T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

İNSAN ADİPOZ DOKU VE KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İN-VİTRO KOŞULLARDA DENEYSEL APOPTOZA YANITLARI: KARŞILAŞTIRMALI ÇALIŞMA

Dr.Gökhan ERTAŞ

Kardiyoloji uzmanlık tezi

2010

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

İNSAN ADİPOZ DOKU VE KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İN-VİTRO KOŞULLARDA DENEYSEL APOPTOZA YANITLARI: KARŞILAŞTIRMALI ÇALIŞMA

Dr.Gökhan ERTAŞ

Tez danışmanı: Prof. Dr. Ertan Ural

Ana bilim dalı başkanı: Prof. Dr. Dilek Ural

Kardiyoloji uzmanlık tezi

2010

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **ii**
TABLO DİZİNİ ..... **iii**
ŞEKİL DİZİNİ ..... **iv**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
ÖZET ..... **vii**
1- AMAÇ VE KAPSAM 1
2- GENEL BİLGİLER 3
3- GEREÇ VE YÖNTEM 18
4- BULGULAR 24
5- TARTIŞMA 39
6- SONUÇLAR 42
7- KAYNAKLAR 43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ:

ACEI: Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü

AIF: Apoptosis inducing factor

Akt: Akt proteini kodlayan gen

AMİ: Akut miyokart infaktüsü

ARB: Anjiyotensin reseptör blokeri

BVP: Biventriküler pacemaker

KABG: Koroner arter baypas operasyonu

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

FBS: Fetal Bovine Serum

G-CSF: Granülosit-koloni stimulan faktör

hAT: Human adipose tissue

hBM: Human bone marrow

HSSS: Hank's balanced salt solüsyonu

H_2O_2: Hidrojen peroksit

ICD: İntrakardiyak defibrilatör

IAP: Inhibitors of Apoptosis

iAD-MKH: İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler

iKİ-MKH: İnsan kemik iliği mezenkimal kök hücreler

LVEF: Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu

LVES: Sol ventrikül end-sistolik çap

MKH: Mezenkimal kök hücre

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

RAS: Renin anjiyotensin sistemi

PBS: Phosphate-buffered saline

PTKA: Perkütan transluminal koroner anjiyoplasti

SDF-1: Stromal-cell-derived faktör 1

SH: Standart hata

TNRF-1: Tumor nekrozis faktör reseptörü-1

TUNEL: Terminal deoxytransferase mediated bio-dUTP nick end labeling

VT: Ventriküler taşikardi

TABLO DİZİNİ

Tablo-1. Kök hücre tipleri. 4
Tablo-2. Nekrozis ve apoptozisin karşılaştırılması. 12
Tablo-3. Kardiyovasküler hastalıklarda apoptozis. 15
Tablo-4. MKH' lerin immünohistokimyasal özellikleri. 28

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil-1. Kök hücre uygulama yöntemleri. 7
Şekil-2. İnsan kemik iliği aspiratlarından ficoll gradiyent yöntemiyle elde edilmiş MKH'lerin P0 7. gün (A), P3 6. gün (B), P6 6. gün (C) ve P7 10. gün'lerdeki (D) faz-kontrast mikroskopik görünümleri. Hücreler iğsi şekilli fibroblast-benzeri ve düz-yassı olmak üzere tipik MKH morfolojileri göstermekte (BÜYÜTME: A,C,D-X200; B-X100). 24
Şekil-3. İnsan kemik iliği aspiratlarından ficoll gradiyent yöntemiyle elde edilmiş MKH'lerin P0 7. gün (A), P3 6. gün (B), P6 6. gün (C) ve P7 10. gün'lerdeki (D) faz-kontrast mikroskopik görünümleri. Hücreler iğsi şekilli fibroblast-benzeri ve düz-yassı olmak üzere tipik MKH morfolojileri göstermekte (BÜYÜTME: A,C,D-X200; B-X100). 25
Şekil-4. P(5)'deki insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin akım sitometri cihazında elde edilen verileri 26
Şekil-5. P(5)'deki insan adipoz doku mezenkimal kök hücrelerinin akım sitometri cihazında elde edilen verileri. 27
Şekil-6. Kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı MKH'lerinin serumlu besiyerindeki kültürü sonrasında MTT testi ile analiz edilmiş absorbans değerleri (hAT: Human adipose tissue hBM: Human bone marrow). 30
Şekil-7. MKH'lerin serumdan yoksun besiyerindeki kültüründe indüklenmiş apoptozisin MTT testi ile analiz sonrasındaki absorbans değerleri (hAT: Human adipose tissue hBM: Human bone marrow). 31
Şekil-8. MKH'lerin serumdan yoksun kültürde indüklenmiş apoptozisin kontrol grubuyla karşılaştırmalı MTT testi sonrasında analiz edilmiş absorbans değerleri (hAT: Human adipose tissue hBM: Human bone marrow). 31
Şekil-9. Kaspaz-3 ile boyanan kontrol grubu hücrelerinin ışık mikroskopik görünümleri. (**A-B)** iAD-MKH– kontrol grubu. **(C-D)** iKİ-MKH – kontrol grubu (Bar çubuğu: 50 µm). 32
Şekil-10. (A-B) iAD-MKH + H_2O_2 ve **(C-D)** iKİ-MKH + H_2O_2 gruplarına ait hücrelerin kaspaz-3 ile immünohistokimyasal olarak boyanması sonrasında kök hücrelerin ışık mikroskopik görüntüleri. Aynı miktar ve sürede H_2O_2 'e maruz kalmış iAD-MKH'lerinde erken apoptoz belirtisi gösteren hücre yoğunluğunun iKİ-MKH'lere oranla belirgin şekilde az olduğu gözlenmektedir (Bar çubuğu: 50 µm). 33
Şekil-11. Kontrol iAD-MKH'lerin annexin V ile boyanması sonrası akım sitometri aygıtında elde edilen verileri. Bu örnekte canlı hücre oranı % 89.35 dir. 34

Şekil-12. Kontrol iKİ-MKH'lerin annexin V ile boyanması sonrası akım sitometri aygıtında elde edilen verileri. Bu örnekte canlı hücre oranı % 88.23 dür. 35
Şekil-13. H2O2 ile 45 dakika süreyle inkübe edildikten sonra apoptoz oranlarını belirlemek için annexin V ile boyanması sonrası iAD-MKH'lerin akım sitometri aygıtında elde edilen verileri. Bu örnekte canlı hücre oranı % 73.85 'dür. 36
Şekil-14. H2O2 ile 45 dakika süreyle inkübe edildikten sonra apoptoz oranlarını belirlemek için annexin V ile boyanması sonrası iKİ-MKH'lerin akım sitometri aygıtında elde edilen verileri. Canlı hücre oranı % 59.42 'dür. 37
Şekil-15. 2 mmol/L H_2O_2 ile indüklenen apoptozis sonrası MKH'lerin canlılık yüzdelerinin ortalaması. Görüldüğü gibi, adipoz doku kaynaklı MKH'lerin deney sonrası canlılık oranları kemik iliği kaynaklı MKH'lere oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazladır ($p<0.002$).....38

TEŞEKKÜR

Üniversitemizin kurulması ve geliştirilmesinde büyük emeği olan, kliniğimizin kurucusu, merhum Prof. Dr. Baki Komsuoğlu hocamızı saygıyla anıyorum. Öncelikle, asistanlığım süresince engin deneyimi ve bilgi birikimi ile yönlendirme ve desteklerini benden esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Dilek Ural'a; eğitimim ve tez çalışmalarım esnasında sabır ve ilgiyle destek ve katkılarını benden esirgemeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Ertan Ural'a;

Deneysel çalışmalarımı yürütebilmem için bana gerekli olanakları tanıyan, deneyimi ve yol göstericiğiyle tez çalışmalarımda destek ve yardımlarını esirgemeyen Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM) müdürü sayın Prof. Dr. Erdal Karaöz'e;

Eğitimime değerli katkıları olan ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum öğretim üyeleri sayın Doç. Dr. Ahmet Vural, Doç. Dr. Güliz Kozdağ, Doç. Dr. Ayşen Ağaçdiken, Doç. Dr. Göksel Kahraman, Doç. Dr. Tayfun Şahin, Yrd. Doç. Dr. Teoman Kılıç, Yrd. Doç. Dr. Ulaş Bildirici'ye; Kalp Damar Cerrahisi ve Dahiliye Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine; eğitimim boyunca çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma; çalışmalarım sırasında hep desteklerini gördüğüm Kardiyoloji kliniği hemşireleri, personeli ve KÖGEM çalışanlarına;

Bugünlere gelmemde sonsuz destek ve sevgileriyle hep yanımda olan annem, babam ve kardeşlerime minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Gökhan Ertaş
Nisan-2010/Kocaeli

İnsan Adipoz Doku ve Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İn-Vitro Koşullarda Deneysel Apopitoza Yanıtları: Karşılaştırmalı Çalışma

Amaç: Kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (MKH) kök hücre tedavisi için ilgi çekici kaynaklar olarak algılanmıştır. Klinik çalışmalarda infarktüslü kalpte adipoz doku kaynaklı MKH'ler doğrudan kemik iliği kaynaklı MKH'lerle karşılaştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı insan kemik iliği ve adipoz dokudan elde edilen MKH'lerin in-vitro apopitozise olan dirençlerini karşılaştırmaktır.

Metot: Çalışmamızda, MKH'lerin anti-apopitotik yanıtlarını hidrojen peroksit (H_2O_2) ve serum eksikliği ile oksidatif stresi uyararak araştırdık. Sonuçlar MTT ve flow (akış) sitometri ile değerlendirildi. Bütün deneyler en az 3 defa olacak şekilde tekrar edildi. Sonuçlar ortalama ± SH olarak sunuldu.

Bulgular: Akış sitometri ve MTT analizi, adipoz doku kaynaklı MKH'lerin kemik iliği kaynaklı MKH'lere göre 1. ve 4. günde H_2O_2 ile uyarılmış apoptozise (n=3, iAD-iKİ canlılık sırasıyla, 73.02±1.44-58.43±1.24 p=0.002) ve serum eksikliği ile uyarılmış apoptozise (n=3, iAD-iKİ absorbans değerleri sırasıyla, 1.gün 0.305±0.027–0.234±0.015, P=0.042, 4.gün 0.355±0.003-0.318±0.007, P=0.011, 7.gün 0.400±0.017-0.356±0.008, P=0.081) daha dirençli olduğunu gösterdi. Adipoz doku kaynaklı MKH'ler 2 mmol/L H_2O_2 ile uyarılmış oksidatif strese daha dayanıklı olduğu ve serumdan yoksun kültürde de anti-apoptotik yeteneğinin üstün olduğu saptanmıştır.

Sonuç: Klinik uygulamalarda adipoz doku kaynaklı MKH'lerin kemik iliği kaynaklı MKH'lere iyi bir alternatif olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar kelimeler: İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler; İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler; Apoptozis.

In-Vitro Anti-Apoptotic Ability of Mesenchymal Stem Cells Isolated From Human Bone Marrow And Adipose Tissue: Comparative Study

Aim: Mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from bone marrow (BM) and adipose tissue (AT) are perceived as attractive sources of stem cells for cell therapy. AT derived cells in the infarcted heart have never been compared directly to BM derived MSCs in clinical trials. The aim of this study was to compare MSCs from BM and AT for their resistance to in-vitro apoptosis.

Methods: In our study, we investigated the anti-apoptotic ability of MSCs toward oxidative stress induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) and serum deprivation. Results were assessed by MTT and flow cytometry. All experiments were repeated a minimum of three times. Data are presented as mean ± SE.

Results: Flow cytometry and MTT analysis revealed that AT-MSCs exhibited a higher resistance toward H_2O_2 induced apoptosis (n=3, hBM-hAT viability respectively, 73.02±1.44-58.43±1.24 p=0.002) and to serum deprivation induced apoptosis at day 1 and 4 than the BM-MSCs (n=3, hAT-hBM absorbance respectively, day 1 0.305±0.027–0.234±0.015, P=0.042, day 4 0.355±0.003-0.318±0.007, P=0.011, day 7 0.400±0.017-0.356±0.008, P=0.081). AT-MSCs showed superior tolerance to oxidative stress triggered by 2 mmol/L H_2O_2 and also have superior anti-apoptosis capacity toward serum-free culture.

Conclusion: AT-MSCs could be a good source as an alternative to BM-MSCs and should be considered for clinical applications.

Key words: Human bone marrow derived mesenchymal stem cells; Human adipose tissue derived mesenchymal stem cells; Apoptosis.

1. AMAÇ VE KAPSAM

Modern kardiyolojideki gelişmelere rağmen akut miyokart infaktüsü (AMİ) sonrası önemli miktarda miyokart hasarı meydana gelmektedir. Bireylerin büyük çoğunluğu kısıtlı kaliteyle yaşamını sürdürürken bir kısmıda organ yetersizliği nedeniyle yaşamını yitirmektedir. Yalnızca ABD'de 80 milyon insanda kardiyovasküler hastalık mevcuttur ve ortalama olarak 36 saniyede bir insan kalp hastalıkları nedeniyle yaşamını yitirmektedir [1]. Mevcut tedavi seçeneklerine rağmen son dönem hasta grubu yalnızca kardiyak transplantasyon ile tedavi edilebilmektedir. Bu tedavi yönteminde uygun donör organ bulma problemi ile karşılaşmaktayız. Klasik bilgilerimiz arasında kalp kasınında iskelet kası gibi rejenerasyon yeteneğinin olmadığı şeklindeydi. Son zamanlarda yapılmış çalışmalarda erkek (XY kromozomu) bir hastanın dişi (XX kromozomu) bir vericiden kalp aldığı olgularda postmortem incelemelerde erkek alıcıların kalp biyopsi örneklerinde Y-kromozomuna sahip olan kardiyomiyositler saptanmıştır [2-4]. XX ve XY kromozomu taşıyan miyositlerin birlikte bulunması "kardiyak kimerizm" olarak adlandırılmıştır. Kök hücre nakli, kardiyovasküler araştırma alanları arasında en umut verici olanlardan biridir ve gelecek yıllarda kardiyovasküler hastalıkların tedavi yöntemleri arasına girmeye adaydır. Günümüzde AMİ sonrası yeniden şekillenmenin önlenmesi, kronik kalp yetersizliği, kronik iskemik kalp hastalığı gibi durumların tedavisinde kullanılmaktadır. Kök hücreleri diğer hücrelerden (kas, kan, sinir hücresi gibi…) ayıran temel özelliklerden biri bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahip olmalarıdır. Kök hücreler herhangi bir dokuya özgün işlevleri yerine getirebilecek yapıya sahip olmadıklarından, birden fazla hücre tipine farklılaşarak özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilirler. Kök hücre tedavisindeki gelişmelere rağmen yanıt bekleyen birçok soru mevcuttur. Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde hangi hücrenin en fazla yarar sağlayacağı da cevap bekleyen sorular arasındadır. Miyokart infaktüsü sonrası gelişen skar dokusuna enjekte edilen hücrelerin birbirine üstünlüğünü gösterecek net bir çalışma mevcut değildir. Ayrıca, miyokart infaktüsü sonrası skar dokusuna enjekte edilen hücrelerin ikinci bir miyokart infaktüsüne veya apoptozise karşı nasıl yanıt vereceği çok açık değildir. Apoptozisin (programlanmış hücre ölümü) kalp yetersizliği, dilate kardiyomiyopati ve hiberne miyokart gibi kardiyovasküler durumların patofizyolojisindeki yeri yeterince bilinmektedir [5-6].

