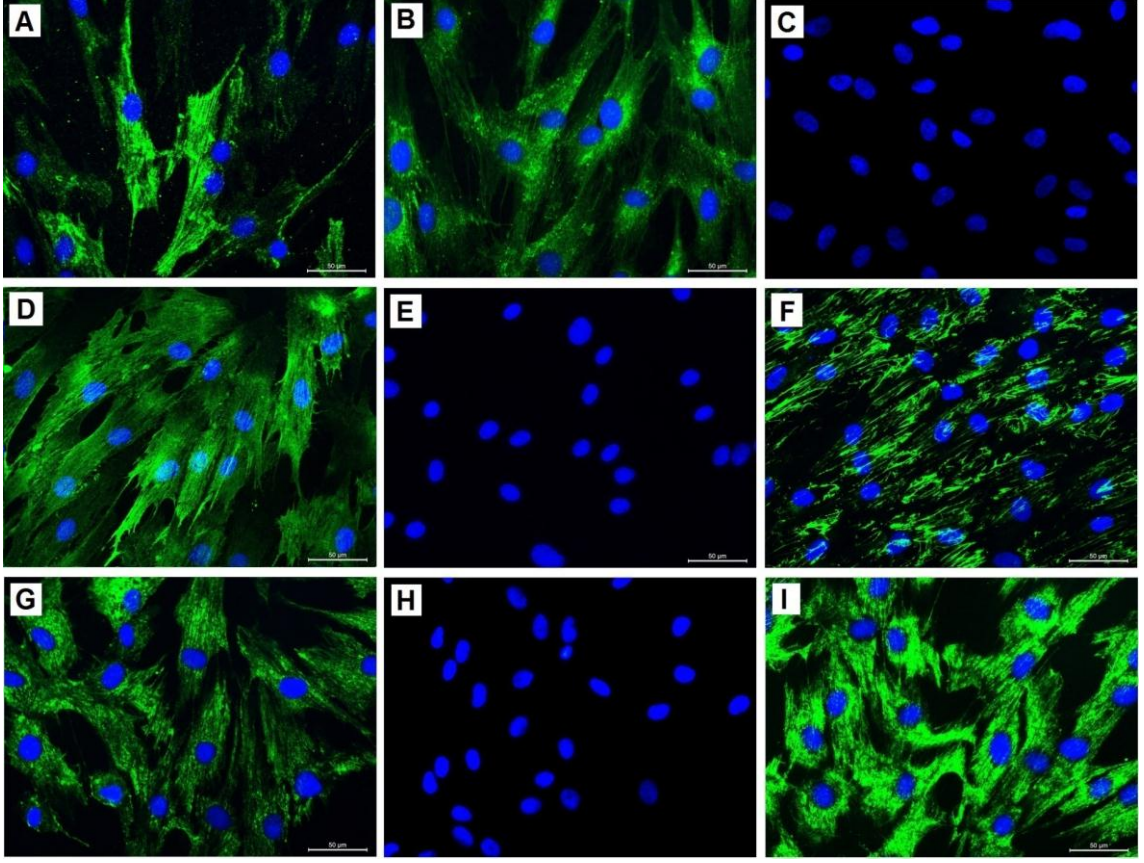
Çizelge 3.2 İmmunofloresan yöntemlerde kullanılan antikorlar, seyreltme miktarları, S-Kİ MKH ve MM-Kİ-MKH'lerdeki ifadeleri

Antikor/Belirteç	Dilüsyon (Seyreltme)	Kaynak (Marka)	İfade
β3 Tubulin (2Q121)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology	+
CD 44/HCAM(Ab-4)	1 : 150	Thermo Scientific	+
Nestin (Rat-401)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology	+
Vimentin (C-20)	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology	+
Fibronektin (EP5)	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology	+
Aktin(C-2)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology	+
CD 29 (İntegrin β1)	1:50	Santa Cruz Biotechnology	+
CD 34 (C-18)	1:150	Thermo Scientific	∅
HLA-DR (TAL1B5)	1:50	Santa Cruz Biotechnology	∅

+ Pozitif ifade; ∅ negatif ifade



Şekil 3.8 S-Kİ-MKH'lerinin immunfloresan mikroskopik görüntüleri. (A) Aktin, (B) CD29, (C) CD34, (D) CD44, (E) Konneksin 43, (F) Fibronektin, (G) Nestin, (H) HLA-DR, (I) Vimentin

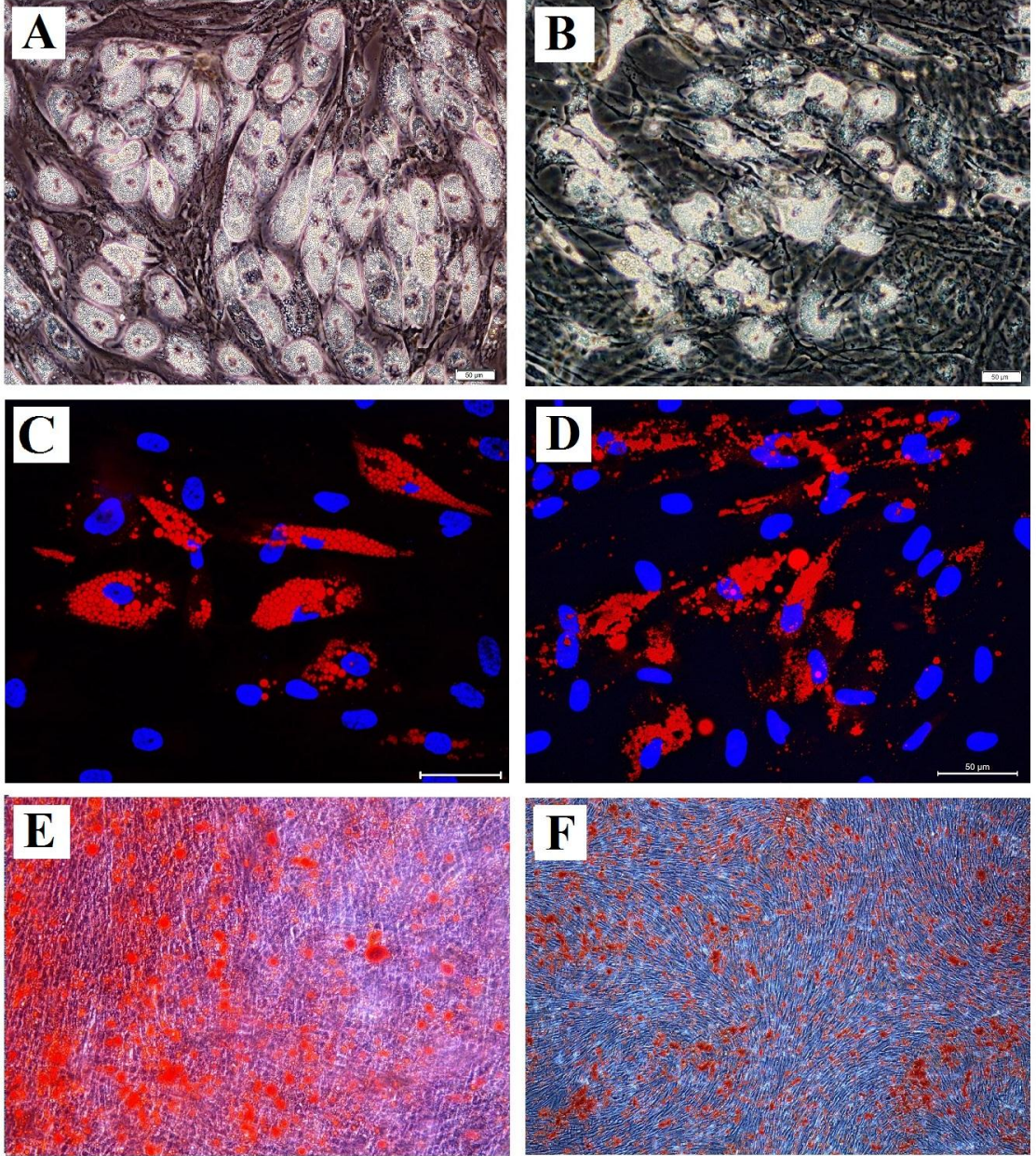


Şekil 3.9 MM-Kİ-MKH'lerinin immunfloresan mikroskobik görüntüleri. (A) Aktin, (B) CD29, (C) CD34, (D) CD44, (E) Konneksin 43, (F) Fibronektin, (G) Nestin, (H) HLA-DR, (I) Vimentin

3.1.4 MKH'lerin Farklılaşma Bulguları

S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'i yaklaşık 2 hafta adipojenik indüksiyon besi yerinde kültüre edilmiştir ve her gün zıt faz mikroskobu ile gözlenmiştir. Yaklaşık 10. günden itibaren hücrelerin adiposit benzeri farklılaşma gösterdiği tespit edilmiştir. İkinci haftanın sonunda hücrelerin sitoplazmalarında yağ damlacıkları yoğun olarak izlenmiştir (Şekil 3.10). Farklılaşmanın 14. gününde gerçekleştirilen oil red O boyaması ile boyanan yağ damlacıkları kırmızı renkte, DAPI boyaması ile çekirdekler mavi renkte gözlenmektedir (Şekil 3.10).

Hücreler osteojenik farklılaşma besi yerinde ikinci haftadan itibaren yapısal özelliklerini kaybettikleri ve kısmen küresel hücreler şeklinde kümeleşerek çoğaldıkları gözlenmiştir. S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'i osteojenik farklılaştırma kültürününün 30. günün sonunda, alizarin kırmızısıyla yapılan boyama sonucunda mineralize kemik nodülleri gözlenmiştir (Şekil 3.10).

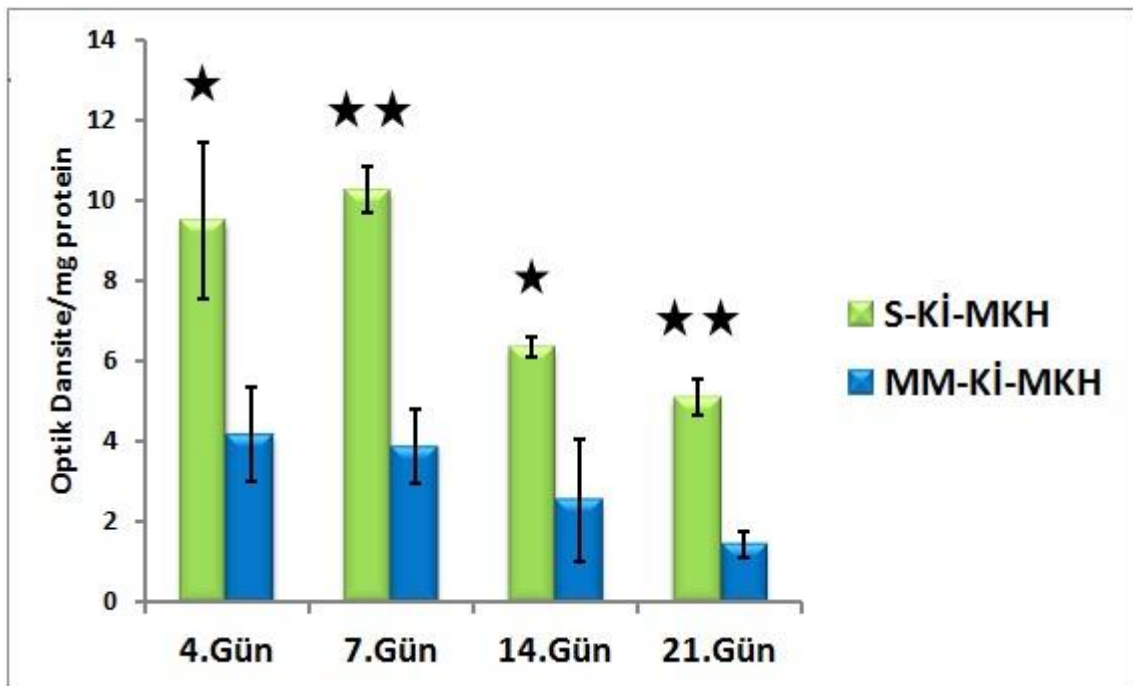


Şekil 3.10 S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerinin adipojenik ve osteojenik farklılaştırma sonrası zıt faz ve immunfloresan mikroskopik görünümleri. Adipojenik farklılaşma sonrasında Oil Red O boyaması ile yağ damlacıkları (A) S-Kİ-MKH (B) MM-Kİ-MKH. Adipojenik farklılaşmanın 14. gününde zıt faz mikroskopik görüntüleri (C) S-Kİ-MKH (D) MM-Kİ-MKH. Osteojenik indüksiyonun 30. gününde Alizarin Red S pozitif kalsifiye kemik nodülleri (E) S-Kİ-MKH (F) MM-Kİ-MKH

3.2 Deney Bulguları

3.2.1 Alkalen Fosfataz Aktivitesi Bulguları

S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'inin kültüründe osteojenik induksiyonun 4., 7., 14. ve 21. günlerinde alkalen fosfataz enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. Osteojenik induksiyonun 4. ve 14. günlerinde yapılan ALP ölçümlerinde S-Kİ-MKH ile MM-Kİ-MKH'inin arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca, 7. ve 21. Günlerinde gerçekleştirilen ALP ölçümlerinde ise bu farkın ileri derecede anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0.01$) (Şekil 3.11).



Şekil 3.11 S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerinde osteojenik induksiyon sonrasında ALP aktivitesinin günlere göre değişimini gösteren çubuk grafiği. Osteojenik induksiyonun 4., 7., 14.,ve 21. günlerinde gerçekleştirilen ALP tayini sonuçlarının çubuk grafiği ile karşılaştırılması. İstatistiksel analiz sonucunda p değerleri 4.gün ($p=0.0232$), 7.gün ($p=0.0014$), 14.gün ($p=0.045$) ve 21.gün ($p=0.0006$) olarak belirlenmiştir.

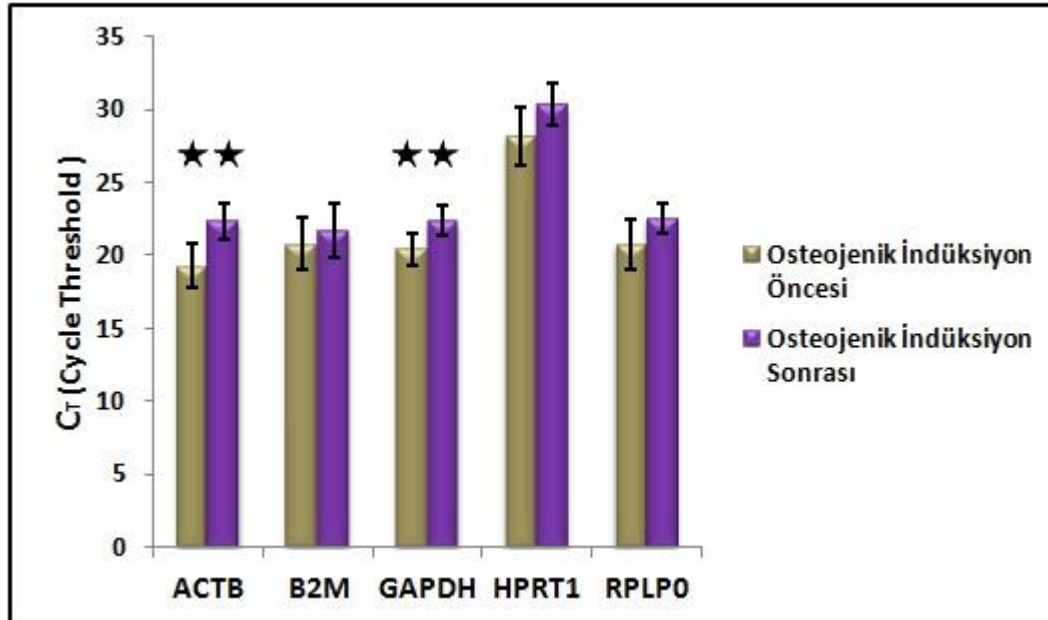
3.2.2 Gerçek Zamanlı PZR Analizi Bulguları

S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'nin osteojenik yollarda rol oynayan gen ifadelerinin osteojenik induksiyon öncesinde ve induksiyondan 30 gün sonrasında Real Time-PZR yöntemi ile analizinden elde edilen sonuçlar değerlendirilerek 84 genin ifadesi başlıklar altında aşağıda belirtilmiştir. Gerçekleştirilen 12 ayrı PZR Array analizi sonucunda

yapılan istatistiksel değerlendirmede referans gen olarak istatistiksel olarak değeri en az değişkenlik gösteren *HPRT* seçilmiştir ($p>0.05$). Ayrıca *HPRT*'nin osteojenik farklılaşma analizlerinde de kullanılması uygun olduğu literatürde de desteklenmektedir [52]. PZR Array plakasının içerdiği referans genler, C_T değerleri ve standart sapmaları Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Referans genlerin osteojenik indüksiyon öncesi ve sonrasındaki C_T değerlerinin ortalamaları, standart sapmaları ve p değerleri

HKG	Osteojenik İndüksiyon Öncesi C_T	Osteojenik İndüksiyon Sonrası C_T	p değeri
ACTB	19,29±1.50	22.37±1.24	0.003**
B2M	20.78±1.70	21.67±1.88	0.416
GAPDH	20.40±1.11	22.38±1.01	0.009**
HPRT1	28.20±1.99	30.31±1.45	0.066
RPLP0	20.75±1.72	22.49±1.01	0.066



Şekil 3.12 Osteojenik indüksiyon öncesi ve sonrasında referans genlerin ifade değişimlerinin karşılaştırmalı çubuk grafiği

3.2.2.1 Osteojenik İndüksiyon Öncesinde Gen İfade Analizi Bulguları

Osteojenik indüksiyon öncesinde sağlıklı ve miyelom Kİ-MKH'leri gen ifadeleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Gerçekleştirilen PZR Analizi sonucunda *SP7* gen ifadesinin MM-Kİ-MKH'lerinde sağlıklı gruba göre anlamlı olarak 6.22 kat düşük olduğu gözlenmiştir ($p=0.014$) (Çizelge 3.4). İfadeleri değişiklik gösteren diğer genlerdeki farklar ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 MM-Kİ-MKH'lerde osteojenik indüksiyon öncesi S-Kİ-MKH'lere oranla kat değişimleri ve p değerleri

<i>Gen Adı</i>	<i>Kat Değişimi</i>	<i>p değeri</i>	<i>Gen Adı</i>	<i>Kat Değişimi</i>	<i>p değeri</i>
<i>AHSG</i>	-10.34±3.85	0.233	<i>EGF</i>	-3.96±1.77	0.142
<i>BMP1</i>	-3.85±3.07	0.305	<i>FLT1</i>	-24.03±3.78	0.192
<i>BMP3</i>	-14.32±4.18	0.321	<i>GDF10</i>	-8.19±5.05	0.246
<i>BMP4</i>	-15.71±1.94	0.077	<i>IGF2</i>	12.30±7.92	0.876
<i>BMP7</i>	-17.15±2.82	0.235	<i>IHH</i>	-4.85±1.05	0.075
<i>CALCR</i>	-8.84±4.05	0.258	<i>ITGA2</i>	-5.25±2.97	0.277
<i>CHRD</i>	-3.21±3.48	0.311	<i>MMP9</i>	-7.36±3.95	0.276
<i>COL10A1</i>	-3.05±2.81	0.222	<i>NOG</i>	-3.17±3.48	0.312
<i>COL2A1</i>	-21.36±2.50	0.266	<i>SP7</i>	-6.12±0.72	0.014*
<i>COMP</i>	-5.41±5.75	0.267	<i>TGFB3</i>	-4.20±0.88	0.0844
<i>CSF2</i>	-10.93±2.40	0.123	<i>TNF</i>	-12.32±4.17	0.283
<i>CSF3</i>	-7.45±3.90	0.320	<i>VCAM1</i>	3.17±1.88	0.093
<i>CTSK</i>	3.53±3.58	0.844			

(*)İstatistiksel olarak anlamlı

(**)İstatistiksel olarak ileri derecede anlamlı

3.2.2.2 Osteojenik İndüksiyon Sonrasında Gen İfade Analizi Bulguları

3.2.2.2.1 Transkripsiyon Faktörleri ve Düzenleyiciler

Hücreler metabolik faaliyetlerini çeşitli mekanizmalar aracılığı ile düzenleyebilmektedir. Düzenleyici mekanizmalar, etkilerini genelde gen faaliyeti üzerinde göstermekte olup bu etkilerde birçok protein anahtar rolü oynamaktadır. Gen faaliyeti, transkripsiyon seviyesinde düzenlenmektedir. Osteogenez süreci

transkripsiyon faktörleri ve onların düzenleyicilerinin aktivasyonu veya inaktivasyonu ile başlar ve gelişir. Bu çalışmada gerçekleştirilen Real-Time PZR Array ile S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH’de osteojenik indüksiyon öncesinde ve sonrasında rol oynayan bazı transkripsiyon faktörleri ve düzenleyicilerinin gen ifadeleri belirlenmiştir.