Erişkin mezenkimal kök hücreleri embriyo veya fetustan elde edilen kök hücreler ile karşılaştırıldığında elde edilmesi ve kullanımı daha kolay olan hücrelerdir. Ayrıca değişik

mezenkimal kaynaklardan elde edilen hücrelerde farklı karakteristik özelliklere sahiptir. Kemik iliği ve adipoz dokudan elde edilen kök hücreler son zamanlarda kök hücre tedavisi için popüler hale gelmiştir. Bu çalışmanın amacı kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan insan kemik iliği ve adipoz dokusundan elde edilmiş kök hücrelerin apoptozise yanıtını ve direncini in-vitro ortamda araştırmaktır. Bu sayede, kök hücre tedavisinde tercih edilebilecek ideal hücreyi bulmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Kök Hücre ve Kardiyovasküler Hastalıklar

Günümüzde kalp yetersizliğinde terapötik yaklaşım semptomu olan uygun hasta grubuna digoksin, diüretik, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEI), anjiyotensin reseptör blokerleri (ARB), beta blokerler, aldosteron antagonistlerinin verilmesi ve uygun hastalarda biventriküler pacemaker (BVP) ve/veya intrakardiyak defibrilatörlerin (ICD) kullanılmasına dayanır. Farmakolojik ve invaziv tedaviye rağmen kalp yetersizliğinde yüksek mortalite ve morbidite oranları gözlenmektedir [7]. Bu yüzden kalp yetersizliği başta olmak üzere kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için yeni alternatif tedavilere ihtiyaç duyulmuştur. Nekroze hücrelerin veya görev yapmayan hücrelerin bulunduğu bölgeye kök hücrelerin bölgesel olarak ekilmesi mantıklı ve orijinal bir tedavi yöntemi olarak gözükmektedir. Miyokart infarktüsü sonrası hasarlanmış kardiyomiyositlerin yerini fibröz skar dokusu alır. Fibröz skar dokusu ventriküler fonksiyon kaybını tetikleyerek fibroblast proliferasyonu sonucu sol ventrikül dilatasyonu ve yeniden şekillenmeye yol açmaktadır [8,9]. Bu yüzden kardiyomiyositlere dönüşebilecek kök hücre tedavileri uygulanmaya başlanmıştır. Kök hücreleri temel olarak iki başlık altında toplayabiliriz; embriyonik kökenli kök hücreler ve erişkin kaynaklı mezenkimal kök hücreler (MKH).

İnsan embriyonik kök hücreleri blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilir ve pluripotent özelliğe sahiptirler. Pluripotent hücreler vücuttaki bütün dokulara kaynaklık edebilirler fakat kendilerinden yeni bir birey meydana gelmez. Erişkin kaynaklı mezenkimal kök hücreler multipotent özelliğe sahiptirler. Multipotent hücreler yer aldıkları dokunun hücre tiplerine dönüşebilirler. Embriyonik kök hücrelerin kardiyak hasar tedavisinde kullanılabilmesi için kardiyomiyositlere dönüştürülmesi gerekmektedir. İn-vitro ortamda embriyonik kök hücrelerin kardiyomiyositlere dönüşmesi kardiyomiyositlerle co-culture yapılarak başarılmıştır [10,11]. Sıçan embriyonik kök hücreleri in-vivo ortamda miyokart infarktüsü sonrası hasarlı miyokardın tedavisinde test edilmiştir. Miyokart infaktüsünden 8 hafta sonra sıçanlara enjekte edilen hücrelerin miyokartla bütünleştiği ve fonksiyonel yararın kök hücre enjeksiyonundan 3 hafta sonra gözlendiği bildirilmiştir [12]. Ayrıca insan kaynaklı embriyonik kök hücreler de in-vivo ortamda test edilmiştir. İletim bozukluğu mevcut olan bir domuzda insan embriyonik kök hücrelerinin miyokart ile bütünleştiği ve pacemaker aktivitesi gösterdiği saptanmıştır [13]. Bunun yanında insan embriyonik kök hücrelerinin dezavantajları

da mevcuttur. İnsan embriyonik kök hücreleri allojenik orijinli olması nedeniyle alıcının immün sisteminde rejeksiyona neden olabilirler. Embriyonik kök hücrelerin kullanımı etik olarak halen tartışmalıdır. Son olarak da farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerin tümöre neden olduğu yönünde yayınlar mevcuttur [14]. Bu yüzden embriyonik kök hücrelerin kardiyovasküler tedavide kullanımı için daha fazla çalışmaya ve deneyime ihtiyaç vardır.

Tablo-1. Kök hücre tipleri.

Hücre tipi	**Avantajlar**	**Dezavantajlar**
Embriyonik kök hücre	Pluripotent Kolayca çoğalabilir	Etik konular İmmünojenisite Teratom oluşturma eğilimi Tanımlama belirteçlerinin yokluğu İzole edilmesi güç
Erişkin kök hücre	Etik sorunu yok Kolay elde edilebilir Multipotent (otolog) İnvitro kolayca çoğalabilir	Potansiyel olarak kısıtlı farklılaşma kapasitesi

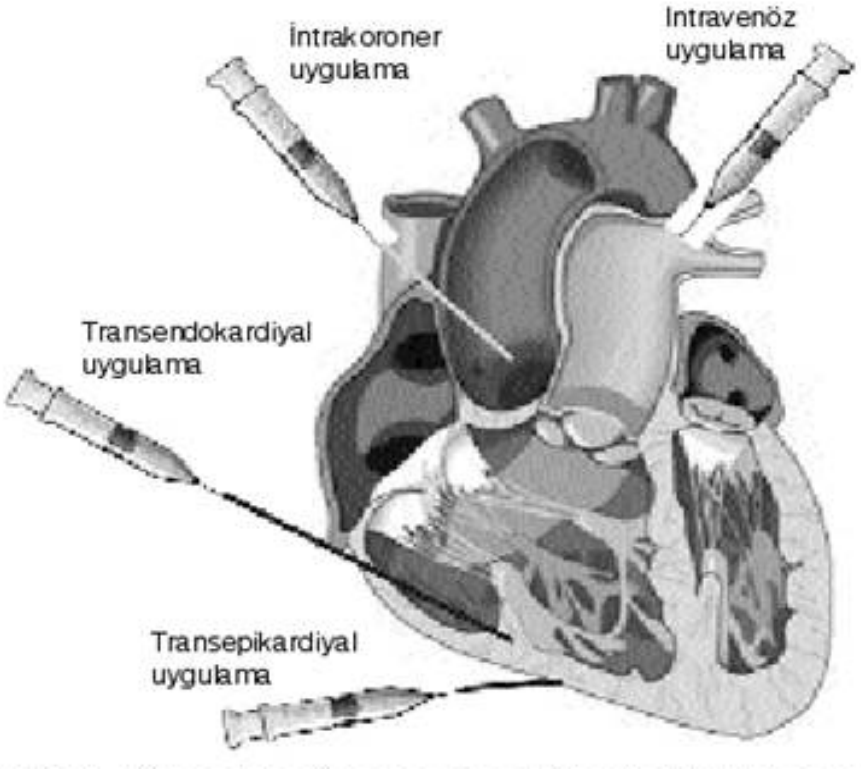
Erişkin kaynaklı kök hücrelerini 3 grup altında toplayabiliriz; kemik iliği kaynaklı kök hücreler, periferik dolaşımda bulunan kök veya progenitor hücreler (çoğunluğu kemik iliği kaynaklı) ve doku kaynaklı kök hücreler (miyoblast gibi). Kemik iliği kaynaklı hücreler günümüze kadar en fazla çalışılmış ve klinik çalışmalarda kullanılmış olan hücre tipidir. Kemik iliği; progenitor hücreler, mezenkimal hücreler, hematopoetik kök hücreler, stromal hücreler gibi karmaşık bir içeriğe sahiptir. Endotel progenitor hücreler ilk olarak Asahara ve ark,nın yaptıkları deneylerle kemik iliği kaynaklı hematopoetik progenitor hücrelerin endotel hücreye embriyonik dönemin dışında da dönüşebildiğini, iskemi sonrası endotel bütünlüğün tekrar sağlanmasında ve yeni kapiller oluşumunda bizzat rol aldıklarını bulması ile tanımlanmışlardır. Endotel progenitor hücreler için ana kaynak periferik kan ve kemik iliğidir. Çeşitli yöntemlerle mononükleer hücrelerden ayrıştırılan endotel progenitor hücreler kültürde üretildikten sonra miyokart tamiri için kullanılmaya başlanmıştır. Endotel progenitor hücreler hematopoetik markerlardan CD133+, CD34+ ve endotelial marker olarak VEGF-reseptör 2 içermesi ile karakterizedir [15]. MKH'ler ilk olarak Friedenstein ve arkadaşları (1966)

tarafından keşfedilmiştir. MKH osteosit, kondrosit, adiposit, miyosit, kardiyomiyosit, fibroblast gibi hücrelere farklılaşabilme özelliğine sahiptir. MKH primer olarak kemik iliğinde bulunduğu gibi adipoz doku, periferik kan, kordon kanı, karaciğer, kıkırdak dokusu, kas dokusu ve fetal dokulardanda izole edilebilir [16,17]. Klinik çalışmalarda kullanılan ilk MKH iskelet kası miyoblastlarıdır. Kasdan alınan biyopsilerden elde edildikten sonra kültür ortamında çoğaltılan hücreler ventrikül duvarına enjekte edilmiştir. Smits ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonucunda altıncı ayda sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda (LVEF) artış sağlanmış fakat miyoblastların beklenmedik bir aritmojenik potansiyele sahip olduğu gözlenmiştir [18,19]. Kök hücre alanında mesafe katedildikçe cevaplanması gereken soru miktarı da artmaktadır. Bunlardan bazıları şunlardır: Kök hücre tedavisi aritmojenik mi, stent restenozunda artışa neden olur mu? Kök hücre tedavisi hangi kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde gözönünde bulundurulmalıdır? Hangi hücre tipleri kardiyovasküler tedavide kullanılmalıdır? Nakledilecek hücrelerin miktarı ne olmalıdır? Fonksiyonel ve morfolojik kardiyak iyileşme aktif mi (kontraktilitenin artması gibi) yoksa pasif mi (yeniden şekillenmenin sınırlandırılması gibi) gerçekleşir? Kök hücre tedavisi güvenli midir, tümör oluşturucu etkileri var mıdır? Kök hücre tedavisinin non-iskemik kalp yetersizlikli hastalarda da faydaları var mıdır?

Kök hücrelerin hasarlı dokuya göçü, hasarlı dokuya yerleşmesi ve hasarlı dokuda fonksiyonel bir hücreye dönüşebilmesi terapötik miyokart naklinin stratejisini oluşturur. İdeal yöntemle hasarlı dokuya yüksek miktarda kök hücrenin ulaştırılabilmesi hedeflenmelidir. Temel kök hücre nakil yöntemleri şunlardır; intrakoroner, transendokardiyal, transepikardiyal, transkoroner-venöz ve intravenöz enjeksiyon sonrası endotel progenitor hücrelerin G-CSF (Granülosit-koloni stimulan faktör) ile mobilizasyonudur (Şekil-1). Transepikardiyal yaklaşımla bu hedefe ulaşabilsek te, yöntemin gerçekleştirilebilmesi için açık kalp cerrahisi gerekmektedir. Koroner arter baypas operasyonu (KABG) sırasında uygulandığında sonuçlara kök hücrenin katkısını değerlendirmek güçleşmektedir. Stamm ve ark, KABG operasyonu sırasında toplam 6 hastaya kemik iliği kaynaklı $CD133^{+}$ progenitor hücrelerin transepikardiyal enjeksiyonunu denemişlerdir. Cerrahiden sonraki üç ve dokuzuncu aylarda değerlendirilen hastaların beşinde LVEF'de ve infarktlı dokuların perfüzyonunda komplikasyonsuz artış sağlamışlardır [20]. Transendokardiyal yaklaşımda, üç boyutlu haritalama yöntemleriyle (NOGA) hasarlı dokunun tespiti sonrasında femoral arterden özel kateterler ile kök hücre enjeksiyonu yapılmaktadır. Perin ve ark, randomize olmayan, prospektif bir çalışmada standart revaskülarizasyon tedavilerine uygun olmayan 14 kronik iskemik kalp yetersizliği hastasına kemik iliği kaynaklı mononükleer hücrelerin transendokardiyal enjeksiyonunun

etkinliğini araştırmışlardır. Dördüncü ayda LVEF'de artış ve sol ventrikül end-sistolik çapta (LVES) azalma sağlanmıştır [21]. Transkoroner venöz enjeksiyon, Transaccess kateter (ucunda ultrason ve enjeksiyon için iğne bulunan özel bir kateter) yardımıyla femoral venden kalbe ulaşılır ve koroner sinüse girilerek kardiyak venlere uygulanır. Siminiak ve ark, canlı miyokart dokusu bulunmayan iskemik kardiyomyopatili dokuz hastaya miyoblast enjeksiyonu ile bu yöntemi denemişlerdir. Altı aylık takip sonrası hastaların hepsinin efor kapasitesinde ve altı hastada LVEF'de %3-8'lik artışlar sağlanmıştır [22]. İntrakoroner enjeksiyon ise yukarıda adı geçen yöntemlere göre daha güvenilir ve kolay bir yöntemdir. Over-the-wire balon kateter yardımıyla kök hücre nakli yapılır. Olası iskemi riski ve kök hücrelerin bir kısmının venöz sisteme dağılması bu yöntemin dezavantajlarıdır. TOPCARE-AMI, REPAIR-AMI, BOOST gibi bu alanda yapılmış büyük çalışmalarda bu yöntem kullanılmış ve sonuçlar yüz güldürücü bulunmuştur [23-25]. Non-invaziv bir tedavi modalitesi olarak, intravenöz G-CSF ile endotel progenitor hücrelerin kemik iliğinden mobilizasyonu sağlanarak miyokardın tamiri planlanmıştır. Bu yöntemin etkinliği AMİ sonrası başarılı primer perkütan transluminal koroner anjiyoplasti (PTKA) yapılan hasta gruplarına G-CSF infüzyonu ile araştırılmıştır. FIRSTLINE-AMI çalışmasında olumlu, STEM-MI ve REVIVAL-2 çalışmalarında olumsuz sonuçlar elde edilmiştir [26-28]. Freyman ve ark, üç farklı kök hücre enjeksiyon yöntemini karşılaştıran randomize bir hayvan deneyi planlamışlardır. İşaretlenmiş mezenkimal kök hücreleri intravenöz, intrakoroner ve transendokardiyal yöntemlerle miyokart infarktüslü deney hayvanlarına enjekte edilmiştir. En fazla hücre tutulumunun intrakoroner enjeksiyon ile sağlandığı saptanmıştır [29]. Yakın zamanda yayınlanmış bir metaanalizde kronik iskemik kalp hastalığı olan hastalara kemik iliği kaynaklı MKH'lerin intrakoroner infüzyonunun LVEF'de anlamlı artışa yol açmadığı, ancak intramiyokardiyal infüzyonunun LVEF'de %5,85'lik (%95 CI, 2.50-9.19, P=0.0006) anlamlı artış sağladığı saptanmıştır [30].

Bununla birlikte, aynı hasta grubunda farklı yöntemleri karşılaştıran klinik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Kök hücre naklinde kullanılması gereken hücre miktarı da tedavinin etkinliğini belirleyecek faktörlerdendir. Tercih edilecek yönteme bağlı olmakla birlikte şimdiye kadar yapılmış klinik çalışmaların bir metaanalizinde $>10^8$ kemik iliği kaynaklı kök hücre miktarı ile LVEF'de anlamlı artış (%95 CI, 3.60, (1.04-6.16), P=0.006) olduğu gösterilmiştir [31]. Bununla birlikte, değişik dozların etkinliğini gösterecek randomize çalışmalara ihtiyaç vardır.



Şekil-1. Kök hücre uygulama yöntemleri.

Kök hücre nakli ile başarılı miyokart tamiri sağlanmasına rağmen kök hücrelerin pro-aritmik potansiyeli ile ilgili endişeler de artmıştır. Menasche ve ark,nın 10 hastaya transepikardiyal yöntemle miyoblast enjekte ettikten sonraki yaptıkları kısa süreli takipte, 4 hastada ICD takılmasını gerektirecek ventriküler taşikardi (VT) atakları gözlenmiştir [32]. Siminiak ve ark, iskemik kardiyomiyopatili dokuz hastanın sekizine işlem öncesi proflaktik amiodarone infüzyonu yaptıktan sonra bütün hastalara transkoroner venöz yöntemle miyoblast enjekte etmişler. Takipte işlem öncesi proflaktik amiodarone alan sekiz hastada anlamlı aritmi izlenmemiş, fakat amiodarone alerjisi nedeniyle proflaktik infüzyon alamayan geçirilmiş ICD öyküsü olan hastada VT nedeniyle iki defa şoklama gerçekleşmiştir [22]. Kök hücre nakli sonrası aritmojenik ortamın hazırlanması şunlara bağlanmaktadır; transplante edilen ve doğal hücrelerin aksiyon potansiyelleri arasındaki heterojenite, enjekte edilen hücrelerin intrinsik aritmi potansiyeli, kök hücre enjeksiyonuyla artan sinir oluşumu, intramiyokardiyal enjeksiyonda ortaya çıkan lokal hasar ve ödem [33]. Klinik çalışmalardan çıkan ilginç sonuçlardan biri de aritmi sıklığının intrakoroner yönteme göre intramiyokardial enjeksiyonlarda daha fazla olmasıdır. İntramiyokardial enjeksiyon sonrası aritmi sıklığında artışta doku hasarı sorumlu olabilir. Fakat doku hasarı ve skar gelişimine yol açan

transmiyokardiyal lazer revaskülarizasyon hastalarında ventriküler aritmi sıklığının artmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle lokal enjeksiyonların elektrofizyolojik heterojeniteyi artırarak aritmi gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir [33].

Katritsis ve ark, geçirilmiş anteroseptal Mİ öyküsü bulunan, klinik olarak sürek olmayan VT atakları ve elektofizyolojik çalışmada VT uyarılması nedeniyle ICD takılma öyküsü bulunan 5 hastaya endotel progenitor hücreler ile kombine edilmiş otolog MKH'leri intrakoroner olarak enjekte ederek, bu hücrelerin elektrofizyolojik etkilerini araştırmışlar. 16-36 aylık takip süresince hastaların ICD kontrollerinde sürekli veya sürekli olmayan VT izlenmemiş. Kök hücre naklinden 12 ay sonra planlanan elektrofizyolojik çalışma kontrolünde iki hastada sürekli VT uyarılmış. Katritsis ve ark, bu çalışma sonucunda endotel progenitor hücreler ve otolog MKH'lerin intrakoroner naklinin aritmi riskini artırmadığını öne sürmüşlerdir [34]. TOPCARE-AMI, REPAIR-AMI, BOOST gibi büyük çalışmalarda kemik iliği kaynaklı mononükleer hücreler intrakoroner enjeksiyon yöntemi ile hastalara nakledilmiş ve takip süresince hastalarda ventriküler aritmi saptanmamıştır [23-25].

Kök hücre ve stent restenozu arasındaki ilişki de ilgi çekici konulardandır. Caplice ve ark, kemik iliğinden alınan kök hücrelerin düz kas hücrelerine dönüşerek aterosklerotik damar duvarının yeniden şekillenmesine katkıda bulunduğunu saptamışlar, ancak yeni plak oluşumuna katkıda bulunduğunu gösterememişlerdir [35]. Endotel progenitor hücrelerin aterosklerotik plak oluşumuna veya progresyonuna katkısı halen tartışmalıdır.

MAGIC çalışmasında (myocardial regeneration and angiogenesis in myocardial infarction with G-CSF and intra-coronary stem cell infusion) AMİ sonrası koroner stent takılan 27 hasta, intrakoroner kök hücre infüzyonu ile birlikte G-CSF alan grup, yalnız G-CSF alan grup ve kontrol grubu olacak şekilde 3 gruba randomize edilmiştir.. Altıncı ayda kök hücre infüzyonu ile birlikte G-CSF alan hastalar diğer gruplarla karşılaştırıldığında, egzersiz kapasitesi, miyokart perfüzyonu ve sistolik fonksiyonlarda artış olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, G-CSF tedavisi alan hastalarda stent restenozunda artış dikkat çekmiştir. G-CSF ile tedavi edilen on hastanın yedisinde stent restenozu saptanması üzerine çalışma erken sonlandırılmıştır [36]. MAGIC çalışmasındaki hasta grubunun uzun dönem takiplerinde ilaç kaplı stent takılan hastalarda stent restenozunun artmadığı saptanmıştır. Başlangıçta görülen stent restenozundaki artış, G-CSF tedavisinin koroner arter stentlenmesinden önce verilmesi nedeniyle çalışma dizaynından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür [37]. Bununla birlikte STEM-MI, FIRSTLINE-AMI, REVIVAL-2 gibi AMİ sonrası koroner stent implantasyonu ile birlikte G-CSF tedavisi alan geniş hasta gruplarında yapılan çalışmalarda stent restenozunda anlamlı artış bildirilmemiştir [26-28]. Assmus ve ark,nın planladıkları retrospektif bir çalışma

ile intrakoroner progenitör hücre infüzyonunun stent restenozuna etkisi araştırılmıştır. AMİ sonrası çıplak metal stent ile başarılı şekilde revaskülarize edilen ve ek olarak intrakoroner progenitör hücre infüzyonu alan 83 hastanın klinik ve invaziv takibi sonrası, stent restenozu ve aterosklerotik plak progresyonunda artış olmadığı gösterilmiştir [38]. Kök hücre ve sitokin tedavileri gibi proanjiyogenik tedavilerdeki en büyük endişelerden biri malign neoplazi veya gizli tümör vaskülarizasyonu oluşup oluşmayacağıdır. Davidoff ve ark,nın yaptıkları hayvan deneyinde endotel progenitor hücrelerin tümör neovaskülarizasyonuna katkıda bulunduğu ve anjiyogenez inhibitörü salan bir hücreye modifiye edildiğinde tümör büyümesinin sınırlandırıldığı gösterilmiştir [39]. Fakat şunu belirtmek gerekir ki şu ana kadar yapılmış klinik çalışmalardan anjiyogenik neoplazi gelişen hasta bildirilmemiştir.

Kardiyak hasar tedavisinde kullanılan kök hücreleri bire bir karşılaştıran klinik çalışma mevcut değildir. Fakat bu konuda planlanmış preklinik çalışmalar mevcuttur. Mezenkimal progenitor hücreleri, endotel progenitor hücreleri ve her ikisinin kombinasyonunu AMİ sonrası intramiyokardiyal enjeksiyon yöntemiyle sıçanlarda karşılaştıran bir çalışmada, kombinasyon tedavisinin neovaskülarizasyonu ve kontraktiliteyi daha iyi artırdığı saptanmıştır [40]. Bu çalışma miyokart infaktüsü sonrası sol ventrikül disfonksiyonu gelişmesinde anjiyogenezin önemli rol aldığını göstermiştir. Kemik iliği kaynaklı mononükleer hücreler, MKH, iskelet kas kaynaklı miyoblast ve fibroblast gibi farklı dört hücre tipinin etkinliğini miyokart hasarlı farelerde karşılaştıran çalışmada kemik iliği kaynaklı mononükleer hücre kullanılan deneklerde kardiyak fonksiyonların daha iyi korunduğu gözlenmiştir [41]. Adipoz kaynaklı MKH ve kemik iliği kaynaklı MKH'leri farelere miyokart hasarı sonrası intramiyokardiyal yöntem ile naklederek karşılaştıran preklinik çalışmada her iki hücre tipinin etkinliğinin kontrol grubu ile benzer olduğu gözlenmiştir [42].

AMİ sonrası kök hücre nakli için ideal zamanın ne zaman olması gerektiği konusu da tartışmalıdır. Bu konuda yapılmış bir preklinik çalışmada miyokart hasarı oluşturulan sıçanlar, miyokart infaktüsünden 1 saat, 1 hafta ve 2 hafta sonra MKH'ler nakledilecek şekilde gruplara ayrılmışlardır. Kök hücrelerin etkinliği anti-apoptotik ve anjiyogenetik özellikleri 3 farklı zaman diliminde karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. MKH'lerin kardiyak fonksiyonları iyileştirdiği ve anjiyogenezis, anti-apoptozis ve kardiyak fonksiyonların en fazla miyokart hasarından 1 hafta sonra kök hücre nakledilen grupta arttığı bildirilmiştir [43]. Bir metaanalizin altgrup incelemesinde AMİ sonrası ilk 7 gün ve 7-21 gün arası kemik iliği kaynaklı kök hücre infüzyonu alan hastalar karşılaştırılmıştır. 7-21 gün arası kök hücre infüzyonu alan hastalarda LVEF'de artış (%95 CI, 6.78, (2.24-11.32), P=0.003) daha anlamlı

saptanmıştır [31]. Özet olarak metaanaliz sonuçlarına baktığımızda kemik iliği kaynaklı kök hücreler ile AMİ'li hastalarda LVEF'de %2.99 (%95 CI, 1.26-4.72, P=0.0007), kronik iskemik kalp hastalığı olan hastalarda %5.85 (%95 CI, 2.50-9.19, P=0.0006) artış sağlanmıştır [30,31]. LVEF'de artışın yeterli olmamasının sebeplerinden bazıları; kalpte yeterli hücre tutulumunun olmaması, infüzyon yapılan hücrelerde apoptoza bağlı yüksek hücre mortalitesi ve hastanın kardiyak risk faktörleridir.

2.2. Apoptozis ve Kardiyovasküler Hastalıklar

2.2.1. Apoptozisin Düzenlenmesi ve Etki Mekanizması

Apoptozis genetik olarak programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Kalbin gelişiminde ve kalp hastalıklarının patogenezinde önemli rol almaktadır. Apoptozis klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozisden birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir ölüm mekanizmasıdır. Tablo-1'de apoptozis ve nekroz karşılaştırılmıştır. Apoptozis morfolojik olarak özgündür. Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptotik hücre tam tersine küçülür. Nekrozisde kromatin patterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve kondanse olur. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepcikler "membrane blebs" oluşur. Nekrotik hücre sonra lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere "apoptotik bodies" parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır değişen miktarlarda nukleus veya diğer hücre içi yapılar içerirler. Nekrozisde plazma membranının bütünlüğünün bozularak hasarlanması nedeniyle hücre içeriğinin dış ortama salıverilmesi sonucu inflamasyon uyarılır. Oysa, apoptozisde apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz. Apoptozisin en önemli özelliği DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının "ladder pattern" ortaya çıkmasına neden olur. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin'in erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır "phosphatidylserine translocation". Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar [44-48].

Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptoz 30-60 dakika gibi bir sürede tamamlanır. Apoptotik hücre ölüm programı, üç temel bileşeni içerir: Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve apoptotik proteaz aktive edici faktör-1. Bu anahtar bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen morfolojik değişikliklerden, mitokondriyal hasardan, çekirdek zarı kırılmalarından, DNA fragmantasyonundan, kromatin kondansasyonundan ve apoptotik cisimciklerin şekillenmesinden sorumludur [49].

Apoptozis çok sayıda ve çeşitte mediatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Bazı mediatörler hücre tipine özgündür, bazıları da apoptotik stimulusun çeşidine göre farklılık gösterebilirler. İnsanda apoptozun düzenlenmesi, p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar [50].

Apoptozun düzenlenmesi Bcl-2/Bax gen grubu ile sağlanır [50]. Bu grubun üyelerinden bazıları Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 gibi apoptoz inhibitörüdür. Bazıları ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır. Proapoptotik genler; Bax ve BH3 olmak üzere iki alt gruba sahiptir [51,52]. Bcl-2 nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl-2 nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürürken, Bax'ın daha fazla olması durumunda hücre ölüme gitmektedir[48].