Real-Time PZR Array analizi sonucunda *GLI1*, *NFKB1*, *RUNX2*, *SMAD1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SOX9* ve *TNF* gen ifadelerinde hem S-Kİ-MKH hem de MM-Kİ-MKH’de osteojenik indüksiyon sonrasında bir farklılık gözlenmemiştir. Bunun yanında *TWIST1*’in S-Kİ-MKH’de osteojenik indüksiyon sonrasında 9.49 kat ($p<0.05$) arttığı belirlenmiştir. MM-Kİ-MKH’de ise bu iki gen ifadesi değişmemiştir (Çizelge 3.5) (Şekil 3.13).

Çizelge 3.5 Transkripsiyon faktörleri ve düzenleyici genlerin S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH’lerde osteojenik indüksiyon sonrası kat değişimleri ve p değerleri

GEN ADI	S-Kİ-MKH		MM-Kİ-MKH	
	Kat Değişimi	p değeri	Kat Değişimi	p değeri
NFKB1	1.46±2.19	0.844	1.18±0.66	0,451
RUNX2	2.87±2.87	0.529	1.64±0.55	0,081
SMAD1	1.39±1.71	0.983	1.06±0.38	0,797
SMAD2	2.45±2.13	0.330	-1.08±0.34	0,640
SMAD3	1.04±1.54	0.606	1.13±0.76	0,848
SMAD4	1.91±1.93	0.463	-1.11±0.52	0,691
SOX9	1.23±2.90	0.770	2.06±1.73	0,698
TNF	1.65±4.50	0.570	10.58±1.76	0,24
TWIST1	9.49±1.81	0.015*	2.93±0.41	0,014*
GLI1	5.67±4.94	0.370	1.08±1.04	0,66

(*)İstatistiksel olarak anlamlı

3.2.2.2.2 İskelet Gelişiminde Rol Oynayan Genler

İskelet gelişimi, embriyonik dönemden erişkinliğe kadar olan süre içinde büyük oranda tamamlansa da hayat boyu devam eden bir süreçtir. Büyümenin erişkinlikte durmasına rağmen vücutta süregelen bir yıkım ve yapım dengesinden dolayı iskelet gelişiminde rol oynayan genler bu süreçler içerisinde aktif durumdadırlar. İskelet gelişimde rol oynayan genler kıkırdak ve osteoblastların oluşumu ve fonksiyonlarından sorumludurlar.

Bu çalışmada, S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH’de iskelet gelişimi aşamalarında rol oynayan genlerin osteojenik indüksiyon öncesinde ve sonrasında Real-time PZR analizleri gerçekleştirilmiştir. İskelet gelişim aşamalarının çeşitli evrelerinde rol oynayan *ACVR1*, *AHSG*, *BGLAP*, *BMP1*, *BMP2*, *BMP3*, *BMP5*, *BMP6*, *BMP7*, *BMPR1A*, *BMPR1B*, *BMPR2*, *CDH11*, *CHRD*, *COL2A1*, *CTSK*, *DLX5*, *EGFR*, *FGF2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *GDF10*, *IGF1*, *IGF2*, *IGF1R*, *IHH*, *MMP2*, *MMP8*, *MMP9*, *NOG*, *SP7*, *SPP1*, *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*, *TGFBRI* ve *TNFSF11* genlerinin ifadelerinde hem S-Kİ-MKH hem de MM-Kİ-MKH’de osteojenik indüksiyon sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak, *BMP-4*, *COL1A1* ve *CSF1* gen ifadelerindeki kat artışı veya azalışlarının S-Kİ-MKH’de ve/veya MM-Kİ-MKH’de osteojenik indüksiyondan sonra değiştiği belirlenmiştir. *CSF1* gen ifadesinde osteojenik indüksiyon sonrasında MM-Kİ-MKH’de 10.73 kat ($p<0.05$) arttığı belirlenmiştir. *BMP4* gen ifadesi S-Kİ-MKH’de değişmezken, MM-Kİ-MKH’de 3.36 kat arttığı ($p<0.05$) gözlenmiştir (Çizelge 3.6) (Şekil 3.13).

Çizelge 3.6 İskelet gelişiminde rol oynayan genlerin S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH’lerde osteojenik indüksiyon sonrası kat değişimleri ve p değerleri

GEN ADI	S-Kİ-MKH		MM-Kİ-MKH	
	Kat Değişimi	p değeri	Kat Değişimi	p değeri
ACVR1	2,53±1,86	0.243	-1.71±0.47	0.420
AHSG	1.13±4.15	0.531	7.52±0.95	0.082
BGLAP	3.13±2.44	0.257	-1.04±1.54	0.609
BMP1	-2,87±3.52	0.381	-1.06±0.96	0.682
BMP2	12.73±4.07	0.187	11.99±1.55	0.070
BMP3	-1.54±4.38	0.407	7.11±1.59	0.193
BMP4	-2.50±2.52	0.333	3.36±1.16	0.024*
BMP5	3.27±6.40	0.345	2.82±4.26	0.940
BMP6	4.25±2.84	0.542	-1.56±1.84	0.835
BMP7	1.70±3.63	0.771	8.46±1.22	0.147
BMPR1A	1.87±2.41	0.572	-1.03±0.38	0.873
BMPR1B	5.72±4.66	0.984	2.25±1.32	0.221
BMPR2	1.44±2.13	0.882	1.24±0.71	0.632
CDH11	-1.24±2.19	0.805	-1.56±1.16	0.632

Çizelge 3.6 İskelet gelişiminde rol oynayan genlerin S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH’lerde osteojenik induksiyon sonrası kat değişimleri ve *p* değerleri (devamı)

GEN ADI	S-Kİ-MKH		MM-Kİ-MKH	
	Kat Değişimi	<i>p</i> değeri	Kat Değişimi	<i>p</i> değeri
EGFR	4.25±2.92	0.294	1.55±1.05	0.518
FGF2	4.55±2.06	0.210	-1.08±0.44	0.614
FGFR1	3.02±1.80	0.264	2.73±0.46	0.013*
FGFR2	-1.74±3.40	0.452	-4.72±2.77	0.155
GDF10	-1.31±4.83	0.331	4.10±2.59	0.388
IGF1	-1.51±1.99	0.423	-1.23±2.00	0.793
IGF2	36.34±6.88	0.664	-1.32±4.77	0.258
IGF1R	1.94±1.39	0.316	1.96±0.58	0.036
IHH	-1.39±1.77	0.805	1.48±0.58	0.204
MMP2	3.56±2.81	0.708	1.96±0.68	0.096
MMP8	-1.21±1.88	0.608	-1.85±1.63	0.425
MMP9	2.07±4.19	0.914	5.58±2.41	0.303
NOG	2.23±3.48	0.459	13.71±3.00	0.218
SP7	-1.46±1.63	0.962	2.23±0.58	0.032
SPP1	1.90±3.69	0.712	-2.03±1.92	0.453
TGFB1	2.38±1.46	0.796	2.16±0.24	0.001**
TGFB2	2.51±2.95	0.420	-2.25±0.79	0.111
TGFB3	-2.38±1.46	0.291	1.10±0.44	0.693
TGFBR1	2.32±2.88	0.837	1.07±1.11	0.865
TNFSF11	1.79±3.25	0.924	2.08±2.03	0.704

(*)İstatistiksel olarak anlamlı

(**)İstatistiksel olarak ileri derecede anlamlı

3.2.2.2.3 Kemik Mineral Metabolizması

Kemik mineral metabolizmasında rol oynayan *ANXA5* ve *CALCR* gen ifadeleri, S-Kİ-MKH ve M-Kİ-MKH’de osteojenik indüksiyon sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değişmediği gözlenmiştir. Bunun yanı sıra *VDR* gen ifadesi MM-Kİ-MKH’de 3.94 kat artarken ($p<0.05$) S-Kİ-MKH’de değişmediği belirlenmiştir (Çizelge 3.7) (Şekil 3.13).

Çizelge 3.7 Kemik mineral metabolizmasında rol oynayan genlerin S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH’lerde osteojenik indüksiyon sonrası kat değişimleri ve p değerleri

GEN ADI	S-Kİ-MKH		MM-Kİ-MKH	
	Kat Değişimi	p değeri	Kat Değişimi	p değeri
ANXA5	2.30±1.94	0.325	-1.43±0.81	0.333
CALCR	1.06±4.27	0.491	5.98±1.23	0.095
VDR	2.60±3.50	0.866	3.94±0.58	0.030*

(*)İstatistiksel olarak anlamlı

(**)İstatistiksel olarak ileri derecede anlamlı

3.2.2.2.4 Hücreler Arası Madde Elemanları

Kıkırdak ve kemik doku oluşumunda hücreler arası ara madde elemanlarının oluşumu ve düzenlenmesinde görev alan genler arasında *ALPL*, *BGN*, *COL1A2*, *COL5A1*, *COL10A1*, *COL14A1*, *COL15A1*, *FLT1*, *MMP10*, *SERPINH1* ve *PHEX* genlerinin ifadelerinde S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH’de osteojenik indüksiyon sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Bunun yanı sıra *COL3A1* gen ifadesi S-Kİ-MKH’lerde osteojenik indüksiyon sonrasında değişmezken, MM-Kİ-MKH’lerde bu gen ifadesinin 4.64 kat azaldığı ($p<0.05$) gözlenmiştir (Çizelge 3.8) (Şekil 3.13).

Çizelge 3.8 Hücreler arası maddenin yapımında rol oynayan genlerin S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerde osteojenik indüksiyon sonrası kat değişimleri ve *p* değerleri

GEN ADI	S-Kİ-MKH		MM-Kİ-MKH	
	Kat Değişimi	<i>p</i> değeri	Kat Değişimi	<i>p</i> değeri
ALPL	-1.06±2.76	0.381	1.24±2.71	0.739
BGN	-1.98±3.69	0.536	-2.31±1.87	0.201
COL1A2	-6.39±3.86	0.479	-5.36±1.56	0.110
COL3A1	-6.62±3.85	0.273	-4.64±0.98	0.015*
COL5A1	-4.82±2.77	0.177	-10.78±1.91	0.116
COL10A1	-1.38±4.15	0.906	-1.99±0.67	0.057
COL14A1	-1.59±3.39	0.286	-3.35±1.41	0.076
COL15A1	-2.02±3.16	0.485	-10.90±4.39	0.156
FLT1	-1.08±4.26	0.478	10.13±1.66	0.232
MMP10	-1.08±1.92	0.697	1.35±0.96	0.400
PHEX	1.69±2.56	0.526	1.80±0.87	0.163
SERPINH1	1.01±2.07	0.864	-3.05±1.14	0.081

(*)İstatistiksel olarak anlamlı

(**)İstatistiksel olarak ileri derecede anlamlı

3.2.2.2.5 Hücre Adezyon Molekülleri

Hücreler arası adezyondan sorumlu genler arasından *ICAM1* gen ifadesinde, S-Kİ-MKH'de osteojenik indüksiyon sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, MM-Kİ-MKH'de 7.11 kat arttığı belirlenmiştir ve bu artış istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıdır ($p < 0.01$). Ayrıca *ITGB1* gen ifadesi MM-Kİ-MKH'lerde osteojenik indüksiyon sonrasında 4.57 kat azaldığı ($p < 0.01$) ve S-Kİ-MKH'lerde değişmediği gözlenmiştir. Buna karşılık, *VCAM1*, *CD36*, *ITGA1*, *ITGA2*, *ITGA3*, *ITGAM*, *COMP* ve *FNI* genlerinin ifadelerinde her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Çizelge 3.8) (Şekil 3.13).

Çizelge 3.9 Hücre adezyonunda rol oynayan genlerin S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH’lerde osteojenik indüksiyon sonrası kat değişimleri ve *p* değerleri

GEN ADI	S-Kİ-MKH		MM-Kİ-MKH	
	Kat Değişimi	<i>p</i> değeri	Kat Değişimi	<i>p</i> değeri
CD36	-1.65±3.58	0.335	1.97±1.74	0.358
COMP	-2.19±6.17	0.608	3.28±5.46	0.592
FN1	1.41±2.56	0.982	-1.22±0.81	0.706
ICAM1	6.26±4.22	0.878	7.11±0.35	0.001**
ITGB1	-1.39±1.75	0.505	-4.57±0.48	0.001**
ITGA1	-1.14±3.16	0.667	-1.84±0.66	0.085
ITGA2	-1.32±2.98	0.431	3.66±1.29	0.123
ITGA3	1.36±2.79	0.656	1.26±0.91	0.760
ITGAM	1.71±1.28	0.580	1.47±1.20	0.392
VCAM1	1.41±2.60	0.623	-2.21±0.82	0.059

(*)İstatistiksel olarak anlamlı

(**)İstatistiksel olarak ileri derecede anlamlı

3.2.2.2.6 Büyüme Faktörleri

Kemik yapımı ve yıkımı mekanizmalarında rol oynayan büyüme faktörlerinden *CSF2*, *CSF3*, *EGF*, *FGF1*, *PDGFA* ve *VEGFB* gen ifadeleri her iki grupta da osteojenik induksiyon sonrası istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değişmezken, *VEGFA* geninin ifadesinin S-Kİ-MKH’de 3.56 kat azaldığı ($p<0.05$) belirlenmiştir (Çizelge 3.9) (Şekil 3.13).

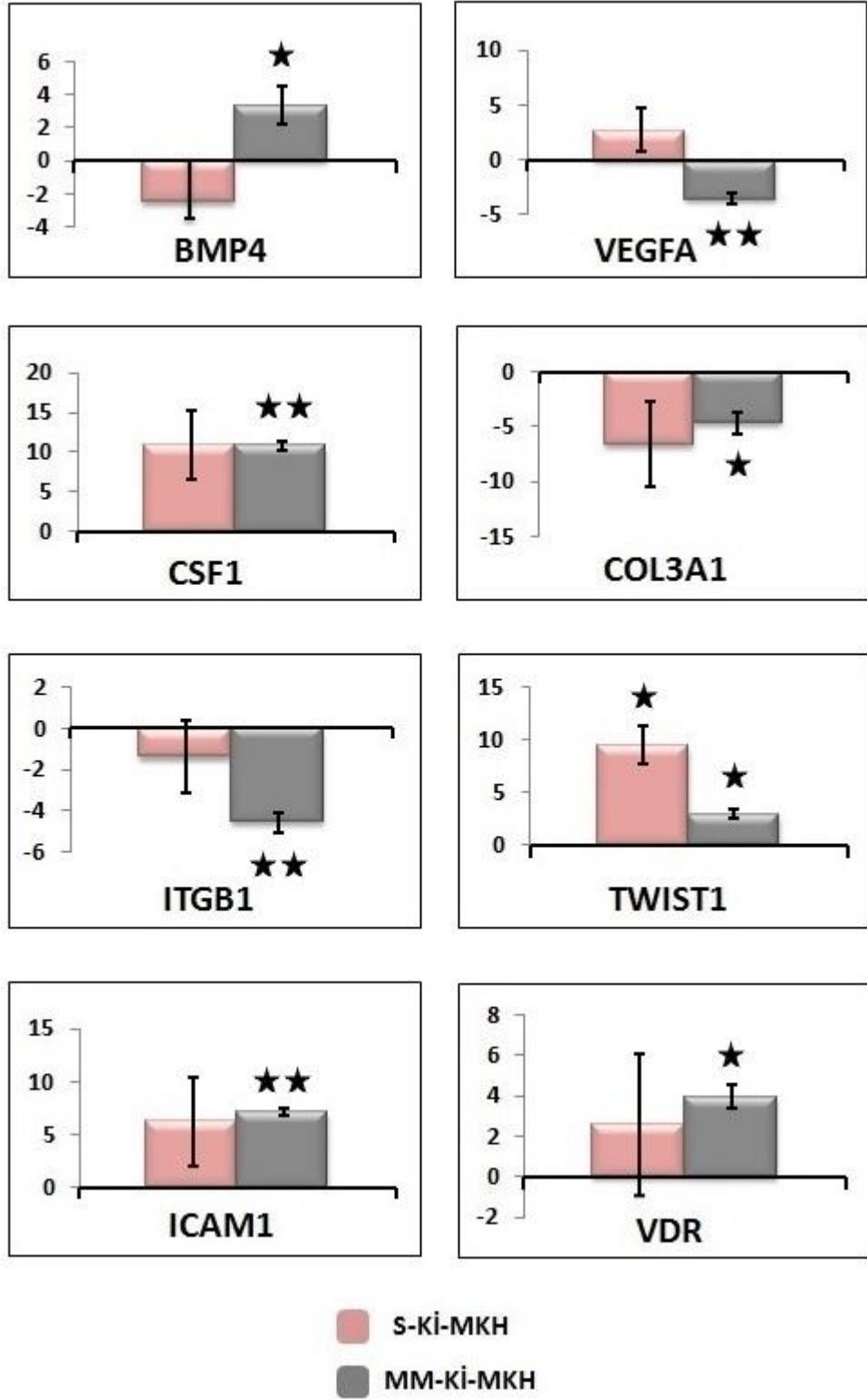
Çizelge 3.10 Büyüme faktörü genlerinin S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH’lerde osteojenik induksiyon sonrası kat değişimleri ve p değerleri

GEN ADI	S-Kİ-MKH		MM-Kİ-MKH	
	Kat Değişimi	p değeri	Kat Değişimi	p değeri
CSF2	-1.02±2.90	0.784	2.19±1.11	0.253
CSF3	1.41±3.49	0.691	1.029±2.90	0.205
EGF	-2.55±2.03	0.241	-1.30±1.11	0.689
FGF1	-2.91±2.60	0.339	-2.87±1.68	0.200
PDGFA	1.42±2.03	0.925	1.59±0.93	0.287
VEGFA	2.75±1.98	0.248	-3.56±0.50	0.006**
VEGFB	4.20±2.82	0.372	1.98±0.45	0.032

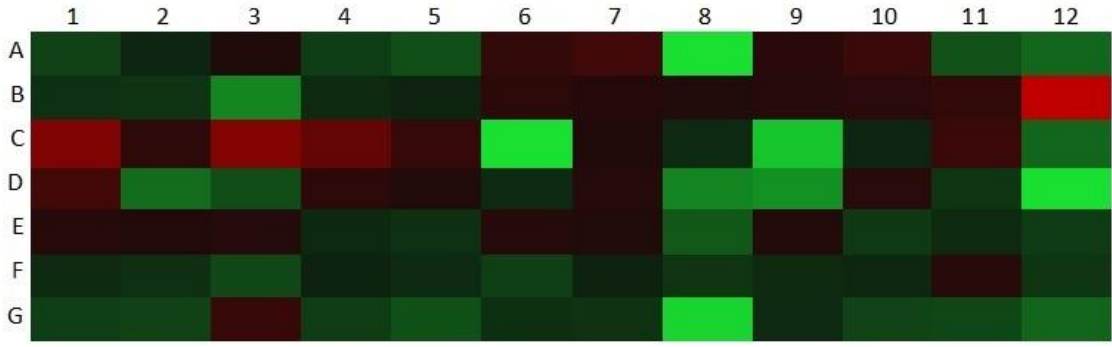
(*)İstatistiksel olarak anlamlı

(**)İstatistiksel olarak ileri derecede anlamlı

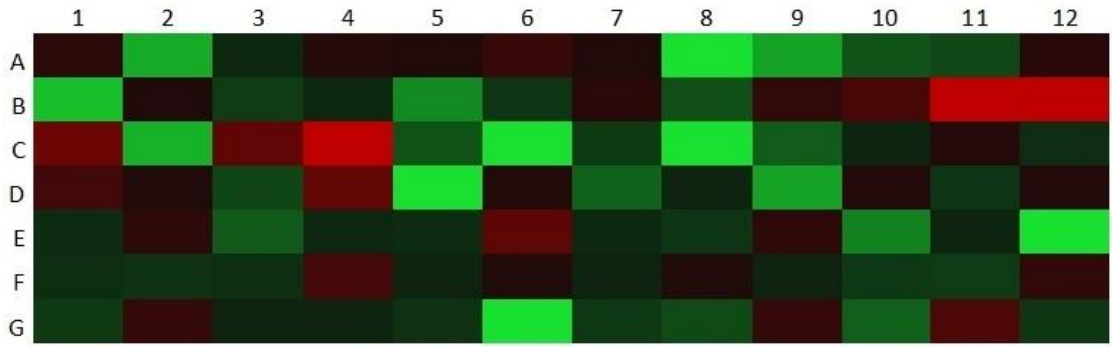
Kat Değerleri



Şekil 3.13 Gerçek zamanlı PZR analizi sonrasında S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerde gen ifadelerinin değişimini gösteren çubuk grafiği



Şekil 3.14 S-Kİ-MKH'lerinde gen ifade değişimlerini gösteren ısı haritası



Şekil 3.15 MM-Kİ-MKH'lerinde gen ifade değişimlerini gösteren ısı haritası

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

Multipl miyelom hastalığı insanların yaşadığı coğrafya, sosyo-ekonomik şartlar ve etnik kökene göre değişiklik gösteren bir kanser türü olmasının yanında diğer kanser türlerinde olduğu gibi hücrelerin genetik yapılarındaki değişimler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Erkeklerde kadınlara oranlara daha sık rastlanan bu hastalık Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya başta olmak üzere tüm dünya genelinde yaygın olarak görülmektedir [41].