Tablo-2. Nekrozis ve apoptozisin karşılaştırılması. [44-48]

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Yol açan nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stres	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNRF-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T-lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stres
Morfolojik özellikler	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı Kromatin "flokülasyonu" Hücre şişmesi Organellerin parçalanması Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntakt hücre membranı fakat membranda "bleb"lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organellerde parçalanma yok Hücrenin intakt mitokondri, ribozom, nukleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon hemostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4 ^{o}C'de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) Post-litik DNA fragmantasyonu (=ölümün geç safhasında)	İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4 ˚C'de gerçekleşmez DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven paterni=apoptozisin en önemli belirteci) Prelitik DNA fragmantasyonu (=erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez

TNRF-1(tumor nekrozis faktör reseptörü-1)

Bcl-2, bir proto-onkogendir ve ürettiği protein, mitokondrinin sitoplazmaya dönük dış zarı üzerinde ve endoplazmik retikulumun bir bölümü olan çekirdek zarında yerleşmiştir[53]. Bcl-2 ailesinin bir diğer özelliği de reaktif oksijen düzeylerinin apoptoz üzerindeki etkilerini pro-oksidan gibi davranarak kontrol etmesidir [54]. Bax proteinleri sitoplazmada da bulunur. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax proteinleri, mitokondri zarının "permeabilite geçiş poru" na doğru yönlenirler ve buraya bağlanırlar. Bu bağlanma, seçici iyon geçirgenliğini azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. Sitokrom c, bir sitoplazma proteini olan Apaf-1' in aktivatörüdür [50]. Sitokrom c'nin Apaf-1 'e bağlanması prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks "apoptosom" olarak isimlendirilir [55]. Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır [50].

Sitokrom c'nin sitoplazma içine salınması ile apoptozun son basamaklarından sorumlu enzim sistemi olan kaspazlar aktive olur. Şimdiye kadar sitozolde bulunan 14 kaspaz tanımlanmıştır. Apoptotik programın merkez bileşeni kaspazlardır [56-58]. Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür ve kaspaz inhibitörlerinin (IAP) effektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir [54].

2.2.2. Apoptozisin Saptanması

Apoptozisle ilgili çalışmalar hızla artmasına karşın apoptozisi saptamak ve değerlendirmek pek kolay olmamaktadır. Özellikle tek bir hücrede apoptozis olayı saatler içerisinde geliştiğinden apoptotik süreçteki hücreyi morfolojik olarak tanımak ve ölçebilmek zordur [59]. Genellikle çalışmaların güvenilirliğini artırmak amacıyla farklı yöntemlerin birkaçının birlikte kullanılması önerilmektedir [44]. Apoptotik hücredeki morfolojik değişiklikleri saptamak için ışık mikroskobu, elektron mikroskobu, "Flow-cytometry" kullanılmaktadır. Yine çeşitli sitoplazmik değişiklerin saptanması (örneğin kaspaz aktivitesinin, hücreye kalsiyum akışının veya mitokondri işlev bozukluğunun ölçülmesi), membran değişikliklerinin belirlenmesi (örneğin membran geçirgenliğinin değişmesi), apoptoz sürecinde veya regülasyonunda görevli çeşitli proteinlerin kanda veya dokuda düzeyinin ölçülmesi (örn:Bcl2/Bax oranı...), DNA parçalanmasının çeşitli özel immünohistokimyasal boyalarla saptanması bu yöntemler arasında sayılabilir. Bütün bu yöntemler içinde en sık rastlanan yöntemler DNA'daki değişikliklere dayalı olan "DNA agarose gel electrophoresis" ve TUNEL (terminal deoxytransferase mediated bio-dUTP nick end labeling) boyası ile formalinde fikse edilmiş materyalde yapılan mikroskopik incelemedir

[60]. Son dönemde kullanılan önemli ve güvenilir bir başka yöntem ise Annexin-V boyası uygulamasıdır [61]. Bu boya, hücre duvarının dış yüzeyinde fosfatidil serinin varlığını göstermektedir. Normalde hücrelerin dış yüzeyinde fosfatidil serin yoktur, ve sadece apoptotik cisimciklerde fosfatidil serin hücre yüzeyine geçmektedir [62].

2.2.3. Kardiyovasküler Sistemde Apoptozis

Apoptozis sıklıkla hücre siklusunda progresyon gösteren hücrelerde olur. Bu nedenle en son noktaya kadar farklılaşmış kardiyak hücrelerde oluşmayacağı düşünülmüştür [63]. Ancak hayvan ve insanlarda postmortem çalışmalar ve endomiyokardiyal biyopsi sonuçları miyokartta da apoptozisin görülebileceğini ortaya koymuştur. Normalde kardiyovasküler sistemin normal embriyonik gelişimi sırasında apoptozis yoğun olarak meydana gelirken erişkinlerde apoptozis mekanizmaları, kalpte inaktif halde bulunur [64-65]. Çeşitli kardiyak ve vasküler hastalıklarda apoptozis mekanizmalarında bozukluklar gösterilmiştir (Tablo 2).

2.2.4. İleti Sistemi Hastalıklarında Apoptozis

Atriyoventriküler düğüm veya his demetinin fötal morfolojik yapısı erişkin yapısına dönüşürken fötal sinüs düğümünde görülen miyofibrillerden fakir miyositler yerlerini kollajenden zengin hücrelere bırakırlar ve apoptozisle ortadan kaldırılırlar, işte apoptozisin yetersiz kaldığı durumlarda doğum sonrası fötal morfolojinin devamı genelde ani ölümle sonuçlanabilen patolojilere yol açabilmektedir [65-66]. Bu dönemde ileti yollarında görülebilen yetersiz apoptozis "Wolf-Parkinson-White sendromu" gibi aberan ileti yollarına ait patolojileri getirebilmektedir [67]. Normalde postnatal dönemde sağ ventrikülde "disuse atrophy" nin gerçekleşmesi Bcl-2 genlerinin "down-regülasyonu" yani apoptozisle sağlanmaktadır [65,68]. Sağ ventrikülde görülen apoptozisin aşırı artışının Uhl anomalisine yol açtığı gösterilmiştir [69,70]. Uhl anomalisinde sağ ventrikülün histolojik olarak non-inflamatuvar yıkımı söz konusudur. Etyolojisi bilinmeyen bu hastalıkta, çok erken yaşta ölümle sonuçlanan sağ kalp yetersizliği gelişmektedir. Aritmojenik sağ ventrikül displazisi de histolojik olarak Uhl anomalisine benzeyen bir diğer sağ ventrikül patolojisidir [71,72]. Buradaki tek fark sağ ventriküldeki tutuluşun yaygın değil odaklar halinde oluşudur. Aritmojenik sağ ventrikül displazisinde de apoptoziste bir artış meydana gelmekte, ölmekte olan sağ ventrikül miyositleri geçici olarak spontan otomatisite kazanmakta veya yanıtsız, kasılmayan bölgeler oluşturarak fokal re-entran taşikardiler için kaynak olmaktadırlar [65].

Afrika'da familyal olarak rastlanan progresif kalp bloğu ve fatal aritmilerle seyreden Brink Sendromunda ise sinüs düğümü ve atriyoventriküler düğümde selektif apoptozise bağlı yıkım olduğu gösterilmiştir [73,74]. Benzer bir yıkım Brugada sendromlu hastaların postmortem histolojik incelemelerinde de ortaya konmuştur [65,75].

Tablo-3. Kardiyovasküler hastalıklarda apoptozis [64]

Vasküler duvar	**Miyokart**
• Ateroskleroz • Diyabetes mellitus • Hipertansiyon • Vasküler allogreft reddi • Vasküler gelişme bozukluğu • Vasküler yeniden biçimlenme • Restenoz	• Akromegalik kardiyomiyopati • Aritmojenik sağ ventrikül displazisi • Hibernasyon • Kardiyak allogreft reddi • Kardiyak gelişim bozukluğu • Down Sendromu • Önkoşullanma • Yeniden biçimlenme • Reperfüzyon hasarı • Chagas miyokarditi • Konjenital AV blok • Akut miyokart infaktüsü • Hipertansif kalp hastalığı • Kalp yetersizliği • Koroner greft vaskülopatisi • Viral miyokardit

2.2.5. İskemik Kalp Hastalıklarında Apoptozis

Edinsel miyokart hastalıklarında apoptozis ilk kez bir hematolojik patoloji olan trombotik trombositopenik purpura nedeniyle ölen olguların kalplerinde gösterilmiştir [76]. Trombotik trombositopenik purpura olgularında ufak arter ve kapiller düzeyinde epizodik tıkanmalardan dolayı nekroza ulaşmayan fokal apoptotik hücre ölümlerinin olduğu

anlaşılmıştır. Bu bulgular daha sonra hayvanlarda deneysel iskemi modellerinde de elde edilmiştir [77]. İskemik miyokartta bcl-2, Fas, Bax ekspresyonunda artış saptanmıştır [65,78]. Hafif iskemi tüm hücrelerde olduğu gibi miyositlerde de apoptozise yol açarken, ağır iskemi nekrozla sonuçlanmaktadır [46,65]. Hiberne miyokart bölgelerinde de apoptozis gösterilmiştir [79]. Kısa aralıklı iskemiler sonrasında reperfüzyonla gelişen iskemik önkoşullanmanın kalıcı hasarı azaltmasında apoptozisin önlenmesinde rolü olabileceği gösterilmiştir [80-81]. Miyokart infaktüsünde ise infaktüs bölgesinde her iki hücre ölüm tipi de bir arada görülmektedir [65]. İnfarktüs dokusunda hem erken dönem, hem de geç dönemde histolojik olarak apoptozis gösterilmiştir. İnfarktüsten sorumlu arter açık olsa da peri-infarkt bölgedeki apoptoz yoğunluğunun devam ettiği saptanmıştır [82,83].

2.2.6. Kalp Yetersizliğinde Apoptozis

Etiyolojisi ne olursa olsun tüm kalp yetersizliklerinde apoptozis süreci tetiklenmiştir. Özellikle kalp yetersizliğinde progresif sol ventrikül disfonksiyonunun devam eden kardiyomiyosit kaybına bağlı olduğu hipotezi üzerinde durulmaktadır. Deneysel olarak hipoksi, renin anjiyotensin sistemi (RAS) aktivatörleri (Anjiyotensin-II), serbest oksijen radikalleri, hücrede artmış kalsiyum yükü ve norepinefrinin miyositlerde apoptozise yol açtığı gösterilmiştir [84,85]. Kalp yetersizliğinin progresyonunda anahtar bir role sahip olduğu anlaşılan TNF-alfa reseptörlerinin de kaspazlar üzerinden in-vitro apoptozis uyarımı yaptıkları gösterilmiştir [86]. Bu bulgular kalp yetersizliğinin ortaya çıkmasını ve ilerlemesini önlemede apoptozisi inhibe eden bir takım ajanların kullanımını gündeme getirmektedir. Bu amaçla TNF alfa inhibitörleri, kaspaz inhibitörleri deneysel modellerde çalışılmaktadır. Sıçanlarda iskemi reperfüzyon modelinde, kaspaz inhibitörlerinin kullanımı ile infarkt büyüklüğünde azalma ve kardiyak fonksiyonlarda düzelme sağlanmıştır [87]. Hayvan iskemi modellerinde enalapril kullanılan köpeklerde perinfarkt bölgede apoptotik hücre sayısında azalma elde edilmiştir [88]. Ayrıca beta blokerlerin de iskemiyi takiben reperfüzyon öncesinde uygulandıklarında apoptozisi azalttıkları gösterilmiştir. Beta-bloker, alfa-1 bloker ve antioksidan etkileri olan karvedilol apoptozisi %77 oranında azaltırken, non-selektif beta bloker olan propranololde bu oran %39 olarak saptanmıştır [89]. Belki de kalp yetersizliğinde beta blokerler ile elde edilen klinik sonuçlar miyosit apoptozisini azaltıcı etkilerinin de bir sonucu olabilir. Kalp yetersizliğinde apoptozis çalışmalarının önemli bir sonucu da pozitif inotropik ajanların (örn. dobutamin) miyosit apoptozisini tetikleyici etkilerinin olduğunun

anlaşılmasıdır [85,90]. Bu sonuç, inotropik ajanlarla sağkalımda olumlu bir etki sağlanamamasının altında yatan mekanizmayı gösteriyor olabilir.

2.2.7. Vasküler Sistemde Apoptozis

Damar sisteminde embriyonel ve postnatal dönemde düz kas hücrelerinde fizyolojik apoptozis olmaktadır [68]. Gelişme dönemi dışında akut arter hasarı (balon) ve tamir sürecinde, aterosklerotik plaklarda, restenotik lezyonlarda, dejenere safen ven greftlerinde, transplant vaskülopatisinde ve anevrizmatik arter duvarında düz kas hücrelerinde apoptozis gösterilmiştir [91]. Teorik olarak, primer aterosklerotik plak ve restenotik lezyonlarda apoptozisin uyarılması lezyonda gerilemeye yol açmalıdır. Ancak, artmış apoptozis plak kararlılığını bozmaktadır [92]. Apoptozis ile plak içindeki düz kas hücreleri sayıca azalmakta, kollajen sentezi düşmekte ve sonuçta fibröz kapsülü incelmiş olan plak, kararlılığını kaybetmektedir. Yüksek kolesterolle beslenerek deneysel ateroskleroz geliştirilen tavşanlarda erken dönem yağlı iz lezyonlarında morfolojik olarak lezyon gelişmeden önce apoptozisin başladığı ve ateroskerotik plağa doğru ilerleme sırasında düz kas hücrelerinde apoptozisin giderek arttığı saptanmıştır [93,94]. Sağlam damar duvarında nitrik oksit apoptozisi baskılarken, aterosklerotik duvarda DNA parçalanmasına yol açarak apoptozisi tetiklemektedir [95]. Lipid düşürücü ilaçların makrofaj apoptozisini etkilemedikleri ancak plakta birikimlerini azalttıkları gösterilmiştir [92,96]. Apoptotik cisimcikler yüzeylerindeki fosfatidil-serin nedeniyle kompleman ve trombin aktivasyonuna yol açabilirler [97]. Aterosklerotik plaklarda artmış apoptotik cisimcikler, makrofajlarca ortamdan temizlenemezlerse trombojenitede artışa yol açarak plağın kararlılığını bozabilirler. Ayrıca apoptotik hücrelerin doku faktörünün aktivitesini artırdıkları gösterilmiştir [98]. Dolayısı ile plak içinde apoptozisi azaltan ajanlar, trombojenite açısından da yararlı olmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İnsan Kemik İliği Kaynaklı MKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü

Kemik iliği kaynaklı MKH'ler Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezinden sağlandı. Kemik iliği aspirasyonları iliyak kemik iliği biyopsisi yapılan immün trombositopenik purpura hastalarından bilgilendirilmiş onam sonrası etik kurul izni ile elde edilmişti. Kemik iliği aspirasyonları etik standartlara uygun olarak yapılmıştı. Kemik iliği aspiratları Histopaque-1077 (Sigma Aldrich) solüsyonuna 1:1 oranında yayıldı.1800 rpm de 20 dk. santrifüj edildikten sonra mononükleer hücrelerin bulunduğu bulutsu tabaka toplandı. %15 FBS (Fetal Bovine Serum), 100 IU/ml penisilin-100 μg/ml streptomisin içeren MEM besi ortamını eklenerek 1300 rpm'de santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi iki kez tekrarlandı. Elde edilen hücreler 25 cm^2 hücre kültür kaplarına ekildi. İzole edilen kök hücreler 100 IU/ml penisilin-0.1 mg/ml streptomisin, 15% FBS ilave edilmiş α-MEM medyum içeren T-25 hücre kültür flasklarına ekilerek 37 ˚C'de %5 CO_2 içeren inkübatöre kaldırıldı. Her üç günde bir medyum değiştirildi. Hücreler %80-90 kültür kabını doldurduğunda Ca ve Mg içermeyen phosphate-buffered saline (PBS) ile yıkanarak 3 dk. %0.025 tripsin- ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solüsyonu ile inkübe edildi. Kalkan hücreler toplanarak 1300 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Alt-kültür için 1:3-1:4 oranında olmak üzere hücreler tekrar kültür kaplarına ekildi. Deneylerde pasaj 3'deki MKH'ler kullanıldı.