Multipl miyelom hastalığının klinik tablosunda, çoğunlukla kemik yapım-yıkım dengesinin bozukluğundan kaynaklanan kırıklar veya lezyonlar izlenmektedir. Hastalarda oluşan kemik kırıkları ve yoğun kemik ağrıları hastalığın ilerleyen evrelerinde veya tedavi süreci içerisinde hayat kalitelerini oldukça düşürmektedir. MM, kemiklerde tipik olarak litik lezyonlara, osteopeniye ve patolojik kırıklara yol açmakta beraber hastaların yaklaşık %75'inde kemik lezyonları saptanmaktadır. Bu lezyonlar en sık kafa kemikleri, vertebra, kaburga kemikleri, sternum, proksimal humerus ve femurda yer almaktadır [53], [54], [55].

Multipl miyelom tedavisi sırasında radyoterapi ve kemotepatik ajanların yanı sıra kemik lezyonlarının tedavisinde veya ilerlemesini önlemek amacıyla Pamidronat, Zoledronat ya da Klodronat gibi bisfosfonatlar kullanılmaktadır. Bisfosfonatlar osteoklastların doğrudan inhibisyonunu sağladığı gibi aynı zamanda apoptozu da uyarmaktadır. Bunun yanında, osteoklastogenezi engelleyerek osteoklast öncülerinin oluşumunu inhibe etmektedir [56], [57].

Multipl miyelom kemik hastalığında, MM plazma hücrelerinden salgılanan bazı faktörler osteoklastik aktivitenin artmasına neden olmaktadır. İlk kez Mundy ve ark. tarafından 1970'li yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda MM plazma hücrelerinin 'osteoklast aktive edici faktör' salgıladıkları ortaya koyulmuştur [58], [59]. Fakat, bu faktör/faktörlerin tanımı yapılamamış ve etki mekanizmaları yıllar boyunca tanımlanamamıştır. Gerçekleştirilen çalışmalar özellikle lenfotoksin, IL-1 ve TNF- α gibi bazı sitokinler üzerine yoğunlaşmıştır. Yıllar boyunca, gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda kullanılacak osteoblastik ve MM plazma hücre dizilerinin tanımlanması ve izolasyonları osteoblastogenetik defektlerin patogenezinin aydınlatılmasında fonksiyonel verilerin üretilmesini kısıtlamıştır [5]. Son yıllarda ise, MM plazma hücreleri aracılıklı osteoklast aktivasyonunda iki önemli yolak tanımlanmıştır. Bunlarda biri MM hücreleri tarafından salınan ve MM kemik iliğinde arttığı gözlenen RANKL (reseptör aktivatör nükleer kappa B ligand) [60], [61] diğeri ise hastaların serumunda kemik hastalığı sırasında artan MIP-1 α (makrofaj inflamatuvar protein-1)'dir [62]. Bunun yanı sıra gerçekleştirilen çalışmalarda osteoklastik kemik rezorpsiyonunu artıran diğere faktörlerin ise IL-3, IL-7, SDF1 ve HGF olduğu belirtilmiştir [6], [63].

MM'da artan osteoklastik aktivitenin engellenmesi için kullanılan bisfosfonatlar kemik lezyonlarının oluşumunu kısmi olarak durdursa da tedavi edememektedir [64]. Çünkü MM kemik hastalığında, kemik rezorpsiyonunun artmasının yanı sıra yeni kemik oluşumu da MM plazma hücrelerinden salınan bazı faktörler aracılığıyla baskılanmaktadır [5]. Ayrıca, kemik iliği MKH'lerin osteoblastlara farklılaşması süreci olan osteoblastogenez de çeşitli mekanizmalar tarafından engellenmektedir [22]. Corre ve ark.'nın [13] gerçekleştirdiği bir çalışmada MM-Kİ-MKH'leri myelom plazma hücre dizileri ile ortak kültüre edilerek gen ifadeleri, salgıladıkları sitokinler ve osteojenik farklılaşma kapasiteleri incelenmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda, MM-Kİ-MKH'lerinin osteojenik farklılaşma kapasitelerinin yetersizliğinin yanı sıra, MM plazma hücrelerini desteklediği ve sağkalımlarını arttırdığı belirlenmiştir [13]. Son yıllarda, MM-Kİ-MKH'lerinin bulunduğu mikroçevre temel alınarak gerçekleştirilen çalışmaların yanında *in vitro* olarak mikroçevrenin etkileri olmaksızın MKH'lerin karakterizasyonları ve farklılaşma kapasiteleri de incelenmektedir [65]. Bu tez çalışmasında, mikroçevrenin etkileri olmaksızın MM-Kİ-MKH'lerinin osteoblastik

farklılaşma kapasiteleri, osteojenik yollarda rol oynayan gen ifadeleri temel alınarak incelenmiştir.

Kİ-MKH'lerinin osteojenik potansiyelinin olduğu ilk kez Tavassdi ve Crosby [66] tarafından 1968 yılında yayınladıkları bir makalede bildirilmiştir. Tavassdi ve Crosby sıçan, tavşan ve köpeklerde gerçekleştirdikleri çalışmayla kemik iliğinde hematopoietik hücrelerin yanı sıra bulunan hematopoietik olmayan retiküler hücrelerin çoğalarak osteoblastlara farklılaştığını ve trabeküler kemiği oluşturduğunu rapor etmişlerdir [66]. Ancak bu çalışmada kemik iliğinde 'öncül/progenitör' bir hücre varlığından bahsedilmemiştir. Friedenstein [67] ve Owen [68] ise 1960'lı yıllarda gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucunda ilk defa kemik iliğinde küçük bir alt populasyon hücre kümesinin de kemik yapımından sorumlu olduğunu bildirmişler ve bu hücreleri 'osteojenik kök hücre' ya da 'kemik iliği stromal kök hücreleri' [68] olarak adlandırmışlardır. 1991 yılında ise Caplan yayınladığı bir makalede ilk defa 'mezenkimal kök hücre' terimini kullanmıştır [69]. MKH'lerin osteojenik potansiyellerinin olduğunun belirlenmesiyle, özellikle kemik iliği kaynaklı MKH'lerle gerçekleştirilen çalışmalarda embriyonik dönemden itibaren kemik oluşumunun mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır [17]. Günümüzde hala kemik oluşumunun moleküler mekanizmaları tam anlamıyla aydınlatılmış değildir. Ancak, Kİ-MKH'lerinin osteoblastlara farklılaştığının keşfedilmesiyle birlikte birçok genetik tabanlı veya sonradan gelişen kemik hastalıklarının patofizyolojisinin aydınlatılmasında önemli yollar katedilmiştir [70]. Günümüzde oluşum mekanizmaları halen aydınlatılamamış olan kemik hastalıklarından biri de multipl myelom hastalarında oluşan litik lezyonlar ve kırıklardır [10].

Multipl myelom hastalığı ilk kez 1850 yılında William Macintyre tarafından yayınlanan bir vaka raporu ile tanımlanmıştır [71]. Ancak plazma hücrelerinin öneminin anlaşılması 1900'lü yılları bulmuş ve 1903 yılında multipl myelom kemik hastalığı litik lezyonlarının röntgen ile belirlenebileceği Weber tarafından bildirildikten sonra ilk defa 1996 yılında bisfosfonatların MM'daki kemik problemlerini azalttığı rapor edilmiştir [72]. Shaughnessy ve Barlogie'nin [73] 2003 yılında gerçekleştirdiği çalışmada ise MM kemik hastalığının DKK-1 adlı proteinin salınımından kaynaklandığı bildirilmiştir. Özellikle 2000'li yılların başlarından itibaren multipl myelom kemik hastalığı çalışmaları osteoblastik farklılaşma defektlerinin aydınlatılması amacıyla gerçekleştirilmektedir [65]. Bu amaçla multipl myelom hastalarından elde edilen

osteoblastların ve öncülleri olan Kİ-MKH'lerin karakterizasyonları ve osteojenik farklılaşma kapasiteleri farklı açılardan araştırılmaktadır [7], [65].

Bu tez çalışmasında MM hastalarından elde edilen MKH'lerin karakterizasyonu sağlıklı olgularla karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen akım sitometrik analizler sonucunda sağlıklı ve MM kemik iliği MKH'leri CD34, CD45, CD14, CD15, CD117, CD11b, CD33 gibi belirteçlerini ifade etmezken; CD90, CD29, CD44 CD166, CD73, CD59, CD105 gibi belirteçleri ifade ettikleri belirlenmiştir. Geçmiş yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda MKH'lerin ifade ettikleri belirteçler kesin kriterlerle tanımlanamamış olsada, çalışmamızdaki bulguların literatürle uyumlu olduğu belirlenmiştir [65]. Ayrıca plazma hücre belirteçleri olan CD38 ve CD138 [74]. belirteçlerinin hem myelom hem de sağlıklı Kİ-MKH'lerde negatif olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu, elde edilen MKH kültürlerinde sağlıklı ve multipl myelom plazma hücrelerinin bulunmadığının bir göstergesidir [74].

S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerde gerçekleştirilen IF boyama sonuçları da akım sitometrik analizleri desteklemektedir. Her iki grubun da CD29, CD44, aktin, vimentin, fibronektin ve nestin gibi belirteçler için pozitif; HLA-DR ve CD34 belirteçleri ile negatif reaksiyon göstermeleri MKH immunfenotipi ile uyumludur [75].

Kİ-MKH'lerin *in vitro* koşullarda uygun kimyasal uyarımlarla osteojenik ve adipojenik olarak farklılaşma özelliklerinin olduğu bilinmektedir [76]. Gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında, kemik iliğinden izole edilen hücreler, MKH karakterizasyonu amacıyla *in vitro* koşullarda osteojenik ve adipojenik olarak farklılaştırılmıştır. Elde edilen S-Kİ-MKH'leri ve MM-Kİ-MKH'lerinin kimyasal uyarımlarla *in vitro* koşullarda adipojenik ve osteojenik olarak farklılaşabildikleri gözlenmiştir. Adipojenik farklılaşmada indüksiyonun 14. gününde Oil red O boyaması sonucunda, sitoplazmalarında yağ hücrelerindeki benzer şekilde damlacıklar oluştuğu tespit edilmiştir. Osteojenik indüksiyon sonrası oluşan mineralizasyonun gösterilmesi amacıyla Alizarin kırmızısı boyası kullanılmıştır. Alizarin kırmızısı boyamaları sonucunda gözlenen kalsifiye kemik nodülleri de kemikleşmenin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [77]. Bu durum, MM-Kİ-MKH'lerinin de sağlıklılarda olduğu gibi osteojenik ve adipojenik olarak farklılaşma özelliklerinin olduğunu göstermektedir [78].

Osteojenik farklılaşmada bir erken dönem belirteci olan ALP aktivitesi birçok çalışmada MKH'lerin osteojenik farklılaşmasının analizi amacıyla bir belirteç olarak kullanılmıştır [75], [79]. Aynı zamanda MM kemik hastalığı ile ilişki çalışmalarda MM-MKH'lerinin osteojenik farklılaşma potansiyellerinin değerlendirilmesinde ALP aktivite tayini sıklıkla kullanılmaktadır [42], [79], [80]. MM kaynaklı MKH ve osteoblast hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmaların bir kısmı osteojenik farklılaşma sonucunda ALP aktivitesinin değişmediğini belirtirken, bir kısmı ise MM hastalarında sağlıklı olgulara göre daha düşük olduğunu rapor etmektedir. Todoerti ve ark.'larının gerçekleştirdiği çalışmada, MM hastalarından elde edilen osteoblastların akım sitometrik analizleri sonucunda, ALP ifadelerinin sağlıklı osteoblastlardan bir farkı olmadığı rapor edilmiştir [7]. Bunu destekleyen diğer çalışmalarda ise, MM-Kİ-MKH'lerinin osteojenik indüksiyonunun 21. gününde gerçekleştirilen ALP aktivitesi sağlıklı olgularla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark göstermediği rapor edilmiştir [13], [14]. Buna karşılık, MM hücre dizilerinin kondüsyonlanmış besi yeri ile inkübasyonu sonucunda sağlıklı Kİ-MKH'lerde ALP aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir [80]. Bu çalışmaya benzer diğer bir çalışmada ise, sağlıklı Kİ-MKH'lerinin birçok farklı MM hücre serileri ile ortak kültüre edilmesi sonucunda ALP aktivitelerinin azaldığı rapor edilmiştir [42].

Çalışmamızda, S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerde osteojenik indüksiyonun 4., 7., 14. ve 21. günlerinde osteojenik farklılaşma potansiyellerinin karşılaştırılmalı olarak incelenmesi amacıyla ALP aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. MM-Kİ-MKH'lerde osteojenik indüksiyondan sonra ALP aktivite tayini gerçekleştirilen tüm günlerde, sağlıklı olgulara göre ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Bu azalma, indüksiyonun 4. ve 14. günlerinde anlamlı iken ($p < 0.05$), 7. ve 21. günlerinde ileri derecede anlamlı ($p < 0.01$) olarak belirlenmiştir. Bu bulgular Standal [80] ve Giuliani'nin [42] bulgularını destekler nitelikte olsa da, literatürde henüz MM-Kİ-MKH'lerinin osteojenik indüksiyonunun farklı günlerinde gerçekleştirilmiş ALP aktiviteleri veya gen ifadelerinin belirlendiği fonksiyonel çalışmalar bulunmamaktadır. Elde ettiğimiz bulgular MM-Kİ-MKH'lerinde *in vitro* olarak tümöral mikroçevrenin etkisi olmaksızın bile ALP aktivitesinin sağlıklılara göre düşük olduğunu göstermektedir. Tez çalışmasında gerçekleştirilen gen ifadesi analizleri sonucunda osteojenik indüksiyonun 30.gününde her iki grupta da *ALPL* gen ifadesi bakımından

anlamli bir farklılık olmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$). ALP aktivitesi osteoblastogenezin erken dönem belirteçlerinden biri olarak kabul edildiğinden [81] *in vitro* koşullarda her iki grupta da 30. günde *ALPL* gen ifadesinin olmaması bu bilgiyi desteklemektedir. Çalışmamızda osteogenezin erken dönem belirteçleri olan *COL1A1*, *ALP* ve *BGLAP* gibi genlerin ifadelerinin her iki grupta da değişmemesinin temel sebebinin, induksiyon öncesinde ve 30. gününde bu belirteçlerin analiz edilmesi olduğu düşünülmektedir [81].

Kemik gelişiminde, hücreler arası maddenin oluşumunda, osteoblastogenez ve mineralizasyonda kollajenler önemli roller oynamaktadırlar [82]. Birçok kollajen tipi ve osteoblastogenezdeki önemleri yıllardır *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiş ve genetik mutasyonlarında meydana gelen hastalıklar tanımlanmıştır [83].

COL3A1 iskelet gelişim sürecinde ve matür osteoblastlarda yüksek miktarlarda ifade edilmesinin yanında osteoblastogenez ve kemik gelişimindeki önemi henüz tam olarak bilinmemektedir. Volk ve ark.'nın [84] gerçekleştirdiği bir çalışmada *COL3A1* geninden yoksun farelerde *in vivo* kraniyofasiyel anomaliler ve kemik hacminde azalma olduğu rapor edilmiştir. Bununla beraber, *in vitro* olarak *COL3A1*'den yoksun MKH'lerde osteojenik induksiyon sonrasında sağlıklı grupla karşılaştırıldığında ALP aktivitesinde ve mineralizasyonda azalma olduğu gözlenmiştir. Bu bulgularda yola çıkarak Volk ve ark. *COL3A1*'in osteoblast farklılaşmasını etkileyerek trabeküler kemik gelişiminde rol oynadığını rapor etmişlerdir [84]. Gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise fare osteoprogenitör hücre dizilerinde osteojenik induksiyon sonrasında *COL3A1* ifadesinin arttığı belirlenmiştir [85]. Bu çalışmalar sonucunda *COL3A1*'in kemik gelişiminde önemli bir rolünün olduğu düşünülmesinin yanı sıra kemik gelişimindeki etki mekanizması hala bilinmezliğini korumaktadır. Literatürde MM kemik hastalığında *COL3A1*'in önemi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda osteojenik induksiyon sonrasında S-Kİ-MKH'lerde *COL3A1* gen ifadesi değişmezken, MM-Kİ-MKH'lerde 4,64 kat istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0.05$). Bu bulgulardan yola çıkılarak, MM kemik hastalığında mineralizasyonun azalmasında ve osteoblast farklılaşmasında *COL3A1* ifadesindeki bu azalışın önemli olabileceği düşünülmektedir.

Kemik oluşumu ve osteoblastogenezin mekanizmalarının aydınlatılması amacıyla günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalar büyüme faktörleri, sitokinler ve bazı

moleküllerin bu yollarda etkilerini ortaya koymaya yöneliktir [17]. Kemik oluşumunda etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamış moleküllerden biri de FGF-2'dir. FGF-2'nin osteoblastlar tarafından salgılanarak hücreler arası maddede depolandığı bilinmektedir [86]. Hücresel seviyede osteoblastlardan FGF-2'nin uzaklaştırılmasının proliferasyonlarını önemli derecede azalttığı gerçekleştirilen birçok çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca, *FGF-2* geni susturulmuş (*FGF^{-/-}* knockout) fare Kİ-MKH'lerinin hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak kemik oluşumu ve osteoblast farklılaşma kapasiteleri düşmektedir [87], [88], [89]. Ayrıca, araştırmacılar ekzojen FGF-2 uygulamasının *in vivo* ve *in vitro* farklılaşma kapasitesini kısmen yükseltebildiğini rapor etmişlerdir [88], [89]. Çalışmamızda gerçekleştirilen PZR Array analizi sonuçlarına göre ise S-Kİ-MKH'de *FGF-2* gen ifadesinin osteojenik induksiyon sonrasında 4.55 kat arttığı ancak MM-Kİ-MKH'de değişmediği tespit edilmiştir ($p>0.05$). Fei ve ark. gerçekleştirdiği bir çalışmada ise, FGF-2 etkisinin osteoblastogenezde rol oynayan Wnt/ β -Katenin sinyal yolağı üzerinden gerçekleştiği rapor edilmiştir [86]. Bunun yanı sıra kırık iyileşmesi aşamalarında FGF-2 ve BMP-2'nin sinerjistik etki gösterdikleri; FGF-2'nin iyileşmenin erken evrelerinde rol oynadığı, BMP-2'nin ise geç aşamalarda mineralizasyonun oluşumunda görev aldığı bildirilmiştir [90]. FGF-2'den yoksun fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, Runx2'nin çekirdekdeki birikiminin azalmasının yanında, BMP-2'nin indüklediği kemik oluşumu ve ALP aktivitesini kısmen engellendiği rapor edilmiştir [91].