3.2. İnsan Adipoz Doku Kaynaklı MKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü

Adipoz doku kaynaklı MKH'ler Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezinden sağlandı. Adipoz dokular etik kurul izni ile sezeryan doğumu yapan hastalardan elde edilmişti (uterusu daha önceki operasyon yerlerine yapışık olan omentumu serbestlemek amacıyla yapılan cerrahi işlem sonrası atılacak olan omentum dokusu kullanılarak). Dokulardan kanı uzaklaştırmak için birkaç defa magnezyum ve kalsiyumdan yoksun 5% antibiyotik-antimikotik solüsyon içeren Hank's balanced salt solüsyonu (HSSS) ile yıkandı (Invitrogen). Makas ile dokular 1 mm^2'lik küçük parçalara

ayrıldı. Yağ dokuları kimyasal ayrıştırma için 50 ml konik tübe koyularak (BD Biosciences) kalsiyum ve magnezyumdan yoksun HBSS'de hazırlanmış %0.075 kollajenaz tip I solüsyonundan 5 ml eklenerek 60 dk. çalkalamalı 37◦C su banyosunda bekletildi. 60 dk. sonunda kültür medyumundan 1:1 oranında eklenerek 1800 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pelet kültür medyumuyla sulandırılarak sindirilmeyen yağ doku ve debrisi uzaklaştırmak amacıyla 70µl naylon süzgeçden geçirilerek süzüldü. Üzerine 1:1 oranında besi yeri eklenerek 1300 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Eritrositleri uzaklaştırmak amacıyla 1 ml kültür medyumuyla sulandırılmış pelete 5 ml lysing solüsyonu (BD Biosciences) eklendi ve 5 dk. oda ısısında bekletilerek 1800 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. En son olarak süpernatantı attıktan sonra alt kısımda oluşan pelet yıkanarak MEM ilave edildi. İzole edilen kök hücreler 100 IU/ml penisilin-0.1 mg/ml streptomisin, 15% FBS ilave edilmiş MEM içeren T-25 hücre kültür flasklarına ekilerek 37 ˚C'de %5 CO_2 içeren inkübatöre kaldırıldı. Her üç günde bir medyum değiştirildi. Hücreler %80-90 kültür kabını doldurduğunda Ca ve Mg içermeyen PBS ile yıkanarak 3 dk. %0.025 tripsin-EDTA solüsyonu ile inkübe edildi. Kalkan hücreler toplanarak 1300 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Alt-kültür için 1:3-1:4 oranında olmak üzere hücreler tekrar kültür kaplarına ekildi. Deneylerde kullanılan MKH'ler pasaj 3 dü. İlk pasajlama pasaj 0 olarak kabul edildi. Bunu takip eden pasajlar sırayla numaralandırıldı.

3.3. MKH Kültüründe Hücre Sayımı

Kemik iliği ve yağ dokusundan izole edilen kök hücreler için her alt-kültür işlemi sırasında, dondurma ve çözdürme işlemleri sonrasında ve karakterizasyon işlemleri öncesinde gerçekleştirilen hücre sayımları aşağıda anlatılan yönteme uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Hücre sayımı için; tripsinizasyon işlemi ile tutunan hücreler yüzeyden kaldırıldıktan sonra süpernatant atılarak, pelete 1 ml besi ortamı eklenmiş ve pipetle homojenizasyon sağlanmıştır. Eppendorf tüplerine 100 µl hücre süspansiyonu alınmıştır. Hücre süspansiyonunun üzerine, mikropipetle 100 µl tripan mavisi solüsyonu eklenmiştir. Sayım kamarası olarak Thoma lamı kullanılmıştır. Thoma lamı, düz bir zemin üzerine alınarak, lamelin yapışması gereken sayım alanı çerçevesi üzerine lamel kapatılmıştır. Hazırlanan süspansiyondan 100 µl alınarak, Thoma lamının her iki yanında bulunan kanalların ortasında kalan sayım alanında lamelin lam ile birleştiği noktaya pipetin ucu dayanarak tam orta noktasından yavaşça hücre solüsyonu

sayım alanına pipetlenmiştir. Hücre sayımı, ışık mikroskobunda, 40x objektifte gerçekleştirilmiştir.

Toplam hücre sayıları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$Hs \times Do \times Ss$$

Hs *:Sayılan hücre sayısı*

Do *:Seyreltme oranı*

Ss *:0,1 mm^3 deki sayım sonucu 1ml'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılır. Sabit sayı 10 000'dir.*

3.4. MKH'lerin İmmünfenotipik Analizi

MKH'lerin immünohistokimyasal yöntemlerle karakterizasyon çalışmaları, P1, P3 ve P4'de poli-L-lizin kaplı 8 kuyucuklu hücre kültür odacıklarına ekilmiş $2x10^5$ hücre/kuyucuk ile gerçekleştirilmiştir. Tutunmanın sağlanması için bir gece inkübasyonun ardından immünohistokimyasal ve immünfluoresans işlemlerine geçilmiştir.

MKH'lerin immünohistokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için; CD31, CD34, CD45, CD71, CD105, CD44, CD105, aktin, SSEA4, tip II kollajen, GFAP, MyoD, miyozin IIa, miyogenin, nestin, vimentin, osteokalsin, osteonektin ve Ki67 proliferasyon belirteci için immünohistokimyasal ve fibronektin, α-düz kas aktin, desmin, nestin, beta tubulin, osteokalsin ve vimentin immünfluoresans boyamaları gerçekleştirilmiştir. İmmünohistokimyasal çalışmalarda, uygun bir immünohistokimya kiti ve bu kitle uyumlu biyotinli sekonder antikorlar kullanılmıştır.

Hücreler immünohistokimyasal çalışmalar için %0.1 oranında H_2O_2 içeren metanolde endojen peroksidaz aktivitesini engellenmesi için, oda ısısında (nemli ortamda) 30dk. süreyle inkübe edilmiştir. PBS ile yıkandıktan sonra, %1.5 normal blok serum içeren PBS'de 30dk. inkübe edilmiş ve verilen uygun dilüsyon oranlarında primer antikor eklenmiş ve $+4^oC$'de 1 gece ve oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edilmiştir. PBS ile 3 kez yıkama işleminden sonra immünohistokimyasal çalışmalar için uygun biyotinli sekonder antikorla ve immünfluoresans çalışmalar için uygun fluoresans (FITC) işaretli sekonder antikorla oda sıcaklığında 30dk. inkübe edilmiştir. Son aşamada, immün-reaksiyon gösteren hücrelerin belirlenmesi için %0.1'lik Mayer's hematoksilen (immünohistokimyasal) çekirdek zıt boyaması ve DAB (immünfluoresans) immün-boyamaları gerçekleştirilmiş ve lam üzerine kapatılmıştır. Negatif kontroller için, aynı yöntem uygulanmış fakat primer antikor yerine PBS kullanılmıştır. Örnekler, fluoresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems)

incelenerek fotoğraflanmıştır. Kemik iliği kaynaklı ve adipoz doku kaynaklı MKH'ler (pasaj 3, n=3) $10X10^4$ / cm^2 miktarında 6 kuyucuklu flasklara analizden 48 saat önce ekildi. Hücreler aşağıdaki anti-human antikorlarla işaretlendi; CD34, CD45, CD90. Nonspesifik anti-rat IgG-FITC izotop kontrol olarak kullanıldı.

3.5. Akış Sitometrik Analizler

MKH'lerin, fenotipik karakteristiklerinin belirlenmesi için akış sitometrik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu analizler, her alt-kültür işlemi sonrasında (P1'den P5'e kadar) ve *FACS Calibur* akış sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Her alt-kültür işlemi sırasında (P1'den P5'e kadar) hücreler tirpsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, hücre sayımı yapılarak hücre sayısı belirlendikten sonra bir kısmı bir sonraki pasaj için yeni T75 flasklara ekilirken bir kısmı da (yaklaşık olarak $8x10^6$ hücre) PBS içinde homojenize edilmiştir. Daha sonra belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel fluoresan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE)-konjuge monoklonal antikorlar (CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD106, CD117, HLA-DR, CD146 ve CD166) ve uygun izotip kontrollerinden (IgG1, IgG1/G2a) 10µl eklenerek inkübe edilmiştir (oda ısısında-karanlıkta-45 dk.). İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (%0.1 sodyum azid içeren PBS) eklenmiş ve santrifüj edilerek (5dk. 1780 rpm) artefaktlardan temizlenmiş ve 400µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edilmiştir. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akış sitometri cihazında okutulmuş ve analizi *BD Cell Quest TM software* programı ile gerçekleştirilmiştir.

3.6. Apoptozisin Uyarılması ve Tespiti

3.6.1. Serum eksikliği ile uyarılan apoptozis:

MKH'lerin canlılık ve proliferasyonlarını tespit etmek için "MTT canlılık testi" uygulanmıştır. Canlı ve apoptozisin erken evresindeki hücrelerin mitokondriyalar aracılığıyla MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) solüsyonuyla oluşturduğu reaksiyonda, MTT'nin tetrazolyum halkası hücrelerin mitokondriyalarında bulunan dehidrojenaz enzimlerince parçalanarak mor renkli formazan kristalleri oluşturmakta, ölü hücreler formazan kristalleri oluşturmamaktadır. Oluşan renk mitokondriyal aktiviteyle ilişkili olup, oluşan formazan kristalleri izopropanol/ HCl içeren

çözücülerde çözülebilmektedir ve oluşan mavi/mor renk spektrofotometrik yöntemle (mikroplaka okuyucuda) 570 nm de ölçülmektedir.

P3'deki MKH'ler, hücre kültür kaplarını %70-80 oranında doldurduğunda, MTT testine alınmıştır. Alt-kültür işlemi sonrası MKH'ler (P3), 96 kuyucuklu kültür kaplarına 12.500 hücre/kuyucuk olacak şekilde ve 1., 4. ve 7. gün uygulamaları için ekilmiştir. Her test günü, istenen kuyucuktaki hücreler 3-4 ml Ca ve Mg içermeyen PBS ile yıkanmış ve 1 dk. bekletilip PBS uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, 2 ml tripsin eklenmiş ve örnekler 5-6 dk. inkübatörde bekletilmiştir. Zıt faz mikroskobu ile hücrelerin yüzeyden ayrılıp-ayrılmadığı kontrol edilmiştir. Hücreler konik tabanlı 15 ml'lik tüpe alınıp üzerine tripsinle aynı miktarda besi ortamı (FBS içeren) eklenmiştir. 1300 rpm'de 5 dk. santrifügasyonun ardından süpernatant atılmış ve 100 µl besi ortamı eklenerek pipetlenmiştir.

MTT testi için, kör olarak hücre kültüründe kullanılmamış taze kültür medyumu ve süpernatant kullanılmıştır. Buharlaşmanın engellenmesi için, 96 kuyucuklu plakaların en dış sıralarına serum fizyolojik pipetlenmiştir. Serum fizyolojik, besi ortamı ve hücreler 96 kuyucuklu plakalardaki yerlerine pipetlenmiştir. Karanlık ortamda üzerine 0.5 mg/ml MTT solüsyonu eklenmiştir. Alüminyum folyoya sarılarak inkübatörde 4 saat bekletilmiştir (37^oC'de). İnkübasyon sonrası 100 µl izopropanol-HCl her kuyucuğa eklenmiş, oda ısısında 30 dk. süreyle bekletilmiş ve absorbans 570 nm'de dalga boyu seçicisi (monokromatör) sistemli mikroplaka okuyucuda tespit edilmiştir. Kontrol grubunun optik yoğunluğu %100 MTT azalması ile ilişkilendirildi. Her deney 3 kez tekrarlanmıştır.

3.6.2. 2 mmol/L H_2O_2 ile uyarılan apoptozis:

Hücre canlılık analizi ile henüz hücrelerde nükleer değişiklikler oluşmadan membrandaki erken değişiklikler sırasında bile apoptozis ölçülebilmekte, hücre membranının normalde iç kısmında bulunan fakat apoptozis ile hücre yüzeyine çıkan fosfatidil serine bağlanma özelliği gösteren Annexin-V ile hücrelerde apoptozis tayini yapılabilmektedir.

Kemik iliği kaynaklı ve adipoz doku kaynaklı MKH'ler (pasaj 3, n=3) $10X10^4$ / cm^2 miktarında 6 kuyucuklu flasklara ekildi. 48 saat sonra medyum apoptozis uyarıcı medyum ile değiştirildi (2 mmol/L H_2O_2; DMEM ve 10% FBS). 60 dakika sonunda hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak apoptotik hücre yüzdesi FITC Annexin-V apoptozis saptama kiti (BD Pharmingen) kullanılarak akış sitometride belirlendi. Sonuçlar CellQuest Software kullanılarak analiz edildi. MKH'ler kaspaz-3 ile boyandı.

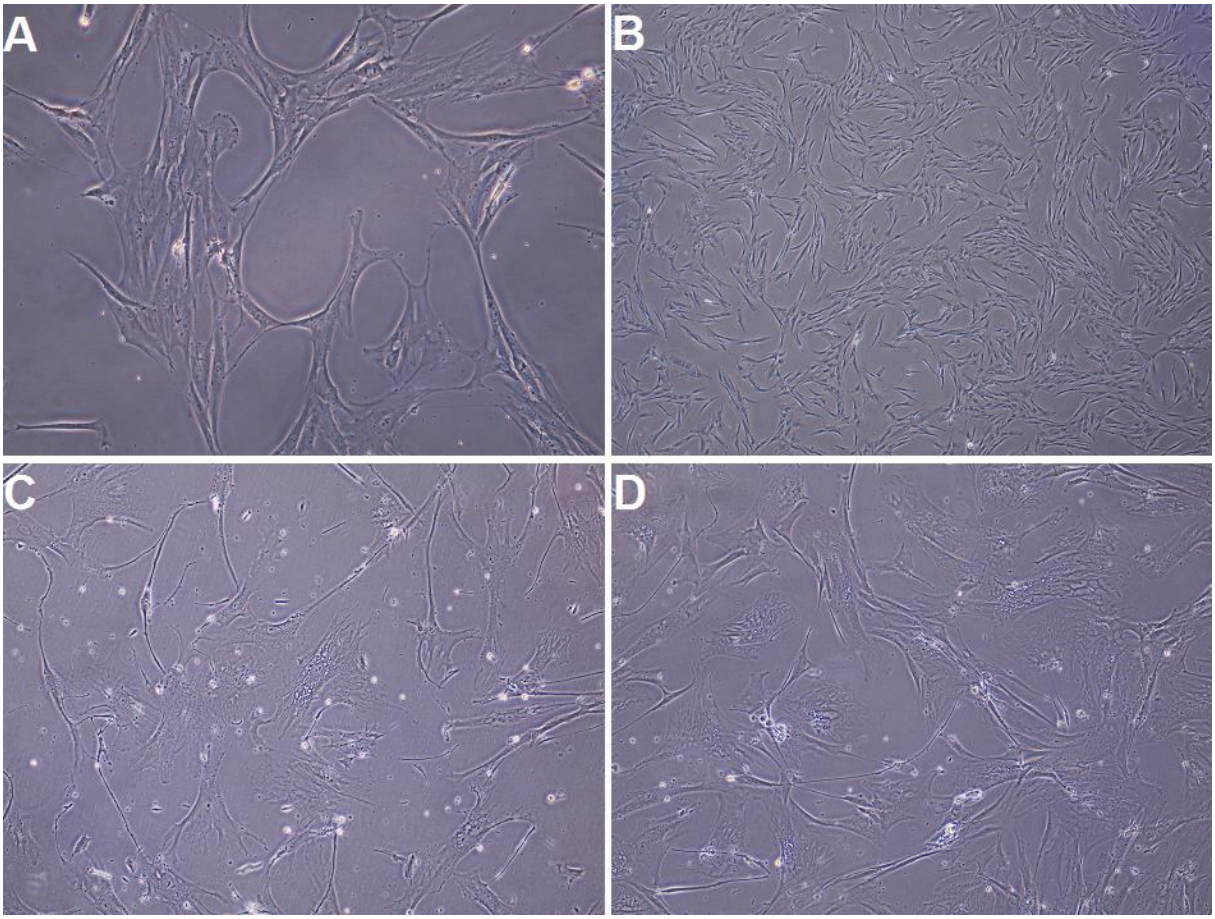
3.7. İstatistik analizi

Bütün deneyler en az üç defa olmak üzere tekrarlandı. Veriler ortalama değer ± standart hata (SH) şeklinde sunuldu. Tüm istatiksel analizler, SPSS 10.0 ile gerçekleştirilmiştir. Veriler, tek yönlü varyans analizi (*one-way ANOWA testi*) ve eşli *t-test* kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma ve kontrol grupları arasındaki farklar için, $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı sayılmaktadır.

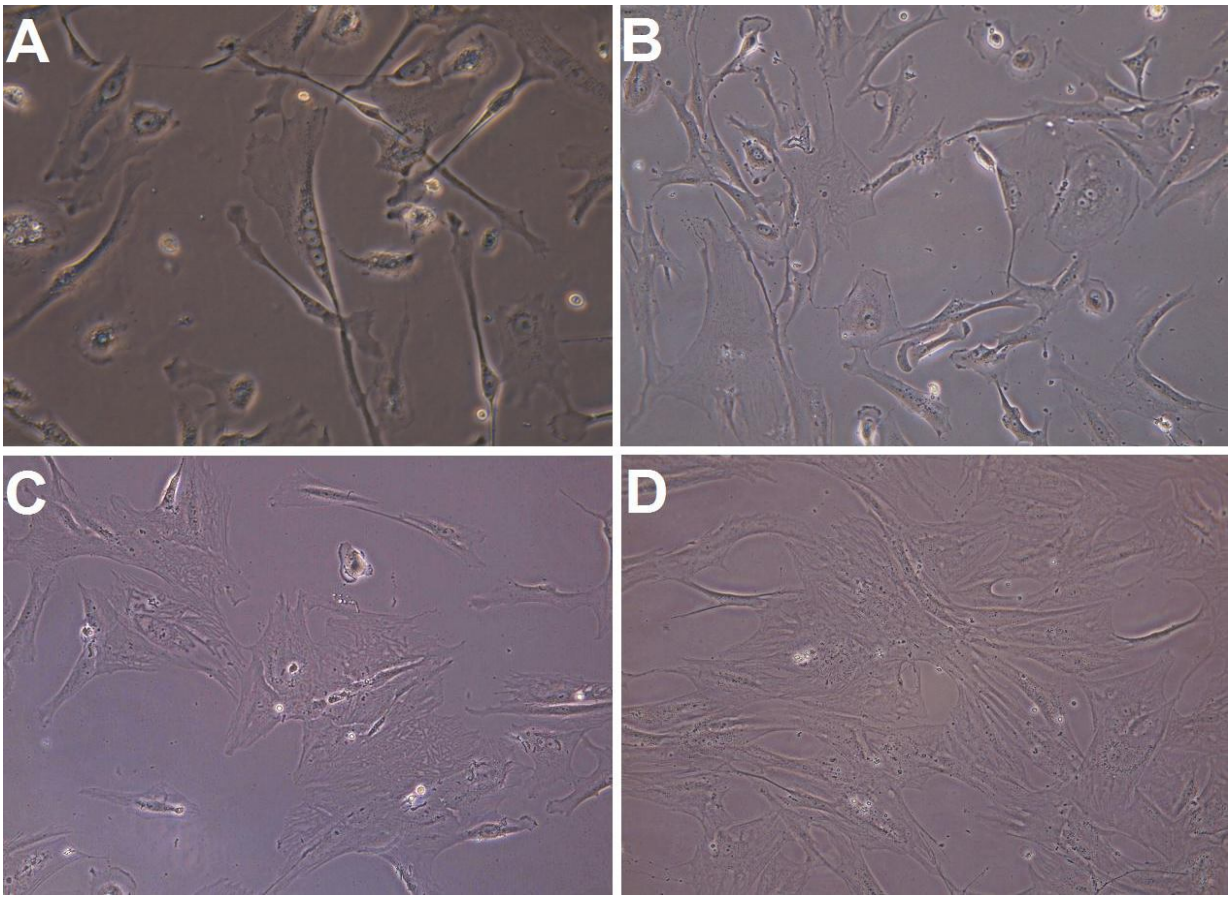
4. BULGULAR

4.1. MKH' lerin Morfolojik Özellikleri

İnsan adipoz dokusu ve kemik iliğinden izole edilen ve kültür kabının tabanına yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri, çalışma süresince zıt faz mikroskobu ile incelenmiştir. Birincil (*primer*) kültürün ilk günlerinde gözlenen iğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücrelerin, sonraki günlerde koloniler oluşturmaya başladığı gözlenmiştir (Şekil-2,3).



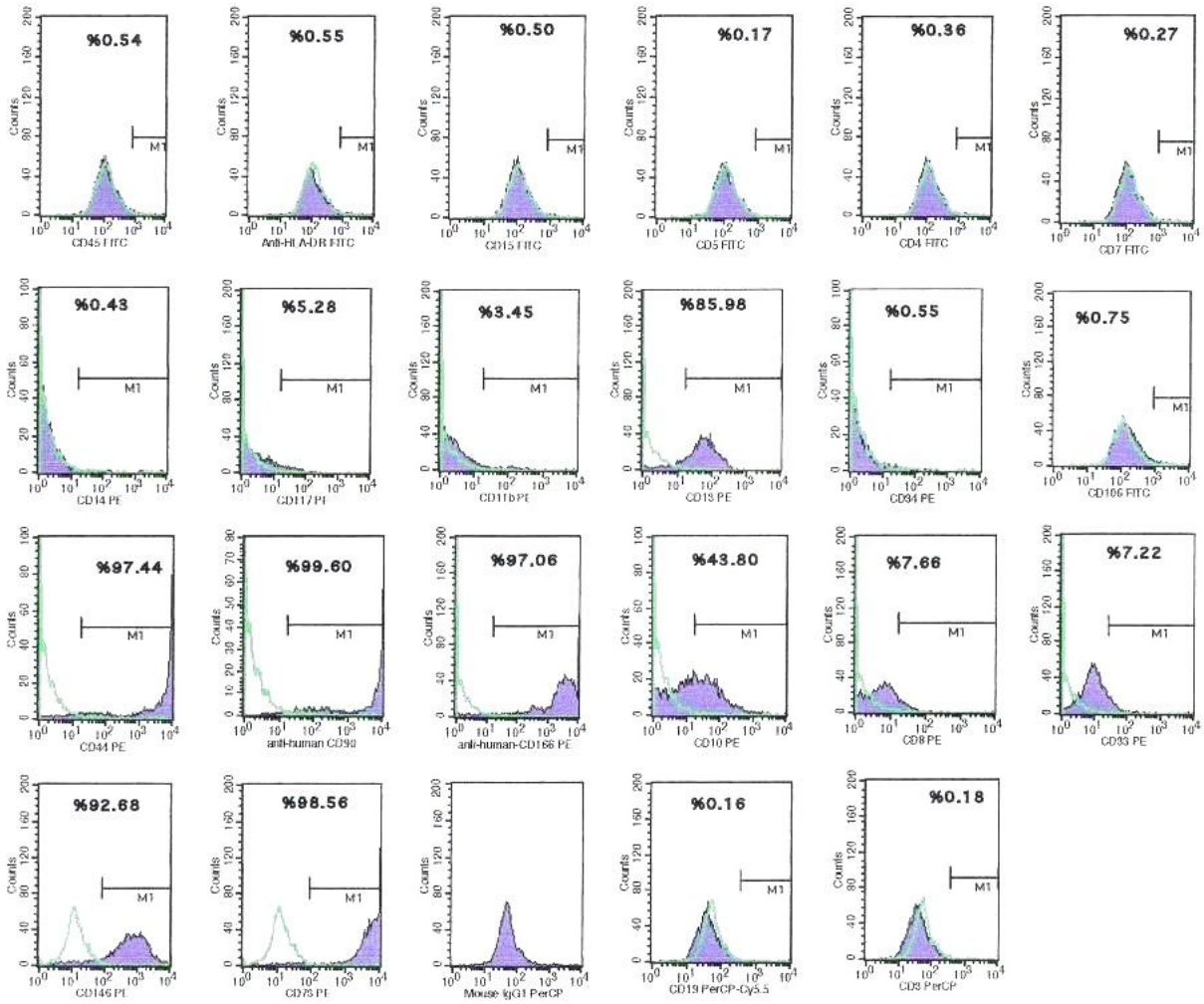
Şekil-2. İnsan kemik iliği aspiratlarından ficoll gradiyent yöntemiyle elde edilmiş MKH'lerin P0 7. gün (A), P3 6. gün (B), P6 6. gün (C) ve P7 10. gün'lerdeki (D) faz-kontrast mikroskopik görünümleri. Hücreler iğsi şekilli fibroblast-benzeri ve düz-yassı olmak üzere tipik MKH morfolojileri göstermekte (BÜYÜTME: A,C,D-X200; B-X100).