Kemik oluşum sürecinde, FGF-2 aracılıklı osteoblastik farklılaşma yollarının başlatılması için FGF-2, hücre yüzeyinde bulunan FGFR1'e bağlanmaktadır. Bu aşamadan sonra FGF reseptörleri MAPK, PI3K, STAT1 ve PKC yollarının aktivasyonunun için gerekli olan birçok molekülün fosforillenmesine öncülük etmektedir [92]. FGFR1 erken gelişim aşamalarında *Runx2* ifadesinden bağımsız kemik oluşumunu promote etmekle beraber, matür osteoblastlarda bilinmeyen bir mekanizmayla mineralizasyonu inhibe etmektedir [92]. Gerçekleştirilen çalışmalar osteoblastik farklılaşmada önemli bir molekül olan FGFR1'in osteojenik farklılaşmayı tetikleyici etkisinin yanı sıra farklılaşmanın değişik aşamalarında inhibisyonda rol oynadığını göstermektedir. Jacob ve ark.'nın gerçekleştirdiği bir çalışmada *FGFR1* geni osteoblastik farklılaşmanın ve matürasyonun değişik evrelerinde olan hücrelerde susturularak osteoblastogenezdeki rolü araştırılmıştır. Sonuç olarak, *FGFR1* geninin

farklılaşmış osteoblastlarda olmaması bu hücrelerin proliferasyonunun artmasına sebep olurken, immatür osteoblastlarda veya progenitörlerde farklılaşmayı durdurmuştur [92]. Çalışmamızda S-Kİ-MKH'lerde *FGFR1* geninin ifadesi osteojenik indüksiyon sonrasında 3.02 kat artarken ($p>0.05$), MM-Kİ-MKH'lerde değişmemiştir ($p<0.05$). Bu bulgu, sağlıklı ve multipl myelom Kİ-MKH'lerinin *in vitro* farklılaşma ve matürasyonun değişik aşamalarında olabileceğini göstermektedir.

Elde ettiğimiz bulgular, *FGFR1* geninin osteoblastogenezin farklı evrelerinde gösterdiği bu zıt etkinin, bir osteoblastogenez inhibitörü olan TWIST içinde geçerli olabileceğini düşündürmektedir.

TWIST osteoblastogenezde önemli bir yolak olan Runx2'nin Runt DNA bağlayıcı bölgesine bağlanarak inhibisyonuna, dolayısıyla osteojenik farklılaşmanın durmasına sebep olmaktadır. Kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin TWIST genini yüksek miktarlarda ifade ettiği ve yayılımları sırasında bu ifadesinin giderek azaldığı gösterilmiştir [93]. TWIST ifadesi MKH'lerin kendini yenilemesi ve farklılaşmasının önlenmesi için gereklidir. Aynı zamanda osteoblastik seri hücrelerin farklılaşmasının kontrolünde Runx2 ile birlikte çalışarak farklılaşma sonrasında Runx2'nin aktivitesini durdurmaktadır. Bu durum TWIST'in osteoblastogenezde denge mekanizmalarında rol oynadığının açık bir kanıtıdır [94].

Çalışmamızda, osteojenik indüksiyon öncesinde ve indüksiyondan sonraki 30.günde S-Kİ-MKH'lerde ve MM-Kİ-MKH'lerinde gen ifade profilleri karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Osteojenik farklılaşmanın *in vitro* koşullarda belirlenebilmesi için osteoblastogenezin erken dönem belirteci olan ALP aktivitesi tayini gerçekleştirilmiştir. ALP aktivitesi farklılaşmanın erken dönemlerinde artış gösterirken 7.günden itibaren giderek düşüş göstermesi osteojenik farklılaşmanın geç evrelerine geldiğinin bir göstergesidir. Ayrıca Alizarin Red S boyamasında gözlenen kalsifiye kemik nodülleri osteogenezde son evre olan mineralizasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Buna ek olarak S-Kİ-MKH'lerde ve MM-Kİ-MKH'lerde indüksiyon öncesi ve farklılaşmanın 30.günü *ALPL* gen ifadesi karşılaştırıldığında iki grupta da anlamlı bir değişiklik belirlenmemiştir ($p>0.05$). Ayrıca, S-Kİ-MKH'lerde TWIST gen ifadesi 30.günde anlamlı olarak 9.49 kat artmıştır ($p<0.05$). *ALPL* gen ifadesinin değişmemesi ve mineralizasyonun gerçekleşmesi 30. günde kültürün osteojenik farklılaşmanın ileri

evrelerinde olduğunun bir göstergesidir. Dolayısıyla *TWIST* gen ifadesindeki artışın sebebi olarak, osteojenik indüksiyon devam etse bile osteogenez inhibisyon mekanizmalarının devreye girdiği düşünülmektedir.

Tezde elde edilen bu bulgular, osteogenezde rol oynayan *ALPL* ve *TWIST* gibi genlerin *in vitro* olarak karşılaştırılması için daha erken dönemlerde analiz edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Osteoblastogenezde ve mineralizasyonda rol oynayan genlerin birçoğu sürecin farklı evrelerinde hem inhibisyon hem de indüksiyon görevi yapmaktadır. Buna ek olarak, bu genlerin bir kısmı osteoblastogenezi düzenlerken aynı zamanda da osteoklastogenezi desteklemektedir. Bu durumun kemik yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin sağlanmasında önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir [19]. Bu denge mekanizmasında rol oynayan genlerden biri de osteogenezde fonksiyonu tam olarak aydınlatılmamış olan *VDR*'dir. *VDR* kemik gelişiminde mineralizasyonda görev alırken aynı zamanda kalsiyumun ince barsaklardan emilimi ve böbreklerden geri emiliminde rol oynamaktadır. Kemirgenler üzerinde gerçekleştirilen birçok çalışma *VDR*'nin kemik gelişimi aşamasında doğrudan etkisinin olduğunu gösterse de, bu etki diğer çalışmalarda desteklenmemektedir. *VDR*'yi fazla ifade eden transgenik farelerde trabeküler kemik hacminin ve dayanıklılığının artmış olması *VDR*'nin indükleyici etkilerini göstermektedir [95]. Buna karşılık *VDR* yoksun farelerde trabeküler yoğunlukta, osteoid hacminde ve osteoblast sayısındaki artış, *VDR*'nin trabeküler gelişimde negatif etkileri olduğunu göstermektedir [96]. Osteoblastlara- özgü *VDR* yoksun farelerde ise gelişimin bazı aşamalarında kemik kütlesinin arttığı rapor edilmiştir [97]. Osteoblastlara-özgü *VDR*'nin fazla ifadesinde ve yokluğunda kemik kütlesinde artış olduğunun ayrı çalışmalarda rapor edilmesi *VDR*'nin osteogenezdeki rolünün hala tam olarak aydınlatılmadığının bir kanıtı olmuştur [95].

VDR'nin osteoblast proliferasyonuna olan etkileri sıçanlarda ve insanlarda birçok kez çalışılmasının yanı sıra halen tartışma konusudur. Bazı çalışmalar osteoblast proliferasyonunu inhibe ettiği [98], [99]. yönünde olsa da bir kısım çalışma stimüle ettiği yönündedir [100]. Gerçekleştirilen diğer çalışmalarda fare ve insan osteoblast hücre dizlerinde *VDR*'nin *in vitro* canlılığı azalttığı ve osteoblast apoptozunu indüklediği rapor edilmiştir [101], [102]. Bu çalışmaların bir sonucu olarak

araştırmacılar VDR'nin bu zıt etkilerinin osteoblastların orijinine, VDR'nin uygulama dozuna ve zamanlamasına göre değiştiğini bildirmiştir [95].

İnsan MKH'leri ve osteoblastlarıyla gerçekleştirilen çalışmalara göre VDR, mineralizasyon öncesinde ifade edilerek mineralizasyonu arttırıcı özellikler göstermektedir [103], [104], [105]. Bu bulgulara göre VDR mineral depozisyonuna direkt olarak katılmasa da mineralizasyon için gerekli hücreler arası maddenin hazırlanmasında görev almaktadır [95]. Ayrıca gerçekleştirilen alışmalar VDR'nin hücreler arası maddede bulunan ALP veziküllerinin üretimini arttırdığı göstermektedir [106].

İnsan MKH'lerinin *in vitro* osteojenik indüksiyonu sonrasında VDR'nin ALP aktivitesini ve osteokalsin ifadesini stimüle etmesinin pasaj sayısı ve donör yaşı ile negatif bir korelasyon içinde olduğu bildirilmiştir [107]. Bunun yanı sıra VDR'nin osteoblastlar üzerindeki bu etkilerinin, farklılaşma evrelerine ve gen ifadesi değişimlerine bağlı olarak farklılık gösterdiği rapor edilmiştir [108].

VDR'nin kemik oluşumunu düzenlemesinin yanı sıra RANKL ve osteoprotegerin gibi osteoklast oluşumunu düzenleyen genlerin ifadesindeki rolü kemik yıkımında da doğrudan olmayan bir görevi olduğunun göstergesidir [95], [109].

MM kemik hastalığı ve VDR gen ifadesi üzerine gerçekleştirilen çalışmalar literatürde oldukça sınırlıdır. VDR'nin *in vivo* kemik gelişimi üzerindeki etkilerinin tam olarak aydınlatılamaması MM ve VDR ilişkili çalışmaları da kısıtlamaktadır. Ancak, bazı çalışmalarda birçok kanser türünde rastlanan VDR gen polimorfiziminin MM hastalarında da grldğu rapor edilmiştir [110]. Bunun yanı sıra bir proteozom inhibitörü olan ve MM hastalığı tedavisinde kullanılan Bortezomib'in, MM hastalarından elde edilen kemik iliği MKH'lerinin *in vitro* osteojenik farklılaşma kapasitesini D vitamini ile kullanıldığında oldukça arttırdığı gösterilmiştir. Aynı zamanda, Bortezomib'in *in vitro* uygulamalarının MKH'lerde VDR protein seviyelerini de arttırdığı belirlenmiştir [111].

Çalışmamızda gerçekleştirilen gen ifade analizleri sonucunda, MM-Kİ-MKH'lerinde VDR geni ifadesi indüksiyondan sonraki 30. günde 3,94 kat artarken ($p < 0.05$), S-Kİ-MKH'lerde değişmemiştir. Literatürde MM kemik hastalığı ile VDR gen ifadesi

arasındaki ilişki, çalışmaların sınırlı olması nedeniyle günümüzde hala belirsizliğini korumaktadır. Bunun yanı sıra *VDR* geni ile normal osteoblastogenez ve/veya osteoklastogenez arasındaki ilişki bile tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu tez çalışmasında, MM-Kİ-MKH'lerde *VDR* gen ifadesinin osteojenik indüksiyondan sonraki bu artışının MM kemik hastalığı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. *VDR* geninin kemik oluşumundaki indükleyici etkisinin yanında inhibe edici etkisinin de olduğu ve literatürde sonuçların birçoğunun birbiriyle çeliştiği düşünüldüğünde MM kemik hastalığında çalışılmadan önce *in vivo* mekanizmalarının tam olarak anlaşılması gerektiği düşünülmektedir.

Kemik oluşumunun önemli yollarından biri olan BMP sinyal yolağı, hücre yüzeyinde BMP'lerin tip I ve tip II serin treonin kinaz reseptörlerine bağlanması ile başlar. Tip II reseptöre BMP'ler bağlandıklarında tip I reseptör fosforillenerek hücre içi sinyal moleküllerini aktive ederek sinyalleşme yolağını başlatır. Tüm BMP'ler aynı tip II reseptörünü kullanırlar, fakat tip I reseptörleri farklılık göstermektedir [112], [113]. BMP-2, BMP4 ve BMP7 proteinleri BMPR1B reseptörüne bağlanmaktadır. TGF- β 1 ve FGF-2 yollarının aktivasyonu aracılığıyla primer kemik hücrelerinde *in vitro* BMPR1B reseptöründeki artış osteojenik kapasitenin de artmasını sağlamaktadır [114]. Gerçekleştirdiğimiz gen ifade analiz çalışmaları sonucunda, *BMPR1B* gen ifadesinin S-Kİ-MKH'lerde osteojenik indüksiyon sonrasında 5,72 kat arttığı fakat MM-Kİ-MKH'lerde değişmediği belirlenmiştir ($p>0.05$). Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

BMP-2 ve BMP-7 osteojenik süreçte rol oynayan önemli moleküllerdir. Gerçekleştirilen klinik denemeler sonucunda BMP-2 ve BMP-7'nin kırık iyileşmesinde etkili olduğunun gösterilmesinin ardından, FDA bu proteinlerin kemik defektlerinin iyileştirilmesinde kullanımlarını onaylamıştır [115]. Osteoblastik farklılaşmada *in vitro* C2C12 hücre dizilerinde ve insan Kİ-MKH'lerde BMP-7 indüksiyonu ALP aktivitesinin ve kalsiyum mineralizasyonunu artmasıyla sonuçlanmıştır [116], [117]. *In vivo* genetik çalışmalarda ise BMP-7 üretiminin yerel olarak azlığının postnatal ekstremite büyümesine ve kemik kütlelerine etkisi olmadığı ve diğer BMP'lerin BMP-7 eksikliğini kompanse ettiği belirlenmiştir [118]. *In vitro* Kİ-MKH üç boyutlu kültür sistemlerinde ise BMP-7'nin osteojenik ve kondrojenik farklılaşma yerine hücreleri adipojenik olarak farklılaşmaya götürdüğü gösterilmiştir [119]. Çalışmamızda S-Kİ-MKH'lerde *BMP-7* gen ifadesi

osteojenik indüksiyon sonrasında değişmemişken MM-Kİ-MKH'lerde 8,46 kat artmıştır ($p>0.05$). Bunun yanında osteojenik indüksiyon öncesinde sağlıklı ve MM-MKH'ler karşılaştırıldığında *BMP-7* ifadesi sağlıklılarda 17,15 kat daha fazla ($p>0.05$) olduğu dikkat çekmektedir. Ayrıca osteojenik indüksiyon sonrası gen ifadeleri 30.günde sağlıklı ve MM-MKH'ler karşılaştırıldığında *BMP-7* ifadesi sağlıklılarda 3,45 kat daha fazladır ($p>0.05$).

MKH'lerden *BMP-2* ve *BMP-4* delesyonu, geç embriyogenez aşamasında kemik oluşum defektlerine sebep olmaktadır. Buna karşılık sadece *BMP-2* delesyonu sonucunda ağır defektler oluşmaması diğer BMP'lerin ve özellikle *BMP-4*'ün bu etkiyi kapattığının bir göstergesi olarak düşünülmüştür. Bunun yanında *BMP-2*'den yoksun farelerde kırık iyileşmesinin olmadığı dikkat çekmektedir [120], [121]. MKH'lerdeki *BMP-7* yoksunluğundan kemik kütlesini etkilememesinin sebebi *BMP-4*'ün yine aynı şekilde bu etkiyi kapatmasıdır [118]. Embriyonik dönemde *BMP-4*'ün osteoblastlarda normalden fazla ifade edilmesi osteoklastların artmasına sebep olduğundan kemik kütlesini azaltmaktadır. Aynı zamanda bir BMP inhibitörü olan *Noggin*'in normalden fazla ifade edilmesi embriyonik dönemde osteoklastogenezi sekteye uğratarak kemik kütlesinin dolaylı olarak artmasına sebep olabilmektedir. Bu bilgiler BMP'lerin kemik yapımını arttırdığına yönelik bulguların yanı sıra aynı zamanda kemik yapım ve yıkım dengesini de düzenlediğinin bir göstergesi olmuştur [122]. Çalışmamızda, MM-Kİ-MKH kültüründe osteojenik indüksiyon sonrasında *BMP-4* gen ifadesi 3,36 kat istatistiksel olarak anlamlı olarak artmış ($p<0.05$) ve bu ifade S-Kİ-MKH'lerde değişmemiştir. *BMP-2* gen ifadesi ise hem S-Kİ-MKH (12,73 kat) hem de MM-Kİ-MKH'lerde (11,99 kat) artış göstermektedir ($p>0.05$). *BMP-2*'nin her iki gruptaki yaklaşık olarak eşit miktarlarda ifade edilmesi *BMP-2* aracılıklı kemik yapımının normal olduğunu, ancak MM grubunda *BMP-4*'ün ifadesindeki artışın *in vivo* kemik yapımında inhibisyon mekanizması olarak iş görebileceğini düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen çalışmalar, multipl miyelom kemik hastalığında osteoblastogenez ve kemik yapımının yetersiz olmasının yanı sıra osteoklast oluşumunun ve aktivitesinin artmasının oluşan litik lezyonların önemli bir sebebi olduğunu göstermektedir [2]. Ancak, osteoklastogenez ve artan osteoklast aktivitesinin hangi mekanizmalara bağlı olduğu tam olarak aydınlatılamamıştır. Gerçekleştirilen çalışmalar miyelom plazma hücreleri tarafından salınan birçok molekülün ve özellikle bazı sitokinlerin osteoklastik

aktiviteyi attırdığını kanıtlamaktadır [2]. Buna ek olarak, kemik iliği mikroçevresinde bulunan MKH'lerin ve osteoblastların osteoklastogenezini arttırdığı bildirilmiştir [123]. Kemik iliği mikroçevresinde bulunan MKH'ler osteoklastları da içeren hematopoetik orijinli hücrelerle yakın ilişki içindedir. MKH'ler, hematopoetik hücrelerin kendini yenilemesi, farklılaşması, kemik iliğine yerleşmesi, adezyonu veya gerektiğinde mobilizasyonu ve migrasyonu için gerekli sinyalleri bazı faktörler salgılayarak sağlamaktadırlar. Bu faktörlerin salgılanması sonucunda hematopoetik hücrelerde reseptör-ligand ilişkileri ile hücre-hücre ilişkileri düzenlendiğinden MKH'ler de hematopoezde kritik bir öneme sahiptirler [124]. Ayrıca, osteoklastların farklılaşması ve aktivasyonunda osteoblastların da kritik roller oynadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [125]. Kemik iliğinde osteoklastlar myeloid progenitörlerden köken alarak RANKL ve M-CSF (CSF-1) etkisiyle NFATc1 yolağının aktifleşmesi sonucunda farklılaşmış matür osteoklastları oluşturmaktadırlar [126]. CSF-1 kondrosit ve endotel hücreleri gibi birçok hücre tarafından salınmasına rağmen esas olarak osteoblastlar tarafından üretilmektedir. CSF-1 osteoblastlar tarafından salgılanarak osteoklast progenitörlerinin proliferasyonu, hayatta kalımı ve farklılaşmasının indüklemektedir [127]. Yoshida ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *M-CSF* geninde yaptıkları bir mutasyonun farelerde osteoklast oluşumunu engellediği bildirilmiştir [128]. Çalışmamızda S-Kİ-MKH'lerde osteojenik indüksiyon sonrasında *CSF-1* gen ifadesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, MM-Kİ-MKH'lerde osteojenik indüksiyon sonrasında bu gen ifadesinin 10.73 kat arttığı ($p < 0.05$) tespit edilmiştir. Günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalarda MM-MKH'lerinde osteojenik indüksiyon sonrasında *CSF-1* geninin mRNA seviyesindeki ifadesine yönelik bir bulgu bulunmamaktadır. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada MM-MKH'lerde *CSF-1* gen ifadesindeki bu anlamlı değişiklik miyelom kemik hastalığının moleküler patogenezinin aydınlatılmasında yeni bakış açıları kazandırabilir. Bu bulgulardan yola çıkılarak, miyelom plazma hücrelerinin salgıladıkları birçok faktörün yanı sıra, kemik iliği mikroçevresinde bulunan osteoblastların da osteoklast oluşumu ve aktivitesini arttırabileceği düşünülmektedir.

Multipl miyelomda osteoklastların aktivitesinin artışına bağlı olarak artan kemik yıkımının yanı sıra kemik iliği mikroçevresinde bulunan stromal hücreler MM plazma hücreleri ile doğrudan temas yoluyla veya bazı sitokinleri salgılayarak tümör

hücrelerinin sağkalımını ve proliferasyonunu tetiklediği bilinmektedir [129]. MM plazma hücrelerinin artışıyla doğru orantılı olarak salgıladıkları sitokin miktarlarının artmasına bağlı olarak osteoblastogenez azalmakta ve osteoklast aktivitesi artmaktadır. MM plazma hücrelerinin birbirleriyle, hücreler arası madde ile veya stromal hücreler ile olan etkileşimleri ve direkt temasında adezyon molekülleri görev almaktadır. Bu adezyon moleküllerinden ICAM-1 hücre-hücre adezyonunda LFA-1'in ligandı olarak iş görmektedir [130]. Tanaka ve ark. gerçekleştirdiği bir çalışmada bir MM plazma hücre serisi olan MCC-2 ile ortak kültüre edilen osteoblastlarda, hücre-hücre temasında önemli rol oynayan *ICAM-1*'in ifadesinin arttığı belirlenmiştir [131]. ICAM-1'in de içinde olduğu birçok adezyon molekülünün aynı zamanda kronik sitokin salınımının bir etkisi olarak artrit hastalarının osteoblastlarında da arttığı gözlenmiştir [132].

Silvestris ve ark. gerçekleştirdiği bir çalışmada ise, MM plazma hücre serileri ile kemik lezyonları bulunan ve bulunmayan MM hastalarından elde edilen osteoblastların ortak kültürü sonucunda, osteoblastlarda ICAM-1 molekülünün arttığı rapor edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, MM hücre serileri ile ortak kültür sonucunda hem kemik hasarı olmayan MM hastalarının hem de sağlıklı vericilerin osteoblastlarında *ICAM-1* geninin ifadesindeki anlamlı artışlar osteoblastlar ve malign plazma hücrelerinin arasındaki etkileşimin bu molekül tarafından tetiklendiği edildiğini göstermiştir [133].

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre, S-Kİ-MKH'lerde *ICAM-1* gen ifadesi osteojenik indüksiyon sonrasında değişiklik göstermezken, MM-Kİ-MKH'lerde 7,11 kat artmıştır ($p < 0.05$). MM kemik hastalığı ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalarda ICAM-1 molekülü MM plazma hücrelerinin salgıladıkları sitokinlerin bir etkisi olarak osteoblastlarda artmaktadır [133]. Çalışmamızda elde edilen veriler bu bilgileri desteklemekle birlikte, MM plazma hücrelerinin MKH'lerle hücre-hücre teması veya salgıladıkları çözünebilir moleküller olmadan bile MM-Kİ-MKH'lerinde osteojenik indüksiyon sonrasında *ICAM-1* geninin yüksek miktarlarda ifade edildiğini göstermektedir. Bu veriler MM hastalarından elde edilen MKH'lerin osteoblastik farklılaşma sonrasında malign mikroçevre etkisi olmaksızın da *ICAM-1* genini ifade ettiklerini ortaya koymaktadır. Ayrıca gerçekleştirdiğimiz akım sitometrik analizlerde, osteojenik indüksiyon öncesinde ICAM-1 (CD54) molekülünün ifadesinin MM-Kİ-MKH'de Olgu 1 (%20.49) ve Olgu 2 (%6.88)'de olduğu gözlenmiştir. Ancak, MM-Kİ-MKH'lerde Olgu 3'de ve S-Kİ-MKH'lerde tüm olgularda ICAM-1 ifadesi

gözlenmemiştir. Bu bulgu ICAM-1'in S-Kİ-MKH'lerde ifade edilmediğini ancak, MM-Kİ-MKH'lerinde ifadesinin değişiklik gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

İmmunoglobulin süper ailesi hücre adezyon molekülleri, selektinler ve sindekanların yanı sıra integrinler de hücre-hücre ve hücre-ara madde etkileşimlerini sağlayan transmembran proteinlerdir [134]. İntegrinlerin ligandları arasında kemiğin hücreler arası maddesinde de bulunan kollajen, fibronektin, vitronektin ve laminin bulunmaktadır. İntegrin β -1 (ITGB1) doğrudan hücre-ara madde teması ve hücre-hücre bağlanmasında görev alan bir yüzey adezyon molekülüdür ve osteoprogenitör hücrelerin büyüme ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır [135], [136]. ITGB1'nin osteoblastların farklılaşmasında ve fonksiyonlarında rolü olduğu *in vitro* ve *in vivo* birçok çalışmada gösterilmiştir [137], [138].

ITGB1, osteojenik farklılaşmanın erken evrelerini Wnt-1 ve BMP-4 ifadeleri üzerinden düzenleyerek kontrol etmektedir [139]. Brunner ve ark.'nın gerçekleştirdiği *in vivo* bir çalışmada, ITGB1'in hücre içi bağlanma bölgesi olan ICAP-1 ile bağlanmasının kemik mineral metabolizmasında önemli bir rolü olduğu rapor edilmiştir [140]. Sununliganon ve Singhatanadgit'in [141] gerçekleştirdiği bir çalışmada periodontal ligament MKH'lerinin farklı klonlarının osteojenik farklılaşma potansiyelleri, ITGB1 gen ifadesinin miktarına göre karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda araştırmacılar, ITGB1 ifadesinin osteojenik farklılaşma kapasitesi yüksek olan MKH'ler için bir belirteç olarak kullanılabilineceği rapor etmişlerdir [141].

Çalışmamızda, S-Kİ-MKH ve MM-Kİ-MKH'lerinin akım sitometrik analizlerde ve immünfloresan boyamada CD29 (ITGB1) her iki grupta da pozitif olarak gözlenmesi literatürle uyum göstermektedir [142]. Ancak S-Kİ-MKH'lerde *ITGB1* gen ifadesi osteojenik indüksiyon sonrasında değişmezken, MM-Kİ-MKH'lerde 4.57 kat azalmıştır ($p<0.01$).

MM plazma hücrelerinin ve stromal hücrelerin, hücre-hücre ve ara madde ile etkileşimleri ITGB1 aracılığıyla olmaktadır [143], [144]. MM'da hem stromal hem de MM plazma hücrelerinde ITGB1'in fazla miktarda ifade edilmektedir. Bu durum tümör büyümesini ve hayatta kalımını desteklediğinden dolayı, araştırmacılar ITGB1'i dolaylı olarak bloklayarak tümör-stroma etkileşimlerini azaltmayı hedeflemişlerdir [143]. Bu

bulguların yola çıkılarak, ITGB1'nin osteojenik yollarda rol oynamasına rağmen çalışmamızda elde ettiğimiz bulguların *in vivo* ortamı yansıtmadığını düşünmekteyiz.

Kemik oluşum sürecinde önemli bir transkripsiyon faktörü olan Runx2, hipertrofik kondrositlerin etrafını saran perikondreal alanda yüksek miktarlarda bulunmaktadır. *SP7* (*Osterix-OSX*) ifadesinin oldukça yüksek olduğu bu bölgedeki hücreler, kıkırdak hücrelerine dönüşürler. Buna karşın preosteoblastları oluşacağı perikonreal alanlarda *SP7* ifadesinin fazla olması bu molekülün osteoblastogenezde büyük rol oynadığının bir göstergesidir [34].

SP7 preosteoblastlarda ve osteo-progenitör hücrelerde yüksek miktarlarda ifade edilmesinin yanında kemik iliği stromal hücrelerinde de ifade edildiği Liu ve ark.'nın [145] gerçekleştirdiği bir çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada embriyonik gelişimin başlangıcından itibaren osteoblastogenezde rol oynayan hücrelerin göçlerinin ve farklılaşmalarının izlenebilmesi amacıyla kilit molekül olarak *SP7* belirlenmiştir. Embriyonik hücrelerde *SP7* işaretlenerek farelerde farklı dönemlerde işaretli hücrelerin lokasyonları belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, *SP7*'nin sadece osteoblastik progenitör hücrelerde değil multipotent kemik iliği MKH'lerinde de ifade edildiği gösterilmiştir [145].

Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda hepatosit büyüme faktörünün (HGF) MM hastalarında serumda yüksek oranlarda olduğu ve bunun da kemik-özgü ALP oranıyla negatif bir korelasyon içerisinde olduğu bildirilmiştir. Vacca ve ark. [146] gerçekleştirdiği bir çalışmada ise HGF'nin MM'da osteoblastogenezde Runx2 ve *SP7*'yi inhibe ettiği rapor edilmiştir [146]. Ancak MM kemik hastalığının hedef hücreleri olan Kİ-MKH'lerinin *SP7* gen ifadeleri ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlı olmasının yanı sıra tedavi edici bir ajan veya mikroçevrenin etkisi olmaksızın gerçekleştirilmiş bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda, *SP7* gen ifadesinin, osteojenik indüksiyon öncesinde S-Kİ-MKH'lerde HPRT referans genine oranlandığında 5.7 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık S-Kİ-MKH'leri ile karşılaştırıldığında MM-Kİ-MKH'lerde *SP7* gen ifadesi 6,12 kat azalmıştır ve bu değer istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Sağlıklı kemik iliği MKH'lerinde *SP7* geninin ifadesi fakat MM-Kİ-MKH'lerinde bu ifadesinin az oluşu, MM plazma hücrelerinin direkt inhibisyonunun olmadığı *in vitro* koşullarda bile

MKH'lerin osteoblastogenez defektleri gösterebileceğinin bir göstergesi olarak düşünülmektedir.

Günümüzde MM kemik hastalığının kısmen tedavisi amacıyla bisfosfanatlar kullanılmaktadır. Bisfosfonatlar osteoklastların doğrudan inhibisyonunu sağladığı gibi aynı zamanda apoptozisi de uyarmaktadır. Bunun yanında osteoklast öncüllerinin oluşumunu engelleyerek osteoklastogenezini inhibe etmektedir [56], [57].

Plotkin ve ark. gerçekleştirdikleri çalışmalarda bisfosfanatların *in vitro* anti-apoptotik etkilerinin, osteoblast ve osteositlerdeki Konneksin-43 (CX43) kanallarının açılmasının ardından Src ve hücreler arası sinyal düzenleyici kinazların aktivasyonu ile başladığı rapor edilmiştir [147], [148]. Aynı araştırmacıların daha sonraki *in vivo* çalışmalarında ise fare matür osteoblast ve osteositlerinde CX43 geninin delesyonu sonucunda bisfosfanatların anti-apoptotik etkilerine hücrelerin cevap vermedikleri bildirilmiştir [149].

Watkins ve ark.'nın 2011 yılında yayınladıkları bir çalışmada ise erken osteoblastik hücrelerde CX43 delesyonu osteoblastik gen ifadelerinin azalmasına ve farelerde düşük kemik kütesinin oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir [150].

Zhang ve ark. 2013 yılında gerçekleştirdikleri bir çalışmada ise MKH'ler ile MM plazma hücre dizilerinin *in vitro* ortak kültürü sonucunda CX43 ifadesinin MKH'lerde protein seviyesinde arttığı bildirilmiştir [151]. Ayrıca 2014 yılında yayınladığı bir çalışmada ise MKH'lerde CX43 ifadesinin artması sonucunda MM plazma hücrelerinin adezyonu ve göçünün sağlanmasında MKH'lerin de önemli roller oynadığını rapor etmiştir.

Çalışmamızda IF boyamalar sonucunda, S-Kİ-MKH'lerde CX43 ifadesinin pozitif olduğu gözlenirken, MM-Kİ-MKH'lerde negatif olduğu dikkat çekmektedir. Bu durumun, Zhang ve ark.'ın [145] gerçekleştirdikleri çalışmanın bulgularıyla uyumlu olmadığı gözlenmiştir. Ancak literatürde MM-Kİ-MKH'lerin CX43 ifadesi ile ilgili kemik iliği mikroçevresinin etkisi olmaksızın *in vitro* gerçekleştirilmiş bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızdaki bulgular, mikroçevre etkisi olmaksızın MM-MKH'lerinin CX43 protein seviyelerinin sağlıklılarla karşılaştırıldığında düşük olmasının mikroçevrenin MKH'ler üzerine bir etkisi olduğunu akla getirmektedir. MM kemik hastalığının tedavisinde kullanılan bisfosfanatların anti-apoptotik etkilerinin

Con43 molekülünün seviyesiyle doğru orantılı olduğu ve MKH'lerde *in vivo* CX43'ün artmasının MM plazma hücrelerini desteklediği düşünüldüğünde, CX43'ün MM kemik hastalığındaki öneminin ayrıntılı olarak incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, MM kemik hastalığının patogenezi günümüzde hala bilinmezliğini korumaktadır. Normal kemik oluşumunda rol oynayan genler ve mekanizmalarının tam olarak aydınlatılması kemik hastalıklarının gelişiminin ve tedavisinin anlaşılmasında oldukça önemlidir. Bu amaçla gerçekleştirilecek olan *in vitro* çalışmalar kemik hastalıklarının gelişimi sırasında bozuk olan mekanizmaların ve tedavide hedef alınacak genlerin belirlenmesi sağlayacaktır.

MM plazma hücrelerinin ve tümör mikroçevresinin etkisi ile osteoblastik farklılaşmanın engellenmesi ve osteoklast aktivasyonunun mekanizmalarının bir kısmı aydınlatılabilmektedir. Bu hastalığın oluşumunda etkili olan genlerin ve proteinlerin mekanizmalarının tanımlanması tedavi yaklaşımları için kaçınılmazdır. Aynı zamanda MM kemik hastalığında kemik yapımından sorumlu olan osteoblastların mikroçevrenin etkisi olmaksızın *in vitro* koşullardaki davranışlarının belirlenmesi ileride gerçekleşmesi olası kök hücre tedavileri veya rejeneratif tıp yaklaşımları için önemlidir. Aynı zamanda kemik iliği mikroçevresinin önemli bir kısmını oluşturan MM-Kİ-MKH'lerinin *in vitro* karakterizasyonları tümör sağkalımı ve yayılımında da önemli bulgular elde edilmesine öncü olacaktır.

Bu çalışma, osteojenik indüksiyon öncesinde ve sonrasında gerçekleştirilen gen ifade analizleri sonucunda MM-Kİ-MKH'lerinin karakterizasyonu, osteojenik farklılaşma yollarındaki olası gen ifadelerinin tanımlanması ve ileride hedeflenmesi gereken genlerin belirlenmesinde öncü bir çalışma olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Castelli, R. Gualtierotti, R. Orofino, N. Losurdo, A. Gandolfi, S. ve Cugno, M., (2013). "Current and Emerging Treatment Options for Patients with Relapsed Myeloma", *Clin Med Insights Oncol*, 7: 209-219.
- [2] Oranger, A. Carbone, C. Izzo, M. ve Grano, M., (2013). "Cellular mechanisms of multiple myeloma bone disease", *Clin Dev Immunol*, 2013: 289458.
- [3] Shain, K.H. Yarde, D.N. Meads, M.B. Huang, M. Jove, R. Hazlehurst, L.A. ve Dalton, W.S., (2009). "Beta1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation", *Cancer Res*, 69: 1009-1015.
- [4] Fakhry, M. Hamade, E. Badran, B. Buchet, R. ve Magne, D., (2013). "Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts", *World J Stem Cells*, 5: 136-148.
- [5] Fowler, J.A. Edwards, C.M. ve Croucher, P.I., "Tumor-host cell interactions in the bone disease of myeloma", *Bone*, 48: 121-128.
- [6] Roodman, G.D., "Osteoblast function in myeloma", *Bone*, 48: 135-140.
- [7] Todoerti, K. Lisignoli, G. Storti, P. Agnelli, L. Novara, F. Manferdini, C. Codeluppi, K. Colla, S. Crugnola, M. Abeltino, M. Bolzoni, M. Sgobba, V. Facchini, A. Lambertenghi-Deliliers, G. Zuffardi, O. Rizzoli, V. Neri, A. ve Giuliani, N., (2010). "Distinct transcriptional profiles characterize bone microenvironment mesenchymal cells rather than osteoblasts in relationship with multiple myeloma bone disease", *Experimental Hematology*, 38: 141-153.
- [8] Tian, E. Zhan, F. Walker, R. Rasmussen, E. Ma, Y. Barlogie, B. ve Shaughnessy, J.D., Jr., (2003). "The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma", *N Engl J Med*, 349: 2483-2494.
- [9] Abe, M. Hiura, K. Wilde, J. Shioyasono, A. Moriyama, K. Hashimoto, T. Kido, S. Oshima, T. Shibata, H. Ozaki, S. Inoue, D. ve Matsumoto, T., (2004). "Osteoclasts enhance myeloma cell growth and survival via cell-cell contact: a vicious cycle between bone destruction and myeloma expansion", *Blood*, 104: 2484-2491.

- [10] Giuliani, N. Mangoni, M. ve Rizzoli, V., (2009). "Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in multiple myeloma: identification of potential therapeutic targets", *Exp Hematol*, 37: 879-886.
- [11] Tosi, P., (2013). "Diagnosis and Treatment of Bone Disease in Multiple Myeloma: Spotlight on Spinal Involvement", *Scientifica (Cairo)*, 2013: 104546.
- [12] Jurczyszyn, A. Legiec, W. Helbig, G. Hus, M. Kyrzcz-Krzemien, S. ve Skotnicki, A.B., (2014). "New drugs in multiple myeloma - role of carfilzomib and pomalidomide", *Contemp Oncol (Pozn)*, 18: 17-21.
- [13] Corre, J. Mahtouk, K. Attal, M. Gadelorge, M. Huynh, A. Fleury-Cappellesso, S. Danho, C. Laharrague, P. Klein, B. Reme, T. ve Bourin, P., (2007). "Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma", *Leukemia*, 21: 1079-1088.
- [14] Garderet, L. Mazurier, C. Chapel, A. Ernou, I. Boutin, L. Holy, X. Gorin, N.C. Lopez, M. Doucet, C. ve Lataillade, J.J., (2007). "Mesenchymal stem cell abnormalities in patients with multiple myeloma", *Leuk Lymphoma*, 48: 2032-2041.
- [15] Wallace, S.R. Oken, M.M. Lunetta, K.L. Panoskaltis-Mortari, A. ve Masellis, A.M., (2001). "Abnormalities of bone marrow mesenchymal cells in multiple myeloma patients", *Cancer*, 91: 1219-1230.
- [16] Lefebvre, V. ve Bhattaram, P., (2010). "Vertebrate skeletogenesis", *Curr Top Dev Biol*, 90: 291-317.
- [17] Mackie, E.J. Tatarczuch, L. ve Mirams, M., (2011). "The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification", *J Endocrinol*, 211: 109-121.
- [18] Long, F., "Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 27-38.
- [19] Augello, A. ve De Bari, C., (2010). "The Regulation of Differentiation in Mesenchymal Stem Cells", *Human Gene Therapy*, 21: 1226-1238.
- [20] Marie, P.J., (2008). "Transcription factors controlling osteoblastogenesis", *Arch Biochem Biophys*, 473: 98-105.
- [21] Nishimura, R. Hata, K. Matsubara, T. Wakabayashi, M. ve Yoneda, T., (2012). "Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors", *J Biochem*, 151: 247-254.
- [22] Giuliani, N. Rizzoli, V. Roodman, G.D., (2006). "Multiple myeloma bone disease: pathophysiology of osteoblast inhibition", *Blood*, 108:3992-3995.
- [23] Golub, E.E. Harrison, G. Taylor, A.G. Camper, S. ve Shapiro, I.M., (1992). "The role of alkaline phosphatase in cartilage mineralization", *Bone Miner*, 17: 273-278.
- [24] Gaur, T. Lengner, C.J. Hovhannisyanyan, H. Bhat, R.A. Bodine, P.V.N. Komm, B.S. Javed, A. van Wijnen, A.J. Stein, J.L. Stein, G.S. ve Lian, J.B., (2005).

- "Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression", *Journal of Biological Chemistry*, 280: 33132-33140.
- [25] Gaur, T. Rich, L. Lengner, C.J. Hussain, S. Trevant, R. Ayers, D. Stein, J.L. Bodine, P.V.N. Komm, B.S. Stein, G.S. ve Lian, J.B., (2006). "Secreted frizzled related protein 1 regulates Wnt signaling for BMP2 induced chondrocyte differentiation", *Journal of Cellular Physiology*, 208: 87-96.
- [26] Maehata, Y. Takamizawa, S. Ozawa, S. Kato, Y. Sato, S. Kubota, E. Hata, R., (2006). "Both direct and collagen-mediated signals are required for active vitamin D3-elicited differentiation of human osteoblastic cells", *Calcified Tissue International*, 78: S51-S51.
- [27] Zhou, Y.S. Liu, Y.S. Tan, J.G (2006). "Is 1,25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells in vitro? ", *Chin Med J (Engl)*, 119:1278–1286.
- [28] Arriagada, G. Paredes, R. Olate, J. van Wijnen, A. Lian, J.B. Stein, G.S. Stein, J.L. Onate, S. ve Montecino, M., (2007). "Phosphorylation at serine 208 of the 1 alpha,25-dihydroxy Vitamin D3 receptor modulates the interaction with transcriptional coactivators", *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 103: 425-429.
- [29] Paredes, R. Arriagada, G. Cruzat, F., (2004). "Bone-specific transcription factor Runx2 interacts with the 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 receptor to upregulate rat osteocalcin gene expression in osteoblastic cells. ", *Mol Cell Biol*, 24:8847–8861.
- [30] Wang, B.L. Dai, C.L. Quan, J.X. Zhu, Z.F. Zheng, F. Zhang, H.X. Guo, S.Y. Guo, G. Zhang, J.Y. ve Qiu, M.C., (2006). "Parathyroid hormone regulates osterix and Runx2 mRNA expression predominantly through protein kinase A signaling in osteoblast-like cells", *Journal of Endocrinological Investigation*, 29: 101-108.
- [31] Rey, A. Manen, D. Rizzoli, R. Ferrari, S.L. ve Caverzasio, J., (2007). "Evidences for a role of p38 MAP kinase in the stimulation of alkaline phosphatase and matrix mineralization induced by parathyroid hormone in osteoblastic cells", *Bone*, 41: 59-67.
- [32] Pacifici, M. Golden, E.B. Iwamoto, M. ve Adams, S.L., (1991). "Retinoic Acid Treatment Induces Type-X Collagen Gene-Expression in Cultured Chick Chondrocytes", *Experimental Cell Research*, 195: 38-46.
- [33] Matsubara, T. Kida, K. Yamaguchi, A. Hata, K. Ichida, F. Meguro, H. Aburatani, H. Nishimura, R. ve Yoneda, T., (2008). "BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation", *J Biol Chem*, 283: 29119-29125.
- [34] Komori, T., (2011). "Signaling networks in RUNX2-dependent bone development", *J Cell Biochem*, 112: 750-755.
- [35] Prunier, C. Hocevar, B.A. ve Howe, P.H., (2004). "Wnt signaling: physiology and pathology", *Growth Factors*, 22: 141-150.

- [36] Huelsken, J. ve Behrens, J., (2002). "The Wnt signalling pathway", *J Cell Sci*, 115: 3977-3978.
- [37] Altınok, B.,(2011). "Akut Myeloid Lösemide Wnt Sinyal Yolağındaki Genlerin DNA Mikroarray Analizi ile Tanımlanması", Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- [38] Güler, T. Demirezen, Ş., (2009). "Wnt Sinyal Yolunun Biyolojisi ve Bu Yolda Görev Alan Biyomoleküller", *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 29:1292-1297.
- [39] Moustakas, A. ve Heldin, C.H., (2009). "The regulation of TGFbeta signal transduction", *Development*, 136: 3699-3714.
- [40] Chen, G.Q. Deng, C.X. ve Li, Y.P., (2012). "TGF-beta and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation", *International Journal of Biological Sciences*, 8: 272-288.
- [41] Cancer research, Myeloma incidence statistics, <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/types/myeloma/incidence/uk-multiple-myeloma-incidence-statistics#europeandworldwide>, 15 Mayıs 2014.
- [42] Giuliani, N. Colla, S. Morandi, F. Lazzaretti, M. Sala, R. Bonomini, S. Grano, M. Colucci, S. Svaldi, M. ve Rizzoli, V., (2005). "Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation", *Blood*, 106: 2472-2483.
- [43] Barille, S. Collette, M. Bataille, R. Amiot, M., (1995). "Myeloma cells upregulate interleukin-6 secretion in osteoblastic cells through cell-to-cell contact but downregulate osteocalcin" , *Blood*, 86: 3151-3159.
- [44] Michigami, T. Shimizu, N. Williams, P.J. Niewolna, M. Dallas, S.L. Mundy, G.R. Yoneda, T., (2000). "Cell-cell contact between marrow stromal cells and myeloma cells via VCAM-1 and alpha(4)beta(1)-integrin enhances production of osteoclast-stimulating activity", *Blood*, 96: 1953-1960.
- [45] Mori, Y. Shimizu, N. Dallas, M. Niewolna, M. Story, B. Williams, P.J. Mundy, G.R. Yoneda, T., (2004). "Anti-alpha4 integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated osteoclastic osteolysis" , *Blood*, 104: 2149-2154.
- [46] van Riet, I. de Greef, C. del Favero, H. Demanet, C. Van Camp, B., (1994). "Production of fibronectin and adherence to fibronectin by human myeloma cell lines", *Br J Haematol*, 87: 258-265.
- [47] Ely, S.A. Knowles, D.M., (2002). "Expression of CD56/neural cell adhesion molecule correlates with the presence of lytic bone lesions in multiple myeloma and distinguishes myeloma from monoclonal gammopathy of undetermined significance and lymphomas with plasmacytoid differentiation" , *Am J Pathol*, 160: 1293-1299.
- [48] Weitzmann, M.N. Roggia, C. Toraldo, G. Weitzmann, L. Pacifici, R., (2002). "Increased production of IL-7 uncouples bone formation from bone resorption during estrogen deficiency", *J Clin Invest*, 110: 1643-1650.

- [49] Giuliani, N. Colla, S. Sala, R. Moroni, M. Lazzaretti, M. La Monica, S. Bonomini, S. Hojden, M. Sammarelli, G. Barillè, S. Bataille, R. Rizzoli, V., (2002). "Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease", *Blood*, 100: 4615-4621.
- [50] Gunn, W.G. Conley, A. Deininger, L. Olson, S.D. Prockop, D.J. Gregory, C.A., (2006). "A crosstalk between myeloma cells and marrow stromal cells stimulates production of DKK1 and interleukin-6: a potential role in the development of lytic bone disease and tumor progression in multiple myeloma", *Stem Cells*, 24: 986-991.
- [51] Ehrlich, L.A. Chung, H.Y. Ghobrial, I. Choi, S.J. Morandi, F. Colla, S. Rizzoli, V. Roodman, G.D. Giuliani, N., (2005). "IL-3 is a potential inhibitor of osteoblast differentiation in multiple myeloma", *Blood*, 106: 1407-1414.
- [52] Stephens, A.S. Stephens, S.R. ve Morrison, N.A., (2011). "Internal control genes for quantitative RT-PZR expression analysis in mouse osteoblasts, osteoclasts and macrophages", *BMC Res Notes*, 4: 410.
- [53] Kyle, R.A., (1994). "Multiple-Myeloma - How Did It Begin", *Mayo Clinic Proceedings*, 69: 680-683.
- [54] Kyle, R.A. Gertz, M.A. Witzig, T.E. Lust, J.A. Lacy, M.Q. Dispenzieri, A. Fonseca, R. Rajkumar, S.V. Offord, J.R. Larson, D.R. Plevak, M.E. Therneau, T.M. ve Greipp, P.R., (2003). "Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma", *Mayo Clin Proc*, 78: 21-33.
- [55] Kapadia, S.B., (1980). "Multiple myeloma: a clinicopathologic study of 62 consecutively autopsied cases", *Medicine (Baltimore)*, 59: 380-392.
- [56] Suzuki, K., (2013). "Current therapeutic strategy for multiple myeloma", *Jpn J Clin Oncol*, 43: 116-124.
- [57] Kristinsson, S.Y. Minter, A.R. Korde, N. Tan, E. ve Landgren, O., (2011). "Bone disease in multiple myeloma and precursor disease: novel diagnostic approaches and implications on clinical management", *Expert Rev Mol Diagn*, 11: 593-603.
- [58] Mundy, G.R. Luben, R.A. Raisz, L.G. Oppenheim, J.J. ve Buell, D.N., (1974). "Bone-resorbing activity in supernatants from lymphoid cell lines", *N Engl J Med*, 290: 867-871.
- [59] Mundy, G.R. Raisz, L.G. Cooper, R.A. Schechter, G.P. ve Salmon, S.E., (1974). "Evidence for the secretion of an osteoclast stimulating factor in myeloma", *N Engl J Med*, 291: 1041-1046.
- [60] Giuliani, N. Bataille, R. Mancini, C. Lazzaretti, M. ve Barille, S., (2001). "Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment", *Blood*, 98: 3527-3533.
- [61] Pearse, R.N. Sordillo, E.M. Yaccoby, S. Wong, B.R. Liau, D.F. Colman, N. Michaeli, J. Epstein, J. ve Choi, Y., (2001). "Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 11581-11586.

- [62] Choi, S.J. Cruz, J.C. Craig, F. Chung, H. Devlin, R.D. Roodman, G.D. ve Alsina, M., (2000). "Macrophage inflammatory protein 1-alpha is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma", *Blood*, 96: 671-675.
- [63] Kupisiewicz, K., (2011). "Biological aspects of altered bone remodeling in multiple myeloma and possibilities of pharmacological intervention", *Dan Med Bull*, 58: B4277.
- [64] Levy, J. ve Roodman, G.D., (2009). "The role of bisphosphonates in multiple myeloma", *Curr Hematol Malig Rep*, 4: 108-112.
- [65] Arnulf, B. Lecourt, S. Soulier, J. Ternaux, B. Lacassagne, M.N. Crinquette, A. Dessoly, J. Sciaini, A.K. Benbunan, M. Chomienne, C. Fermand, J.P. Marolleau, J.P. ve Larghero, J., (2007). "Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma", *Leukemia*, 21: 158-163.
- [66] Tavassoli, M. ve Crosby, W.H., (1968). "Transplantation of marrow to extramedullary sites", *Science*, 161: 54-56.
- [67] Friedenstein, A.J. Chailakhyan, R.K. ve Gerasimov, U.V., (1987). "Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers", *Cell Tissue Kinet*, 20: 263-272.
- [68] Owen, M. ve Friedenstein, A.J., (1988). "Stromal Stem-Cells - Marrow-Derived Osteogenic Precursors", *Ciba Foundation Symposia*, 136: 42-60.
- [69] Caplan, A.I., (1991). "Mesenchymal stem cells", *J Orthop Res*, 9: 641-650.
- [70] Klingseisen, A. ve Jackson, A.P., (2011). "Mechanisms and pathways of growth failure in primordial dwarfism", *Genes Dev*, 25: 2011-2024.
- [71] Wikipedia, William MacIntyre, http://en.wikipedia.org/wiki/William_MacIntyre, 15 Mayıs 2014.
- [72] Dimopoulos, M. Terpos, E. Comenzo, R.L. Tosi, P. Beksac, M. Sezer, O. Siegel, D. Lokhorst, H. Kumar, S. Rajkumar, S.V. Niesvizky, R. Moulopoulos, L.A. Durie, B.G.M. ve Imwg, (2009). "International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma", *Leukemia*, 23: 1545-1556.
- [73] Shaughnessy, J.D., Jr. ve Barlogie, B., (2003). "Interpreting the molecular biology and clinical behavior of multiple myeloma in the context of global gene expression profiling", *Immunol Rev*, 194: 140-163.
- [74] Robillard, N. Wulleme, S. Moreau, P. ve Bene, M.C., (2014). "Immunophenotype of normal and myelomatous plasma-cell subsets", *Front Immunol*, 5: 137.
- [75] Karaoz, E. Demircan, P.C. Saglam, O. Aksoy, A. Kaymaz, F. ve Duruksu, G., (2011). "Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells", *Histochem Cell Biol*, 136: 455-473.

- [76] James, A.W., (2013). "Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation", *Scientifica (Cairo)*, 2013: 684736.
- [77] Karaoz, E. Dogan, B.N. Aksoy, A. Gacar, G. Akyuz, S. Ayhan, S. Genc, Z.S. Yuruker, S. Duruksu, G. Demircan, P.C. ve Sariboyaci, A.E., (2010). "Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth", *Histochem Cell Biol*, 133: 95-112.
- [78] Xu, S. Menu, E. De Becker, A. Van Camp, B. Vanderkerken, K. ve Van Riet, I., (2012). "Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are attracted by multiple myeloma cell-produced chemokine CCL25 and favor myeloma cell growth in vitro and in vivo", *Stem Cells*, 30: 266-279.
- [79] Wu, L. Wu, Y. Lin, Y.F. Jing, W. Nie, X. Qiao, J. Liu, L. Tang, W. ve Tian, W.D., (2007). "Osteogenic differentiation of adipose derived stem cells promoted by overexpression of osterix", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 301: 83-92.
- [80] Standal, T. Abildgaard, N. Fagerli, U.M. Stordal, B. Hjertner, O. Borset, M. ve Sundan, A., (2007). "HGF inhibits BMP-induced osteoblastogenesis: possible implications for the bone disease of multiple myeloma", *Blood*, 109: 3024-3030.
- [81] Shui, C. Spelsberg, T.C. Riggs, B.L. ve Khosla, S., (2003). "Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells", *J Bone Miner Res*, 18: 213-221.
- [82] Clarke, B., (2008). "Normal bone anatomy and physiology", *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 Suppl 3: S131-139.
- [83] McCarthy, E.F., (2011). "Genetic diseases of bones and joints", *Semin Diagn Pathol*, 28: 26-36.
- [84] Volk, S.W. Shah, S.R. Cohen, A.J. Wang, Y. Brisson, B.K. Vogel, L.K. Hankenson, K.D. ve Adams, S.L., (2014). "Type III Collagen Regulates Osteoblastogenesis and the Quantity of Trabecular Bone", *Calcif Tissue Int*, 94: 621-631.
- [85] Hong, D. Chen, H.X. Yu, H.Q. Liang, Y. Wang, C. Lian, Q.Q. Deng, H.T. ve Ge, R.S., (2010). "Morphological and proteomic analysis of early stage of osteoblast differentiation in osteoblastic progenitor cells", *Exp Cell Res*, 316: 2291-2300.
- [86] Fei, Y.R. Xiao, L.P. Doetschman, T. Coffin, D.J. ve Hurley, M.M., (2011). "Fibroblast Growth Factor 2 Stimulation of Osteoblast Differentiation and Bone Formation Is Mediated by Modulation of the Wnt Signaling Pathway", *Journal of Biological Chemistry*, 286: 40575-40583.
- [87] Montero, A. Okada, Y. Tomita, M. Ito, M. Tsurukami, H. Nakamura, T. Doetschman, T. Coffin, J.D. ve Hurley, M.M., (2000). "Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation", *J Clin Invest*, 105: 1085-1093.

- [88] Naganawa, T. Xiao, L. Abogunde, E. Sobue, T. Kalajzic, I. Sabbieti, M. Agas, D. ve Hurley, M.M., (2006). "In vivo and in vitro comparison of the effects of FGF-2 null and haplo-insufficiency on bone formation in mice", *Biochem Biophys Res Commun*, 339: 490-498.
- [89] Xiao, L. Sobue, T. Esliger, A. Kronenberg, M.S. Coffin, J.D. Doetschman, T. ve Hurley, M.M., (2010). "Disruption of the Fgf2 gene activates the adipogenic and suppresses the osteogenic program in mesenchymal marrow stromal stem cells", *Bone*, 47: 360-370.
- [90] Hughes-Fulford, M. ve Li, C.F., (2011). "The role of FGF-2 and BMP-2 in regulation of gene induction, cell proliferation and mineralization", *J Orthop Surg Res*, 6: 8.
- [91] Naganawa, T. Xiao, L. Coffin, J.D. Doetschman, T. Sabbieti, M.G. Agas, D. ve Hurley, M.M., (2008). "Reduced expression and function of bone morphogenetic protein-2 in bones of Fgf2 null mice", *J Cell Biochem*, 103: 1975-1988.
- [92] Eswarakumar, V.P. Lax, I. ve Schlessinger, J., (2005). "Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors", *Cytokine Growth Factor Rev*, 16: 139-149.
- [93] Isenmann, S. Arthur, A. Zannettino, A.C. Turner, J.L. Shi, S. Glackin, C.A. ve Gronthos, S., (2009). "TWIST family of basic helix-loop-helix transcription factors mediate human mesenchymal stem cell growth and commitment", *Stem Cells*, 27: 2457-2468.
- [94] Miraoui, H. ve Marie, P.J., (2010). "Pivotal role of Twist in skeletal biology and pathology", *Gene*, 468: 1-7.
- [95] van Driel, M. Koedam, M. Buurman, C.J. Hewison, M. Chiba, H. Uitterlinden, A.G. Pols, H.A. ve van Leeuwen, J.P., (2006). "Evidence for auto/paracrine actions of vitamin D in bone: 1 α -hydroxylase expression and activity in human bone cells", *FASEB J*, 20: 2417-2419.
- [96] Amling, M. Priemel, M. Holzmann, T. Chapin, K. Rueger, J.M. Baron, R. ve Demay, M.B., (1999). "Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: Formal histomorphometric and biomechanical analyses", *Endocrinology*, 140: 4982-4987.
- [97] Yamamoto, Y. Yoshizawa, T. Fukuda, T. Shirode-Fukuda, Y. Yu, T.Y. Sekine, K. Sato, T. Kawano, H. Aihara, K. Nakamichi, Y. Watanabe, T. Shindo, M. Inoue, K. Inoue, E. Tsuji, N. Hoshino, M. Karsenty, G. Metzger, D. Chambon, P. Kato, S. ve Imai, Y., (2013). "Vitamin D Receptor in Osteoblasts Is a Negative Regulator of Bone Mass Control", *Endocrinology*, 154: 1008-1020.
- [98] Eelen, G. Verlinden, L. Van Camp, M. Mathieu, C. Carmeliet, G. Bouillon, R. ve Verstuyf, A., (2004). "Microarray analysis of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-treated MC3T3-E1 cells", *J Steroid Biochem Mol Biol*, 89-90: 405-407.
- [99] Murray, S. Glackin, C. ve Murray, E., (1993). "Variation in 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulation of proliferation and alkaline phosphatase activity in late-passage rat osteoblastic cell lines", *J Steroid Biochem Mol Biol*, 46: 227-233.

- [100] van Leeuwen, J.P. Birkenhager, J.C. van den Bemd, G.C. ve Pols, H.A., (1996). "Evidence for coordinated regulation of osteoblast function by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and parathyroid hormone", *Biochim Biophys Acta*, 1312: 54-62.
- [101] Shi, Y.C. Worton, L. Esteban, L. Baldock, P. Fong, C. Eisman, J.A. ve Gardiner, E.M., (2007). "Effects of continuous activation of vitamin D and Wnt response pathways on osteoblastic proliferation and differentiation", *Bone*, 41: 87-96.
- [102] Thompson, L. Wang, S. Tawfik, O. Templeton, K. Tancabelic, J. Pinson, D. Anderson, H.C. Keighley, J. ve Garimella, R., (2012). "Effect of 25-hydroxyvitamin D₃ and 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D₃ on differentiation and apoptosis of human osteosarcoma cell lines", *J Orthop Res*, 30: 831-844.
- [103] van Driel, M. ve van Leeuwen, J.P., (2014). "Vitamin D endocrine system and osteoblasts", *Bonekey Rep*, 3: 493.
- [104] van Driel, M. Koedam, M. Buurman, C.J. Roelse, M. Weyts, F. Chiba, H. Uitterlinden, A.G. Pols, H.A. ve van Leeuwen, J.P., (2006). "Evidence that both 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ and 24-hydroxylated D₃ enhance human osteoblast differentiation and mineralization", *J Cell Biochem*, 99: 922-935.
- [105] Jorgensen, N.R. Henriksen, Z. Sorensen, O.H. ve Civitelli, R., (2004). "Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts", *Steroids*, 69: 219-226.
- [106] Woeckel, V.J. Alves, R.D. Swagemakers, S.M. Eijken, M. Chiba, H. van der Eerden, B.C. ve van Leeuwen, J.P., (2010). "1Alpha,25-(OH)₂D₃ acts in the early phase of osteoblast differentiation to enhance mineralization via accelerated production of mature matrix vesicles", *J Cell Physiol*, 225: 593-600.
- [107] Zhou, S. Glowacki, J. Kim, S.W. Hahne, J. Geng, S. Mueller, S.M. Shen, L. Bleiberg, I. ve LeBoff, M.S., (2012). "Clinical characteristics influence in vitro action of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in human marrow stromal cells", *J Bone Miner Res*, 27: 1992-2000.
- [108] Owen, T.A. Aronow, M.S. Barone, L.M. Bettencourt, B. Stein, G.S. ve Lian, J.B., (1991). "Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures", *Endocrinology*, 128: 1496-1504.
- [109] Kitazawa, S. Kajimoto, K. Kondo, T. ve Kitazawa, R., (2003). "Vitamin D₃ supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response element of human RANKL gene promoter", *J Cell Biochem*, 89: 771-777.
- [110] Lieblisch, M. Altarescu, G. Zimran, A. ve Elstein, D., (2011). "Vitamin D Receptor (VDR) polymorphic variants in patients with cancer and Gaucher disease", *Blood Cells Mol Dis*, 46: 92-94.

- [111] Kaiser, M.F. Heider, U. Mieth, M. Zang, C. von Metzler, I. ve Sezer, O., (2013). "The proteasome inhibitor bortezomib stimulates osteoblastic differentiation of human osteoblast precursors via upregulation of vitamin D receptor signalling", *Eur J Haematol*, 90: 263-272.
- [112] Seckinger, A. Meissner, T. Moreaux, J. Goldschmidt, H. Fuhler, G.M. Benner, A. Hundemer, M. Reme, T. Shaughnessy, J.D., Jr. Barlogie, B. Bertsch, U. Hillengass, J. Ho, A.D. Pantesco, V. Jauch, A. De Vos, J. Rossi, J.F. Mohler, T. Klein, B. ve Hose, D., (2009). "Bone morphogenetic protein 6: a member of a novel class of prognostic factors expressed by normal and malignant plasma cells inhibiting proliferation and angiogenesis", *Oncogene*, 28: 3866-3879.
- [113] Sykaras, N. ve Opperman, L.A., (2003). "Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician?", *J Oral Sci*, 45: 57-73.
- [114] Singhatanadgit, W. Salih, V. ve Olsen, I., (2006). "Up-regulation of bone morphogenetic protein receptor IB by growth factors enhances BMP-2-induced human bone cell functions", *Journal of Cellular Physiology*, 209: 912-922.
- [115] Kamiya, N. ve Mishina, Y., (2011). "New insights on the roles of BMP signaling in bone-A review of recent mouse genetic studies", *Biofactors*, 37: 75-82.
- [116] Gu, K. Zhang, L.X. Jin, T.C. ve Rutherford, R.B., (2004). "Identification of potential modifiers of Runx2/Cbfa1 activity in C2C12 cells in response to bone morphogenetic protein-7", *Cells Tissues Organs*, 176: 28-40.
- [117] Shen, B.J. Wei, A.Q. Whittaker, S. Williams, L.A. Tao, H. Ma, D.D.F. ve Diwan, A.D., (2010). "The Role of BMP-7 in Chondrogenic and Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells In Vitro", *Journal of Cellular Biochemistry*, 109: 406-416.
- [118] Tsuji, K. Cox, K. Gamer, L. Graf, D. Economides, A. ve Rosen, V., (2010). "Conditional Deletion of BMP7 from the Limb Skeleton Does Not Affect Bone Formation or Fracture Repair", *Journal of Orthopaedic Research*, 28: 384-389.
- [119] Neumann, K. Endres, M. Ringe, J. Flath, B. Manz, R. Haupl, T. Sittinger, M. ve Kaps, C., (2007). "BMP7 promotes adipogenic but not osteo-/chondrogenic differentiation of adult human bone marrow-derived stem cells in high-density micro-mass culture", *J Cell Biochem*, 102: 626-637.
- [120] Bandyopadhyay, A. Tsuji, K. Cox, K. Harfe, B.D. Rosen, V. ve Tabin, C.J., (2006). "Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis", *Plos Genetics*, 2: 2116-2130.
- [121] Tsuji, K. Bandyopadhyay, A. Harfe, B.D. Cox, K. Kakar, S. Gerstenfeld, L. Einhorn, T. Tabin, C.J. ve Rosen, V., (2006). "BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing", *Nature Genetics*, 38: 1424-1429.
- [122] Okamoto, M. Murai, J. Yoshikawa, H. ve Tsumaki, N., (2006). "Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development", *Journal of Bone and Mineral Research*, 21: 1022-1033.

- [123] Varin, A. Pontikoglou, C. Labat, E. Deschaseaux, F. ve Sensebe, L., (2013). "CD200R/CD200 inhibits osteoclastogenesis: new mechanism of osteoclast control by mesenchymal stem cells in human", *PLoS One*, 8: e72831.
- [124] Kupisiewicz, K., (2011). "Biological aspects of altered bone remodeling in multiple myeloma and possibilities of pharmacological intervention", *Dan Med Bull*, 58: B4277.
- [125] Regan, J. ve Long, F., (2013). "Notch signaling and bone remodeling", *Curr Osteoporos Rep*, 11: 126-129.
- [126] Miyamoto, T., "Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion", *Keio J Med*, 60: 101-105.
- [127] Silvestris, F. Ciavarella, S. De Matteo, M. Tucci, M. ve Dammacco, F., (2009). "Bone-resorbing cells in multiple myeloma: osteoclasts, myeloma cell polykaryons, or both?", *Oncologist*, 14: 264-275.
- [128] Yoshida, H. Hayashi, S.I. Kunisada, T. Ogawa, M. Nishikawa, S. Okamura, H. Sudo, T. Shultz, L.D. ve Nishikawa, S.I., (1990). "The Murine Mutation Osteopetrosis Is in the Coding Region of the Macrophage Colony Stimulating Factor Gene", *Nature*, 345: 442-444.
- [129] Manier, S. Sacco, A. Leleu, X. Ghobrial, I.M. ve Roccaro, A.M., (2012). "Bone marrow microenvironment in multiple myeloma progression", *J Biomed Biotechnol*, 2012: 157496.
- [130] Vallet, S. ve Podar, K., (2013). "New insights, recent advances, and current challenges in the biological treatment of multiple myeloma", *Expert Opin Biol Ther*, 13 Suppl 1: S35-53.
- [131] Tanaka, Y. Morimoto, I. Nakano, Y. Okada, Y. Hirota, S. Nomura, S. Nakamura, T. ve Eto, S., (1995). "Osteoblasts Are Regulated by the Cellular Adhesion through Icam-1 and Vcam-1", *Journal of Bone and Mineral Research*, 10: 1462-1469.
- [132] Lisignoli, G. Toneguzzi, S. Pozzi, C. Piacentini, A. Riccio, M. Ferruzzi, A. Gualtieri, G. ve Facchini, A., (1999). "Proinflammatory cytokines and chemokine production and expression by human osteoblasts isolated from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis", *J Rheumatol*, 26: 791-799.
- [133] Silvestris, F. Cafforio, P. Calvani, N. ve Dammacco, F., (2004). "Impaired osteoblastogenesis in myeloma bone disease: role of upregulated apoptosis by cytokines and malignant plasma cells", *Br J Haematol*, 126: 475-486.
- [134] Hauck, C.R., (2002). "Cell adhesion receptors - signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens", *Med Microbiol Immunol*, 191: 55-62.
- [135] Calderwood, D.A., (2004). "Integrin activation", *J Cell Sci*, 117: 657-666.
- [136] Liddington, R.C. ve Ginsberg, M.H., (2002). "Integrin activation takes shape", *J Cell Biol*, 158: 833-839.

- [137] Moursi, A.M. Globus, R.K. ve Damsky, C.H., (1997). "Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro", *J Cell Sci*, 110 (Pt 18): 2187-2196.
- [138] Hamidouche, Z. Fromigue, O. Ringe, J. Haupl, T. Vaudin, P. Pages, J.C. Srouji, S. Livne, E. ve Marie, P.J., (2009). "Priming integrin alpha5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 18587-18591.
- [139] Czyz, J. ve Wobus, A., (2001). "Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors", *Differentiation*, 68: 167-174.
- [140] Brunner, M. Millon-Fremillon, A. Chevalier, G. Nakchbandi, I.A. Mosher, D. Block, M.R. Albiges-Rizo, C. ve Bouvard, D., (2011). "Osteoblast mineralization requires beta1 integrin/ICAP-1-dependent fibronectin deposition", *J Cell Biol*, 194: 307-322.
- [141] Sununliganon, L. ve Singhatanadgit, W., (2012). "Highly osteogenic PDL stem cell clones specifically express elevated levels of ICAM1, ITGB1 and TERT", *Cytotechnology*, 64: 53-63.
- [142] Gregoretti, M.G. Gottardi, D. Ghia, P. Bergui, L. Merico, F. Marchisio, P.C. ve Caligaris-Cappio, F., (1994). "Characterization of bone marrow stromal cells from multiple myeloma", *Leuk Res*, 18: 675-682.
- [143] Choi, S.J. Oba, Y. Gazitt, Y. Alsina, M. Cruz, J. Anderson, J. ve Roodman, G.D., (2001). "Antisense inhibition of macrophage inflammatory protein 1-alpha blocks bone destruction in a model of myeloma bone disease", *J Clin Invest*, 108: 1833-1841.
- [144] Shain, K.H. Yarde, D.N. Meads, M.B. Huang, M. Jove, R. Hazlehurst, L.A. ve Dalton, W.S., (2009). "Beta1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation", *Cancer Res*, 69: 1009-1015.
- [145] Liu, Y. Strecker, S. Wang, L. Kronenberg, M.S. Wang, W. Rowe, D.W. ve Maye, P., (2013). "Osterix-cre labeled progenitor cells contribute to the formation and maintenance of the bone marrow stroma", *PLoS One*, 8: e71318.
- [146] Vacca, A. Ribatti, D. Presta, M. Minischetti, M. Iurlaro, M. Ria, R. Albini, A. Bussolino, F. ve Dammacco, F., (1999). "Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma", *Blood*, 93: 3064-3073.
- [147] Plotkin, L.I. Manolagas, S.C. ve Bellido, T., (2002). "Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels", *Journal of Biological Chemistry*, 277: 8648-8657.
- [148] Plotkin, L.I. Weinstein, R.S. Parfitt, A.M. Roberson, P.K. Manolagas, S.C. ve Bellido, T., (1999). "Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin", *Journal of Clinical Investigation*, 104: 1363-1374.
- [149] Plotkin, L.I. Lezcano, V. Thostenson, J. Weinstein, R.T.S. Manolagas, S.C. ve Bellido, T., (2008). "Connexin 43 Is Required for the Anti-Apoptotic Effect of

Bisphosphonates on Osteocytes and Osteoblasts In Vivo", *Journal of Bone and Mineral Research*, 23: 1712-1721.

- [150] Watkins, M. Grimston, S.K. Norris, J.Y. Guillotin, B. Shaw, A. Beniash, E. ve Civitelli, R., (2011). "Osteoblast connexin43 modulates skeletal architecture by regulating both arms of bone remodeling", *Molecular Biology of the Cell*, 22: 1240-1251.
- [151] Zhang, X.H. Sun, Y. Wang, Z.Y. Huang, Z.P. ve Fu, J.X., (2013) "Alterations of connexin 43 expression and SDF-1alpha secretion of bone marrow mesenchymal stem cells co-cultured with myeloma cells", *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 34: 788-793.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ayça AKSOY
Doğum Tarihi ve Yeri : Ankara/1982
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : ayca.aksoy@yahoo.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Histoloji ve Embriyoloji	Osmangazi Üniversitesi	2007
Lisans	Biyoloji	Ankara Üniversitesi	2004
Lise	Matematik- Fen	Ömer Seyfettin Lisesi	1999

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2008-2014	Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre Anabilim Dalı	Biyolog

SERTİFİKALAR

1. Üremeye Yardımcı Tedaviler Embriyoloji sertifikası Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezi, 2006
2. Deney hayvanları sertifikası. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2006
3. II. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları kursu sertifikası, 23-27 Haziran 2008, Kocaeli.

BİLİMSEL TOPLANTILARDAKİ GÖREVLER (KONGRE, KURS VE SEMPOZYUM)

1. III. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Mikroskobik Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 13-17 Ekim 2008, Kocaeli.
2. IV. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu, **Düzenleme kurulu üyesi**, 23-27 Mart 2009, Kocaeli.
3. V. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 30 Mart-3 Nisan 2009, Kocaeli.
4. VI. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 01-05 Haziran 2009, Kocaeli.
5. I. Temel Hücre teknikleri ve Embriyo-Endometrium Ko-Kültür Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 17-18 Haziran 2009, Kocaeli.

6. II. Temel Hücre teknikleri ve Embriyo-Endometrium Ko-Kültür Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 28-29 Eylül 2009, Kocaeli.
7. VII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 19-23 Ekim 2009, Kocaeli.
8. VIII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 2-6 Kasım 2009, Kocaeli.
9. III. Temel Hücre teknikleri ve Embriyo-Endometrium Ko-Kültür Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 22-23 Şubat 2010, Kocaeli.
10. IX. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 22-26 Mart 2010, Kocaeli.
11. X. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 14-18 Haziran 2010, Kocaeli.
12. XI. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 11-15 Ekim 2010, Kocaeli.
13. XII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 29 Kasım-3 Aralık 2010, Kocaeli.
14. XIII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 13-17 Aralık 2010, Kocaeli.
15. XIV. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 21-25 Mart 2011, Kocaeli.
16. XV. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu (Kocaeli Üniversitesi-Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği ve TÜBİTAK Destekli) **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 09-13 Mayıs 2011, Kocaeli.
17. I. Kök Hücre Araştırmaları Kongresi (Uluslararası Katılımlı), **Yerel Düzenleme Kurulu Üyesi**, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Gural Sapanca Oteli, Kocaeli.
18. I. Kök Hücre Araştırmaları Kongresi (Uluslararası Katılımlı) Temel Kök Hücre Teknikleri Kursu, **Eğitmen**, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Gural Sapanca Oteli, Kocaeli.
19. XVI. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 28 Kasım-2 Aralık 2011, Kocaeli.

20. XVII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 24-28 Eylül 2012, Kocaeli.
21. XVIII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 05-09 Kasım 2012, Kocaeli.
22. 3rd Geneocell Summer School, Advanced Stem Cell Technologies and Therapies **Eğitmen, Düzenleme kurulu üyesi**, 09-15 Eylül 2013, Kocaeli.
23. 1. Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi (Uluslararası Katılımlı), **Eğitmen**, 20-23 Mart 2014, Kartepe Greenpark Otel, Kocaeli.

YAYINLAR

Makale

1. Karaoz, E. **Aksoy, A.** Ayhan, S. Sariboyaci, A.E. Kaymaz, F. ve Kasap, M., (2009). "Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers", *Histochem Cell Biol*, 132: 533-546.
2. Karaoz, E. Ayhan, S. Gacar, G. **Aksoy, A.** Duruksu, G. Okcu, A. Demircan, P.C. Sariboyaci, A.E. Kaymaz, F. ve Kasap, M., (2010). "Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics", *Cytotherapy*, 12: 288-302.
3. Karaoz, E. Dogan, B.N. **Aksoy, A.** Gacar, G. Akyuz, S. Ayhan, S. Genc, Z.S. Yuruker, S. Duruksu, G. Demircan, P.C. ve Sariboyaci, A.E., (2010). "Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth", *Histochem Cell Biol*, 133: 95-112.
4. Karaoz, E. Ayhan, S. Okcu, A. **Aksoy, A.** Bayazit, G. Osman Gurol, A. ve Duruksu, G., (2011). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells co-cultured with pancreatic islets display beta cell plasticity", *J Tissue Eng Regen Med*, 5: 491-500.
5. Karaoz E, Demircan PÇ, Saglam Ö, **Aksoy A**, Kaymaz F, Duruksu G., (2011). "Human Dental Pulp Stem Cells Demonstrate Better Neural and Epithelial Stem Cell Properties than Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells", *Histochemistry and Cell Biology*, 136(4):455-473.

6. Kasap, M. Karaoz, E. Akpınar, G. **Aksoy, A.** ve Erman, G., (2011). "A unique Golgi apparatus distribution may be a marker for osteogenic differentiation of hDP-MSCs", *Cell Biochem Funct*, 29: 489-495.
7. Ertas, G. Ural, E. Ural, D. **Aksoy, A.** Kozdag, G. Gacar, G. ve Karaoz, E., (2012). "Comparative analysis of apoptotic resistance of mesenchymal stem cells isolated from human bone marrow and adipose tissue", *ScientificWorldJournal*, 2012: 105698.
8. Cakici, C. Buyrukcu, B. Duruksu, G. Haliloglu, A.H. **Aksoy, A.** Isik, A. Uludag, O. Ustun, H. Subasi, C. ve Karaoz, E., (2013). "Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation", *Biomed Res Int*, 2013: 529589.
9. Ercan, E. Bagla, A.G. **Aksoy, A.** Gacar, G. Unal, Z.S. Asgun, H.F. ve Karaoz, E., (2014). "In vitro protection of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by erythropoietin", *Acta Histochem*, 116: 117-125.
10. Ogulur, I. Gurhan, G. **Aksoy, A.** Duruksu, G. Inci, C. Filinte, D. Kombak, F.E. Karaoz, E. ve Akkoc, T., (2014). "Suppressive effect of compact bone-derived mesenchymal stem cells on chronic airway remodeling in murine model of asthma", *Int Immunopharmacol*, 20: 101-109.
11. Simsek, T. Duruksu, G. Okcu, A. **Aksoy, A.** Erman, G. Utkan, Z. Canturk, Z. ve Karaoz, E., (2014). "Effect of hypothyroidism in the thyroidectomized rats on immunophenotypic characteristics and differentiation capacity of adipose tissue derived stem cells", *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 18: 617-629.

BİLDİRİLER

1. Ozkoc G, Quaedflieg M, Karaoz E, Sarıboyacı A, Okçu A, **Aksoy A**, Ayhan S. Application of microcompounding in tissue engineering: A new route to prepare scaffolds. Interactive Workshop by DSM Xplore and Rheolabo, Tokyo/Japan (2008).
2. Karaöz E, Sarıboyacı AE, Kasap M, Ayhan S, **Aksoy A**, Köktürk S, Özoğul C. Sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu, karakterizasyonu ve farklılaşma potansiyeli. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi, Bildiri No:89, s88-89, 8-11 Ekim 2008, Çeşme-İzmir.

3. **Aksoy A**, Okçu A, Ayhan S, Sarıboyacı AE, Karaöz E. İnsan Kemik iliği, natal, süt ve yirmi yaş, diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşma potansiyelinin nicesel olarak incelenmesi: Karşılaştırmalı bir çalışma. THD 35. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s: 90-1. Antalya 2009.
4. Gacar G, Genç ZS, Sağlam Ö, Sarıboyacı AE, **Aksoy A**, Karaöz E. İnsan mezenkimal kök hücrelerinde embriyonik transkripsiyon faktörlerin (Oct4, Rex1, Sox2, Nanog ve Foxd3) ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi. THD 35. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s: 91. Antalya 2009.
5. Karaöz E, Ayhan S, Okçu A, **Aksoy A**, Bayazıt G, Gürol AO. Pankreatik Adacıklar ile Doğrudan Ko-Kültüre Edilen Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İnsülin-Üreten Hücrelere Farklılaşma Potansiyeli. THD 35. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Kitabı. s:86, Antalya 2009.
6. Karaöz E, Yürüker S, Okçu A, Kaymaz F, **Aksoy A**. İnsan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İnce Yapı Özelliklerinin İncelenmesi. THD 35. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Kitabı. S:87, Antalya 2009.
7. Duruksu G, **Aksoy A**, Okçu A, Karaöz E. Farklı İnsan Organ Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Telomeraz Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. THD 35. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s:88, Antalya 2009.
8. Karaöz E, Çalışkan E, **Aksoy A**, Ayhan S, Genç ZS, Gacar G, Yalçınkaya E, Sarıboyacı A.E. Isolation and In Vitro Characterization of Human Endometrial Stromal Stem Cells. 8th TURKISH-GERMAN GYNECOLOGY CONGRESS, ref ID:281, pp211, April 29-May 3 2009, Antalya.
9. Karaöz E, Doğan BN, **Aksoy A**, Gacar G, Akyüz A. Isolation and Characterization of Dental Pulp Stem Cells from Natal Teeth. The 22nd Congress of the International Association of Paediatric Dentistry, June 17-20, Munich/Germany, 2009. International Journal of Pediatric Dentistry, 19 (Suppl.1)-p31, 2009.
10. Duruksu G, **Aksoy A**, Okcu A, Gacar G, Karaöz E. Telomerase Activity: Indicator for Stable Transformation Efficiency in Mesenchymal Stem Cells. 5th World Congress on Preventive & Regenerative Medicine, October 5-7, 2010, Hannover, Germany.
11. Karaöz E, Genç SZ, Ayhan S, **Aksoy A**, Okçu A, Gacar G, Kasap M. May The c-Fos To Become a New Common Marker for Mesenchymal Stem Cells ?

Haematologica, 14th Congress of the European Hematology Association, June 4-7 2009, Berlin, Germany, 1129, p458.

12. Karaöz E, **Aksoy A**, Genç SZ, Ayhan S, Gacar G, Okçu A, Demircan PÇ, Caliskan E, Sarıboyacı AE. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Dental Pulp, Adipose Tissue and Endometrium. Haematologica,14th Congress of the European Hematology Association, June 4-7 2009, Berlin, Germany, 1132, p459.

13. Karaöz E, Ayhan S, Gacar G, **Aksoy A**, Okçu A, Demircan PÇ, Sarıboyacı AE, Özoğul C, Kasap M. Sıçan Pankreas Adacık- ve Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İn Vitro Karakteristik Özelliklerinin karşılaştırılması Olarak İncelenmesi. 45. Ulusal Diyabet Kongresi, SS01, s123, 20-24 Mayıs 2009, Antalya.

14. Karaöz E, Okçu A, **Aksoy A**, Genç ZS, Gacar G, Ayhan S, Gürol AO, Kasap M. Sıçan Adacık Mikroçevresinde Kültüre Edilen Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İnsülin Üreten Hücrelere Farklılaşma Potansiyeli. 45. Ulusal Diyabet Kongresi, SS02, s124, 20-24 Mayıs 2009, Antalya.

15. Karaöz E, **Aksoy A**, Okçu A, Genç ZS, Ayhan Demircan PÇ, Kasap M. Streptozotosin ile Hasar Oluşturulmuş Sıçan Pankreatik Adacık Mikroçevresinde Kültüre Edilen Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İnsülin Üreten Hücrelere Farklılaşma Potansiyeli. TÜBA IV. Kök Hücre Sempozyumu (Current Perspective on Stem Cell Biology and Challenges in Clinical Implications), 26-27 Haziran 2009, Ankara.

16. Karaöz E, Okçu A, **Aksoy A**, Ayhan S, Demircan PÇ, Gacar G. İki Farklı Teknik (Konvansiyonel ve Gradyent) ile İzole Edilmiş Sıçan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmunofenotipik, Çoğalm ve Apoptoza Direnç Özelliklerinin Karşılaştırılması Olarak İncelenmesi. THD 35. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s: 41. Antalya 2009.

17. Karaöz E, **Aksoy A**, Genç ZS, Okçu A, Ayhan S, Gacar G. Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İnsülin-Üreten Hücrelere Farklılaşma Potansiyeli. THD 35. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s: 42. Antalya 2009.

18. Genç ZS, Karaöz E, Sağlam Ö, Gacar G, **Aksoy A**, Kasap M. Kemik İliği, Yağ Dokusu ve Diş Pulpası gibi Farklı İnsan Dokularından Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Gen Ekspresyon Profilinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Özet Kitabı, s.167, Bodrum, 2009.

19. Karaoz E, Genç ZS, Demircan PÇ, **Aksoy A**, Duruksu G. sıçan Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile ortak culture edilen adacık işlev ve canlılığının korunması. 46. Ulusal Diyabet Kongresi, SS03, s68-70, 12-16 Mayıs 2010, Antalya.
20. **Aksoy A**, Sağlam Ö, Subaşı C, Erman G, Karaöz E. İnsan ve Sıçan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmunofenotipik, Genotipik ve İnce Yapı Özelliklerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. 36 Ulusal Hematoloji Kongresi, Poster No:P009, s36, Kasım 2010, Antalya.
21. Duruksu G, **Aksoy A**, Okçu A, Gacar G, Karaöz E. Mezenkimal Kök Hücrelerine Kalıcı Gen Aktarımında Ön Gösterge Olarak Telomeraz Enzim Aktivitesi Kullanılabilir mi? 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Sempozyumu, OP-10, s64, 29 Eylül-01 Ekim 2010, Samsun.
22. Demircan Çetinalp P, Eker Sarıboyacı A, Genç ZS, Bayazıt G, **Aksoy A**, Subaşı C, Karaöz E. Mezenkimal Kök Hücre Sitokinlerinin Uyarılmış T-Hücreleri Üzerine Parakrin Yolla İmmüno-supressif Etkisi. 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Sempozyumu, OP-21, s70, 29 Eylül-01 Ekim 2010, Samsun.
23. Ertaş G, Ural E, Karaöz K, **Aksoy A**, Kılıç T, Kozdağ G, Vural A, Ural D. Comparative Analysis of Anti-apoptotic Ability of Mesenchymal Stem Cells Isolated From Human Bone Marrow and Adipose Tissue. Türk Kardiyol Dern Arş, Suppl2, 2010, 26. Ulusal Kardiyoloji Kongresi, S101, 21-24 Ekim, İstanbul.
24. **Aksoy A**, Ayhan S, Okcu A, Karaöz E. In vitro differentiation potential of mesenchymal stem cells derived from natal, wisdom, deciduous teeth dental pulp and human bone marrow: A comparative study. 15th Congress of the European Hematology Association Haematologica 2010; 95(S2): 444-445.
25. Duruksu G, **Aksoy A**, Okcu A, Karaoz E. Comparative analysis of telomerase activities of mesenchymal stem cells isolated from different human tissues. Haematologica 2010; 95(S2): 661.
26. Ayhan S, Genç Z, Okcu A, Duruksu G, **Aksoy A**, Karaöz E. In vitro pluripotent properties and characterization of umbilical cord blood mesenchymal stem cells. Haematologica 2010; 95(S2): 642.
27. Karaöz E, Ayhan S, Okcu A, **Aksoy A**, Bayazıt G, Gurol A, Duruksu G. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells co-cultured with pancreatic islets display beta-cell plasticity. Haematologica 2010; 95(S2): 662.

- 28.** Ercan E, Guven A, **Aksoy A**, Gacar G, Ayhan S, Karaoz E. Protection of Stem Cells from H₂O₂ Induced Apoptosis by Erythropoietin in Vitro. 5th World Congress on Preventive & Regenerative Medicine, P16, pp23, October 5-7, 2010, Hannover, Germany.
- 29.** Karaöz E, Arıkan S, **Aksoy A**, Genç ZS, Ayhan S, Adas M, Adas G, Duruksu G. Molecular and Immunophenotypic Characterization of Isolated Human Parathyroid Gland Mesenchymal Stem Cells. 5th World Congress on Preventive & Regenerative Medicine, P13, pp23, October 5-7, 2010, Hannover, Germany.
- 30.** Eker Sarıboyacı A, Çetinalp Demircan P, Unal ZS, Erman G, **Aksoy A**, Karaoz E. Immunomodulatory and Immunosuppressive Properties Of Rat Pancreatic Islet Derived Stem Cells Co-Cultured with Rat Spleen CONA-CD3+T Cells, 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Application Conference, P43, 7-9 Ekim, 2011, Kayseri/TÜRKİYE.
- 31.** Erman G, Duruksu G, **Aksoy A**, Öncel B, Gacar G, Karaöz E, FACS analyses of human adult stem cells from various tissues: identification of distinctive immunophenotypic markers, 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Application Conference, P55, 7-9 Ekim, 2011, Kayseri/TÜRKİYE.
- 32.** Karaöz E, Okçu A, **Aksoy A**, Subaşı C, Unal ZS, Duruksu G. Transplanted Mesenchymal Stem Cells Home into Pancreatic Islets But Do Not Improve Effectively Glisemia. IDF 2011 World Diabetes Congress, P1578, 4-8 December 2011, Dubai, United Arab Emirates.
- 33.** Çakıcı C, Buyrukçu B, **Aksoy A**, Haliloğlu A, Duruksu G, Uludağ O, Oymaker A, Işık A, Subaşı C, Karaöz E, İnfertil erkek sıçanlarda adipoz doku kaynaklı MKH'lerin testise enjeksiyonu ile sperm elde edilmesi, 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi, OP-8, S170, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sakarya.
- 34.** **Aksoy A**, Subaşı C, Ünal ZS, Mehtap Ö, Erman G, Karaöz E, Sağlıklı ve multiple myeloma olgularının kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik farklılaştırma potansiyelinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi, 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi, OP-19, S181, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sakarya.
- 35.** Duruksu G, **Aksoy A**, Okçu A, Köse GT, Karaöz E. İleri Derece Uzun Süreli Kültürün Sıçan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler Üzerindeki Etkilerinin Ayrıntılı İncelenmesi, 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi, PP-29, S218, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sakarya.

36. Candan A, Özgöçmen M, **Aksoy A**, Özatik O, Öncü M, Karaöz E. Valproik Asitin Rat Mezenkimal Kök Hücrelerinde Hücre Morfolojisi Ve Mmp-9 Ekspresyonu Üzerine Etkisi, 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi, PP-33, S222, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sakarya.
37. **Aksoy A**, Akkoç T, Erman G, Subaşı C, Okçu A, Oğulur I, Gürhan G, Barlan I, Karaöz E. A comparison of Isolation Methods for Mouse Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow. Molecular Immunology & Immunogenetics Congress, PP-84, 2012, Antalya, Turkish Journal of Immunology, Supplement (Molecular Immunology & Immunogenetics Congress-Abstract Book), 2012.
38. **Aksoy A**, Subaşı C, Ünal ZS, Mehtap Ö, Erman G, Karaöz E. Sağlıklı Ve Multiple Myeloma Olgularının Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Osteojenik Farklılaştırma Potansiyelinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi, 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, s43, 31 Ekim- 3Kasım 2012, Antalya.
39. Öğülür İ, Gürhan G, **Aksoy A**, Duruksu G, Filinte D, Barlan I, Karaöz E, Akkoç T, İ.V ve İ.P Uygulanan Mezenkimal Kök Hücrelerin (MKH) Akut Astım Fare Modeli Üzerine Etkisi, III. Kök Hücre Sempozyumu, s02, 30Kasım-1Aralık 2012,Marmara Üniversitesi, İstanbul.
40. Karaöz E, Şimşek T, Okçu A, **Aksoy A**, Duruksu G, Erman G,Cantürk NH, Utkan NZ, Tiroidektomi Sonrası Hormon Replasmanı Yapılmamış Ratların Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin İmmunofenotipik, İmmunogenetik, Yapısal ve Telomeraz Enzim Aktivite Özelliklerinin İncelenmesi, III. Kök Hücre Sempozyumu, s10, 30Kasım-1Aralık 2012, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
41. Öğülür İ, Gürhan G, **Aksoy A**, Subaşı C, Filinte D, Barlan I, Karaöz E, Akkoç T,Mezenkimal Kök Hücrelerin Kronik Astım Fare Modeli Üzerine Etkisi, III. Kök Hücre Sempozyumu, P-03, 30Kasım-1Aralık 2012, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
42. Gürhan G, Öğülür İ,**Aksoy A**, Subaşı C, Duruksu G, Filinte D,Barlan I, Karaöz E, Akkoç T,Fare Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (fKİ-MKH) İntranasal (İ.N.) Yolla Uygulanmasının Akut Astım Fare Modeli Üzerine Etkisi, III. Kök Hücre Sempozyumu, P-04, 30Kasım-1Aralık 2012, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
43. **Aksoy A**, Akkoç T, Erman G, Subaşı C, Okçu A, Oğulur İ,Gürhan G, Barlan I, Karaöz E,Fare Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyon Yöntemlerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi, III. Kök Hücre Sempozyumu, P-05, 30Kasım-1Aralık 2012,Marmara Üniversitesi, İstanbul.

44. Kasap M, Akpınar G, Yabas A, Karaoz E, **Aksoy A**. A Putative Modified Form Of Parkin May Be Expressed By Human Bone Marrow Drived Mesenchymal Stem Cells. The 11th International Conference On Alzheimer's & Parkinson's Diseases, AD/PD 2013, Florence, Italy, March 6-10, 2013.
45. Ögölür İ, Gürhan G, **Aksoy A**, Duruksu G, Filinte D, Kombak E, Barlan IB, Karaöz E, Akkoç T, Fare Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Akut Astım Fare Modelinde Dendritik Hücrelerin Aktivasyonu Üzerine Etkisi, XX. Ulusal Allerji & Klinik İmmünoloji Kongresi, P-156, 02-06 Kasım 2013, Antalya.
46. Ögölür İ, Gürhan G, **Aksoy A**, Subaşı C, Barlan IB, Karaöz E, Akkoç T. Kompakt Kemik Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kronik Astım Modeli Geliştirilmiş BALB/C Farelerde Akciğer Histopatolojisi ve Sitokin Düzeyi Üzerine Etkisi, XX. Ulusal Allerji & Klinik İmmünoloji Kongresi, P-157, 02-06 Kasım 2013, Antalya.
47. Karaöz E, **Aksoy A**, İnci Ç, Ünal ZS, Duruksu G. Deneysel tip 1 diyabet geliştirme modeli. 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Kongresi, PP-29, S-02, 20 Mart-23 Mart 2014, Kocaeli.
48. Umar İ, Yalçın M, **Aksoy A**, Karaöz E. Pulpa Kuafaj Materyallerinin Diş Pulpası Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi. 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Kongresi, PP-08, S-46, 20 Mart-23 Mart 2014, Kocaeli.
49. Karaöz E, **Aksoy A**, Yusufoglu S, İnci Ç, Sağlam Ö, Erman G. Tip 1 Diyabetik ve Sağlıklı Hastalardan Elde Edilen CD4+ ve CD8+ T Hücrelerinin İnsan Beta Hücrelerine Etkisi. 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Kongresi, PP-51, S-67, 20 Mart-23 Mart 2014, Kocaeli.
50. **Aksoy A**, Allahverdiyev A, Duruksu G, Subaşı C, Mehtap Ö, Erman G, Karaöz E. Sağlıklı ve Multiple Myeloma Olgularının Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Osteojenik Farklılaşma Potansiyelinin Karşılaştırılması olarak İncelenmesi. 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Kongresi, PP-56, S-70, 20 Mart-23 Mart 2014, Kocaeli.

Proje

1. Bursiyer Deneysel balb/c ova-astım modelinde kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin astım üzerine etkisinin araştırılması. TÜBİTAK110S368.(2011-2013).

2. Bursiyer Pankreatik Adacık Neogenezinden Sorumlu Genlerin (MafA, Ngn3, Pax4) Öncül Kök Hücrelere Aktarılmasıyla Fonksiyonel İnsülin Üreten Hücrelerin Eldesi ve Doku Mühendisliği Yaklaşımı. TÜBİTAK 112S125. (2014)

3. Araştırmacı Deneysel İn Vitro Tip 1 Diyabet Geliştirme Modeli. KOU-NOVO NORDİSK-(2011-2013)

ÖDÜLLERİ

1. Türk Diyabet Vakfı Diabetes Mellitus 2009 Yılı En İyi Bilimsel Proje Destek Ödülü 1.si.Karaöz E, Sarıboyacı AE, Gacar G, Kasap M, Ayhan S, **Aksoy A**, Genç ZS, Okcu A, Demircan PÇ, Bayazıt G, Sağlam Ö. Sıçan Pankreatik Adacık Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Antijen Sunma Özelliklerinin Araştırılması.

2. 35. Ulusal Hematoloji Kongresi, Deneysel Hematoloji En İyi Bildiri.

Karaöz E, Ayhan S, Okçu A, **Aksoy A**, Bayazıt G, Gürol AO. Pankreatik Adacıklar ile Doğrudan Ko-Kültüre Edilen Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İnsülin-Üreten Hücrelere Farklılaşma Potansiyeli. THD 35. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Kitabı. s:86, Antalya 2009.

3. 35. Ulusal Hematoloji Kongresi, Genç Katılımcı Ödülü.

Aksoy A, Okçu A, Ayhan S, Sarıboyacı AE, Karaöz E.İnsan Kemik iliği, natal, süt ve yirmi yaş, diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşma potansiyelinin nicesel olarak incelenmesi: Karşılaştırmalı bir çalışma. THD 35. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s: 90-1. Antalya 2009.

4. Türk Diyabet Vakfı Diabetes Mellitus 2010 Yılı En İyi Bilimsel Proje Destek Ödülü 1.si.

Karaöz E, Ayhan S, **Aksoy A**, Genç ZS. Mezenkimal kök hücrelerin in vivo koşullarda pankreatik adacık canlılığı ve işlevi üzerine etkisi.

5. Türk Diyabet Vakfı Diabetes Mellitus 2010 Yılı En İyi Bilimsel Yayın Ödülü 2.si.

Karaoz E, Ayhan S, Gacar G, **Aksoy A**, Duruksu G, Okçu A, Demircan PÇ, Sarıboyacı AE, Kaymaz F, Kasap M. Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics. Cytotherapy12(3): 288-302, 2010.

- 6.** Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Sempozyumu, Sözlü Bildiri Ödülü 2.si.
Duruksu G, **Aksoy A**, Okçu A, Gacar G, Karaöz E. Mezenkimal Kök Hücrelerine Kalıcı Gen Aktarımında Ön Gösterge Olarak Telomeraz Enzim Aktivitesi Kullanılabilir mi? 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Sempozyumu, OP-10, s64, 29 Eylül-01 Ekim 2010, Samsun.
- 7.** Türk Diyabet Vakfı Diabetes Mellitus 2011 Yılı En İyi Bilimsel Yayın Ödülü 1.si.
Karaöz E, Genç ZS, Demircan PÇ, **Aksoy A**, Duruksu G. Protection of Rat Pancreatic Islet Function and Viability by Coculture with Rat Bone-Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. Cell Death Dis., 2010 Apr 22;1(4):e36.
- 8.** Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi Sözlü Bildiri Ödülü 1.si
Çakıcı C, Buyrukçu B, **Aksoy A**, Haliloğlu A, Duruksu G, Uludağ O, Oymaker A, Işık A, Subaşı C, Karaöz E. İnfertil Erkek Sıçanlarda Adipoz Doku Kaynaklı MKH'lerin Testise Enjeksiyonu İle Sperm Elde Edilmesi, 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Kongresi, OP-8, S170, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sakarya.
- 9.** 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Application Conference Genç Aratırmacı Ödülü
Eker Sarıboyacı A, Çetinalp Demircan P, Unal ZS, Erman G, **Aksoy A**, Karaöz E. Immunomodulatory and Immunosuppressive Properties of Rat Pancreatic Islet Derived Stem Cells Co-Cultured with Rat Spleen ConA-CD3+T Cells, 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Application Conference, P43, 7–9 October, 2011, Kayseri/TÜRKİYE.
- 10.** 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, Genç Katılımcı Ödülü.
Aksoy A, Subaşı C, Ünal ZS, Mehtap Ö, Erman G, Karaöz E. Sağlıklı Ve Multiple Myeloma Olgularının Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Osteojenik Farklılaştırma Potansiyelinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi, 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, s43, 31 Ekim- 3Kasım 2012, Antalya.
- 11.** 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, Genç Katılımcı Ödülü.

Mehtap Ö, Gacar G, **Aksoy A**, Ateşoğlu EB, Tarkun P, Erman G, Can B, Hacıhanefioğlu A, Karaöz E. KLL'de Treg Hücreleri: Bozuk İşlev ve Yüksek CD39 İfadesi, 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, s9, 31 Ekim- 3Kasım 2012, Antalya.

12. III. Kök Hücre Sempozyumu Sözlü Bildiri 3.sü

Öğülür İ, Gürhan G, **Aksoy A**, Duruksu G, Filinte D, Barlan I, Karaöz E, Akkoç T, İ.V. ve İ.P. Uygulanan Mezenkimal Kök Hücrelerin (MKH) Akut Astım Fare Modeli Üzerine Etkisi, III. Kök Hücre Sempozyumu, s02, 30Kasım-1Aralık 2012,Marmara Üniversitesi, İstanbul.

13. Türk Diyabet Vakfı Diabetes Mellitus 2013 Yılı En İyi Bilimsel Proje Destek Ödülü 2.si.

Karaöz E, İnci Ç, Okçu A, **Aksoy A**. Pankreatik Adacıklardan İzole Edilen Beta Hücrelerine Çeşitli Sitokin Kokteyllerinin Etkisinin İn Vitro Koşullarda Araştırılması.