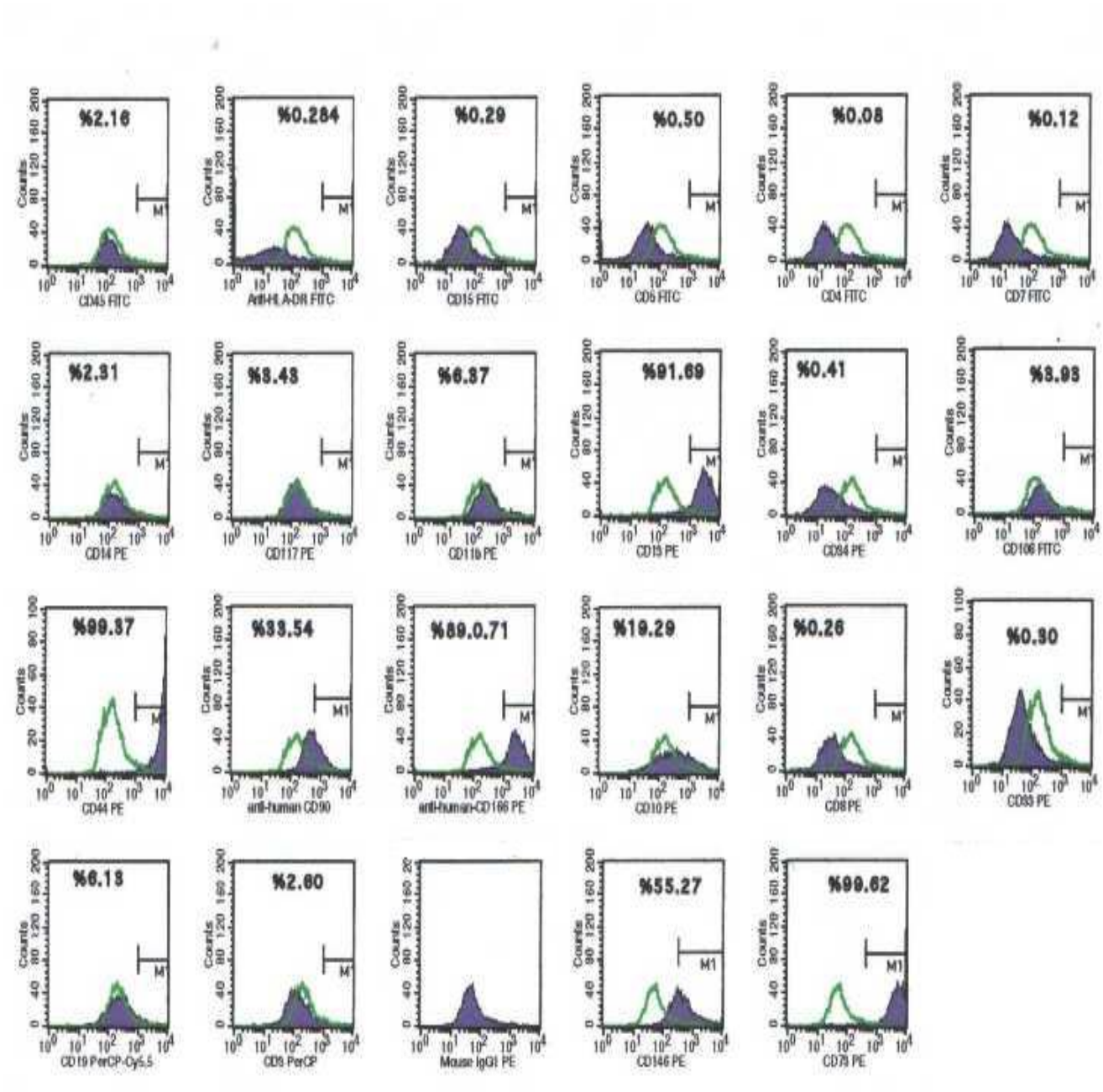
Şekil-3. İnsan adipoz dokusundan enzimatik sindirme yöntemiyle elde edilmiş MKH'lerin P0 2. gün (A), P2 3. gün (B), P3 3. gün (C) ve P4 12. gün'lerdeki (D) faz-kontrast mikroskopik görünümleri. Hücreler iğsi şekilli fibroblast-benzeri ve düz-yassı olmak üzere tipik MKH morfolojileri göstermekte (BÜYÜTME: A,B,C,D-X200).

4.2. MKH'lerin İmmunofenotipik Özellikleri

Her alt kültürleme işleminden sonra ayrılan yaklaşık $1x10^6$ hücre ile gerçekleştirilen akım sitometri incelemeleri (P5) sonucunda, adipoz doku kaynaklı ve kemik iliği kaynaklı MKH'ler ilk alt kültür işleminden itibaren hematopoetik hücre belirteçlerini (CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD106, CD117, HLA-DR) eksprese etmedikleri, buna karşın MKH'ler için sıklıkla kullanılan CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, CD146 ve CD166 için yüksek düzeylerde pozitif oldukları tespit edilmiştir. Şekil-4,5'de MKH'lerin P5'deki akım sitometrik çalışma verileri listelenmiştir.



Şekil-4. P(5)'deki insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin akım sitometri cihazında elde edilen verileri.



Şekil-5. P(5)'deki insan adipoz doku mezenkimal kök hücrelerinin akım sitometri cihazında elde edilen verileri.

MKH'lerin karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirilen immünohistokimya ve immünfloresan çalışmalarının (P3) sonuçları Tablo-4'de gösterilmektedir. Elde edilen veriler, akım sitometri sonuçlarını destekleyici niteliktedir.

Tablo-4. MKH' lerin immünohistokimyasal özellikleri.

Antikor/Belirteç	**Seyreltme**	**Hücre Tipi**	
		iAD-MKH	***iKİ-MKH***
		Ekspresyon	**Ekspresyon**
CD 31/ PECAM-1 (M-20)	1:100	∅	∅
CD 34 (C-18)	1 : 150	∅	∅
CD 44/HCAM (Ab-4)	1 : 150	+	+
CD 45 (H-230)	1 : 150	∅	∅
CD 71 (K-20)	1 : 150	∅	∅
CD105/Endoglin (M-20)	1:100	+	+
c-Fos (4)	1 : 50	+	+
Collagen II Ab-2 (2B1.5)	Ön-seyreltilmiş	+	+
Collagen Ia1 (D-13)	1 : 50	+	+
β- Tubulin (KMX-1)	1 : 50	+	+
β –Tubulin	Ön-seyreltilmiş	+	+
Nestin (Rat-401)	1 : 50	+	+
Vimentin (C-20)	1 : 100	+	+
Desmin Ab1 (D33)	Ön-seyreltilmiş	+[1]	+[1]
Fibronectin (EP5)	1 : 100	+	+
α-Smooth Muscle Actin Ab-1	1 : 800	+	+
Actin (C-2)	1 : 50	+	+
MyoD (4H207)	1 : 50	∅	∅
Myosin IIa (A4.74)	1 : 50	+	+
Myogenin Ab-1 (F5D)	Ön-seyreltilmiş	+	+
MAP 2a,b Ab-2 (AP20)	Ön-seyreltilmiş	+	+
GFAP Ab1	Ön-seyreltilmiş	+	+
β3Tubulin (2Q121)	1 : 50	+	+
NSE/γ Enolase	1 : 500	+	+
Osteocalcin (FL-100)	1 : 50	+	+
Osteonectin (SPARC)	1 : 50	+	+

Osteopontin (Akm2A1)	1 : 50	+	+
BMP-2 (N-14)	1 : 50	+	+
BMP-4 (N-16)	1 : 50	+	+
MEPE (LFMb-33)	1 : 50	∅	∅

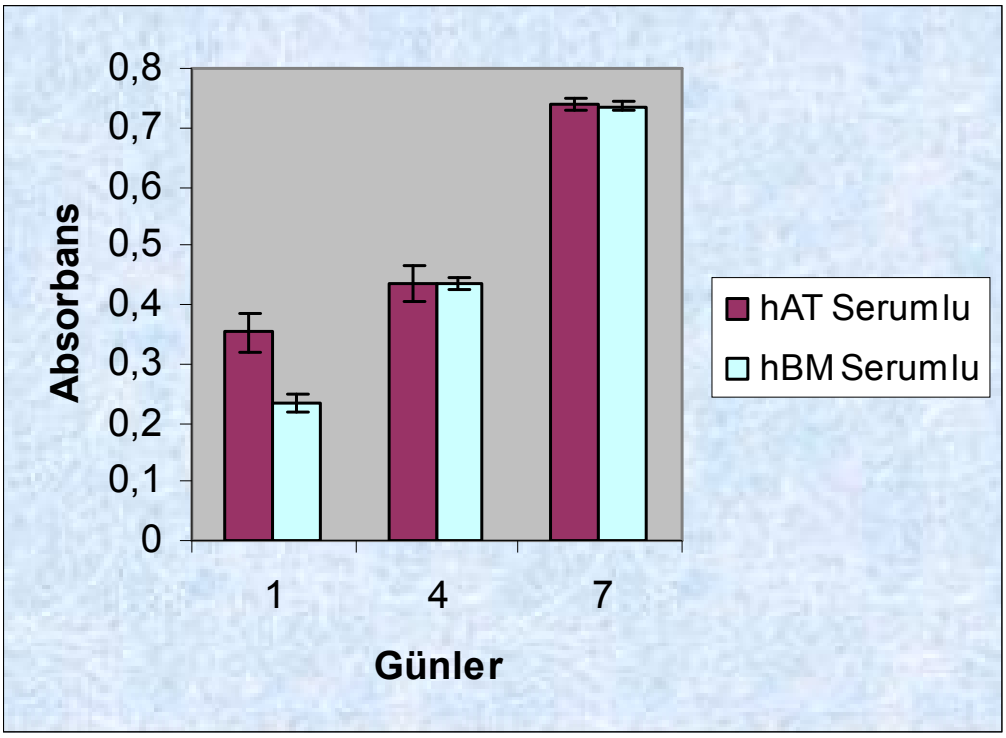
+= Pozitif belirteç ekspresyonu; ∅= ekspresyon yok; -/+= zayıf belirteç ekspresyonu; [1]= İmmunreaktivite %10-20 hücrede pozitif. iAD-İnsan adipoz doku kaynaklı MKH; iKİ-İnsan kemik iliği kaynaklı MKH.

4.3. Kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı MKH'lerin apoptozise yanıtları

4.3.1. Serum eksikliği ile uyarılan apoptozis:

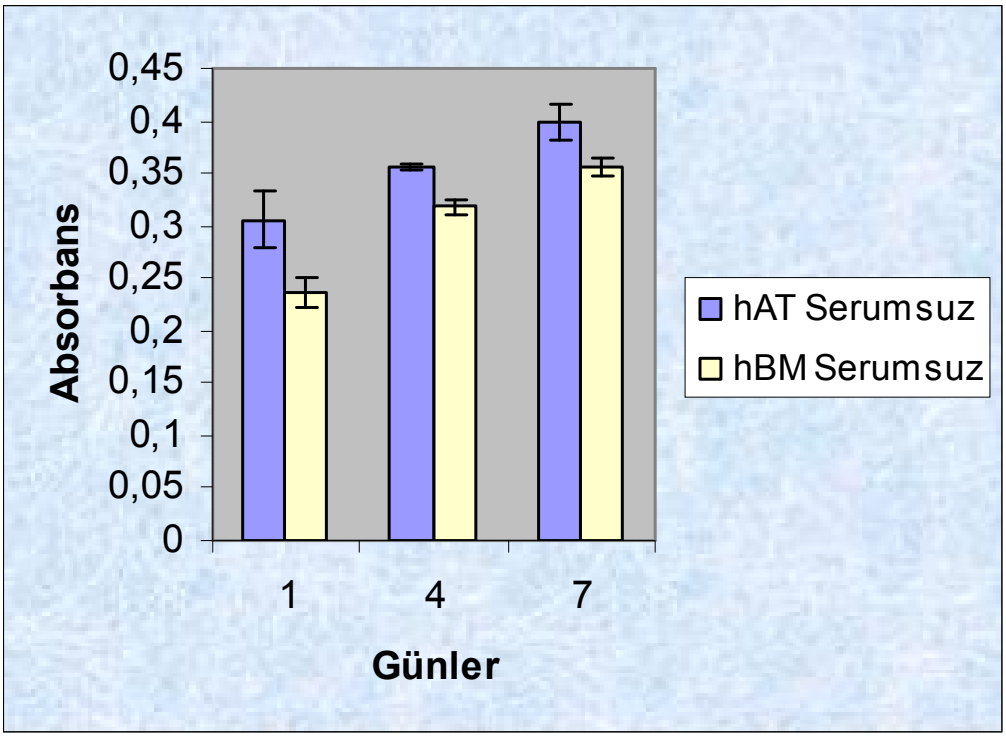
Kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı MKH'leri serumdan yoksun besiyerinde apoptozise dayanıklılıkları canlılık oranları karşılaştırılarak belirlendi. Apoptotik ve canlı hücreler MTT testi ile analiz edildi. 1., 4. ve 7.günlerde kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı MKH'lerinin canlılıklarını gösteren ortalama absorbans değerleri MTT yöntemi ile değerlendirildi.

Serumlu besiyerinde kültürün 1. ve 4.gününde kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı MKH'leri karşılaştırıldığında adipoz doku kaynaklı MKH'lerinin kemik iliği kaynaklı MKH'lerine göre daha hızlı çoğaldığı ve hücrelerin canlılık oranlarının daha yüksek olduğu gözlendi (n=3, iAD-iKİ absorbans değerleri sırasıyla, 1.gün 0,353±0,032–0,232±0,016, P=0.029, 4.gün 0,436±0,032-0,384±0,010, P=0.001). 7.günde ise kemik iliği kaynaklı MKH'leri ve adipoz doku kaynaklı MKH'leri arasında canlılık oranları açısından anlamlı bir farklılık yoktu (n=3, iAD-iKİ absorbans değerleri sırasıyla, 7.gün 0,741±0,010-0,735±0,007, P=0.672) (Şekil-6).

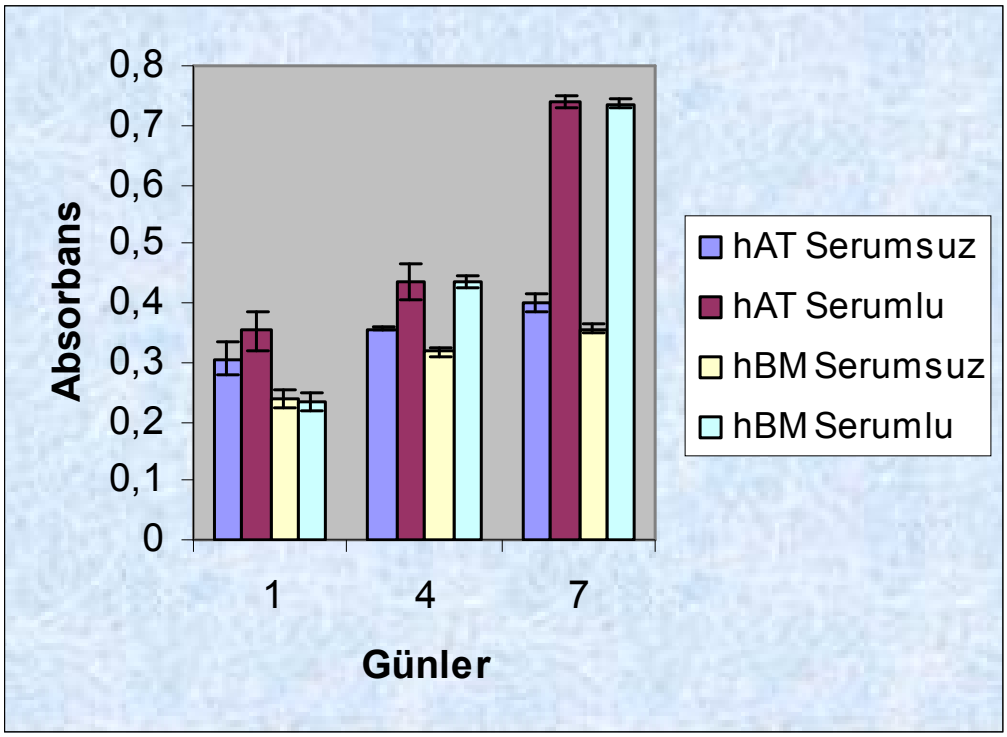


Şekil-6. Kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı MKH'lerinin serumlu besiyerindeki kültürü sonrasında MTT testi ile analiz edilmiş absorbans değerleri (hAT: Human adipose tissue hBM: Human bone marrow).

Kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı MKH'leri serumdan yoksun besiyerinde kültüre edilerek apoptozis uyarılmıştır. Aynı şekilde sonuçlar MTT testi ile analiz edilmiştir. 1. ve 4.günlerde adipoz doku kaynaklı MKH kültüründe kemik iliği kaynaklı MKH'ye göre canlılık oranının daha yüksek olduğu dikkat çekmiştir (Şekil-7,8) (n=3, iAD-iKİ absorbans değerleri sırasıyla, 1.gün 0.305±0.027–0.234±0.015, P=0.042, 4.gün 0.355±0.003-0.318±0.007, P=0.011). 7.günde ise her iki hücre kültürü arasında canlılık oranı bakımından anlamlı bir farklılık izlenmedi (n=3, iAD-iKİ absorbans değerleri sırasıyla, 7.gün 0.400±0.017-0.356±0.008, P=0.081).



Şekil-7. MKH'lerin serumdan yoksun besiyerindeki kültüründe uyarılmış apoptozisin MTT testi ile analiz sonrasındaki absorbans değerleri (hAT: Human adipose tissue hBM: Human bone marrow).



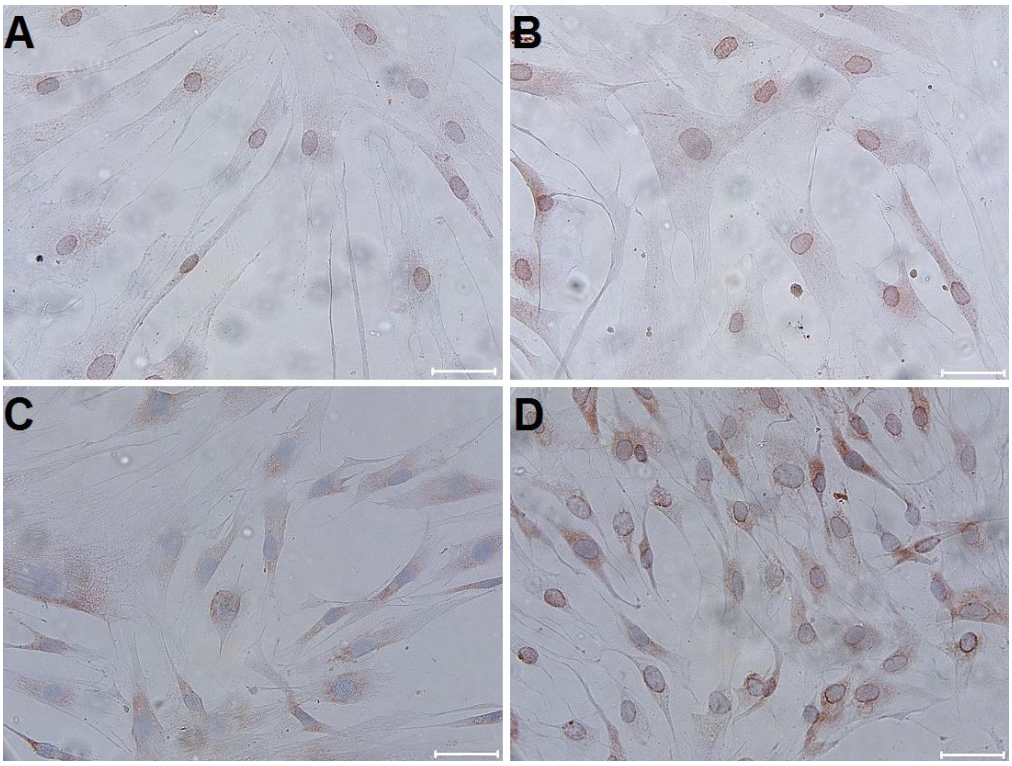
Şekil-8. MKH'lerin serumdan yoksun kültürde uyarılmış apoptozisin kontrol grubuyla karşılaştırmalı MTT testi sonrasında analiz edilmiş absorbans değerleri (hAT: Human adipose tissue hBM: Human bone marrow).

.

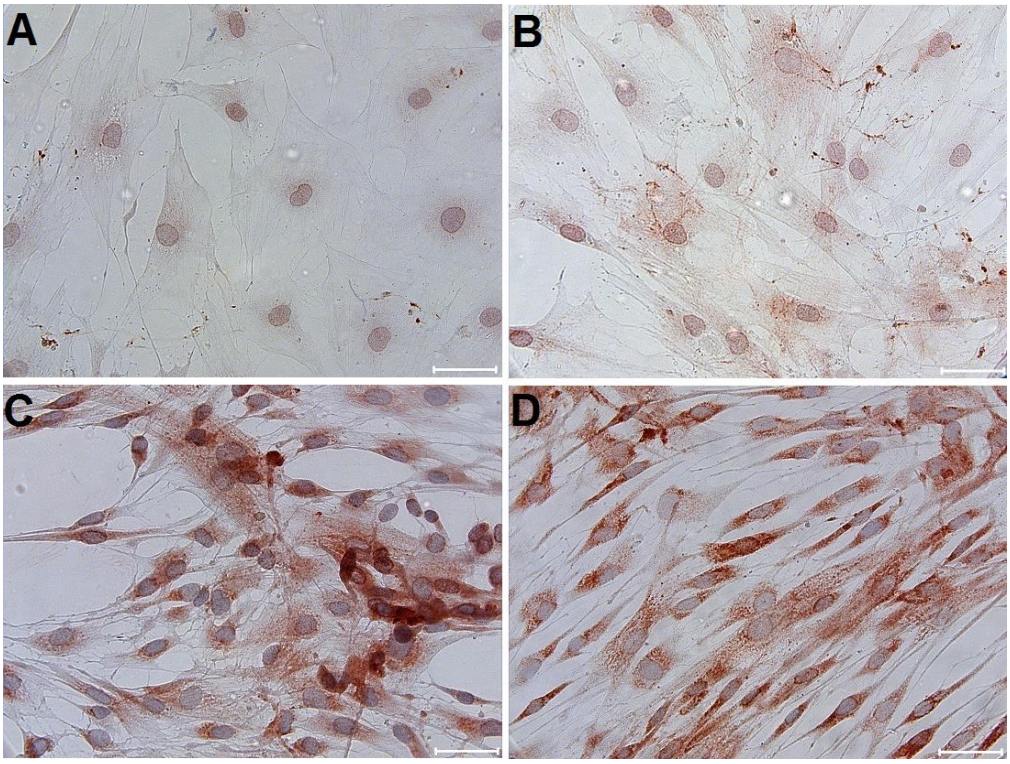
4.3.2. 2 mmol/L H_2O_2 ile uyarılmış apoptozis:

4.3.2.1. Işık Mikroskopi Bulguları

İnsan kemik iliği (iKİ-MKH) ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iAD-MKH), H_2O_2 (2 mmol/L H_2O_2 45 dakika süreyle inkübasyon) ile oluşturulan apoptozis sonrasında hücreler (deney ve kontrol grubuna ait) bir erken apoptoz belirteci olan kaspaz-3 monoklonal antikoru ile inkübe edildi. Kaspaz-3 immünboyanması sonrası H_2O_2 ile inkübe edilmiş ve edilmemiş hücreler karşılaştırmalı olarak mikroskopik düzeyde incelendi (Şekil-9,10). Kontrol hücrelerinin (iKİ- ve iAD-MKH'lerin) kaspaz-3 ile immün boyanması sonrasında beklendiği gibi apoptotik hücre yoğunluğu oldukça az idi (Şekil-9). Bununla birlikte, H_2O_2 ile apoptozun uyarılması sonrasında yapılan immünboyama sonrası mikroskopik incelemelerde, kaspaz-3 ile sitoplazmik ve nükleer boyanma özelliği gösteren hücre sıklığının iKİ-MKH'lerde iAD-MKH'lere oranla belirgin olarak artmış olduğu gözlendi (Şekil-10).



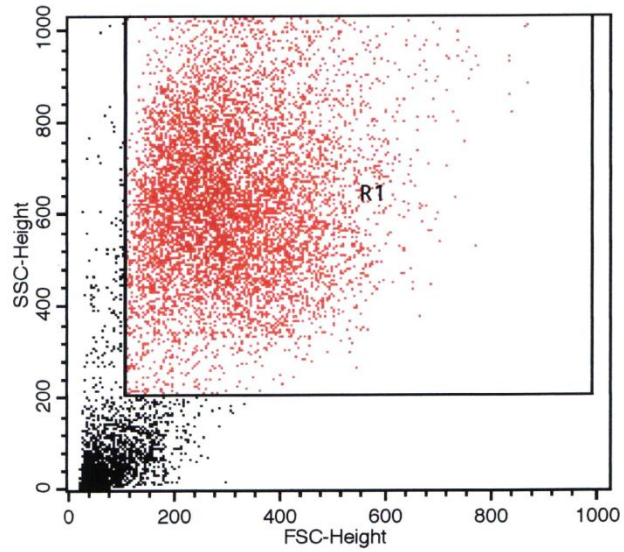
Şekil-9. Kaspaz-3 ile boyanan kontrol grubu hücrelerinin (H_2O_2 ile inkübe edilmemiş hücreler) ışık mikroskopik görünümleri. (**A-B)** iAD-MKH– kontrol grubu. **(C-D)** iKİ-MKH – kontrol grubu (Bar çubuğu: 50 µm).

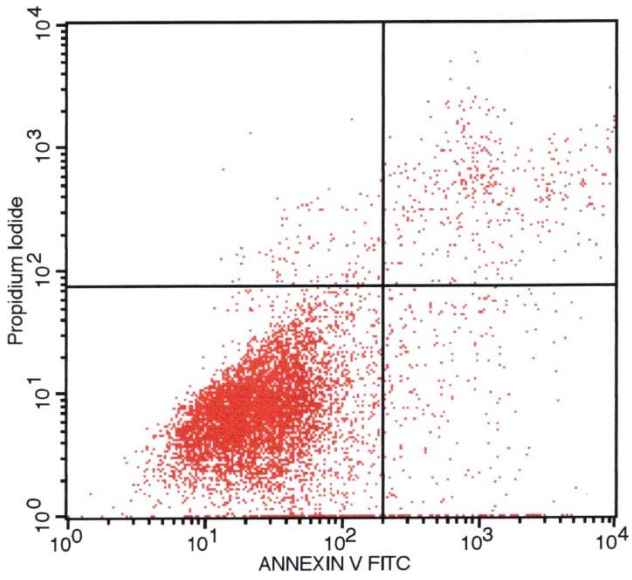


Şekil-10. (A-B) iAD-MKH + H_2O_2 ve **(C-D)** iKİ-MKH + H_2O_2 gruplarına ait hücrelerin kaspaz-3 ile immünohistokimyasal olarak boyanması sonrasında kök hücrelerin ışık mikroskopik görüntüleri. Aynı miktar ve sürede H_2O_2 'e maruz kalmış iAD-MKH'lerinde erken apoptoz belirtisi gösteren hücre yoğunluğunun iKİ-MKH'lere oranla belirgin şekilde az olduğu gözlenmektedir (Bar çubuğu: 50 µm).

4.3.3. Akım Sitometri Bulguları

İmmünohistokimyasal çalışmalarımızla tespit ettiğimiz bulguları sayısal parametrelerle onaylayabilmek için kontrol ve apoptozis için uyarılmış hücreler materyal ve yöntem bölümünde açıklandığı şekilde annexin V kiti ile boyandı ve akım sitometri aygıtında apoptoz oranları tespit edildi (Şekil-11,12,13,14). Kemik iliği kaynaklı MKH'lere nazaran adipoz doku kaynaklı MKH'ler oksidatif strese daha dayanıklı olduğu ve morfolojik olarak daha az değişiklik olduğu izlendi (n=3, iAD-iKİ sırasıyla, 73.02±1.44-58.43±1.24 p=0.002) (Şekil-15). Apoptosis Annexin-V boyama ile doğrulandı.



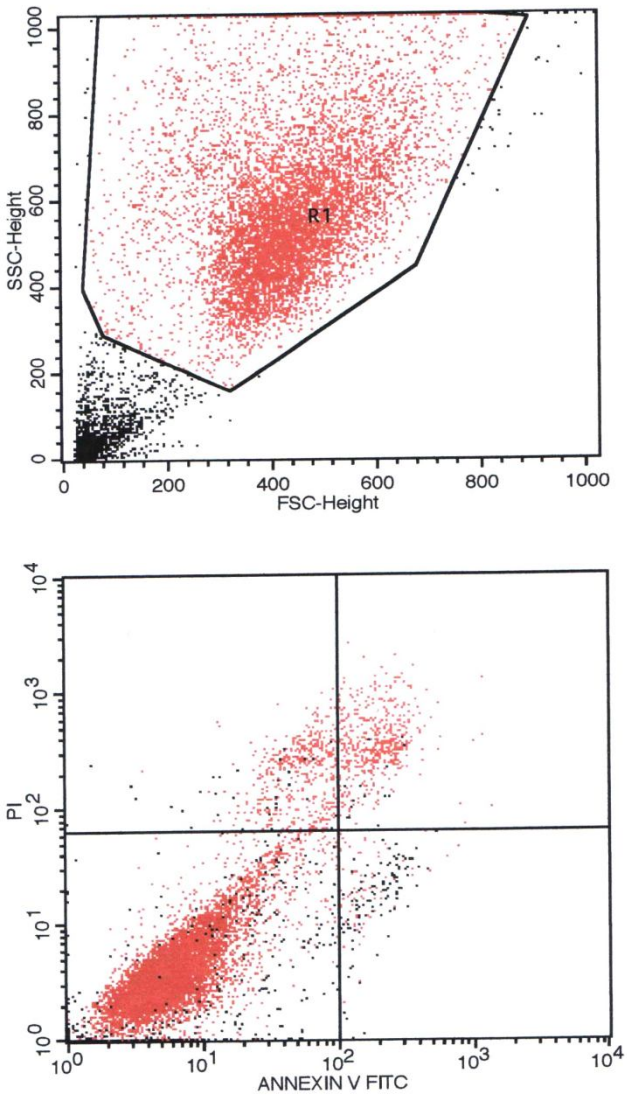


Quadrant Statistics

File: 47.ORNEK-25/12/09.001
Acquisition Date: 25-Dec-09

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	113	1.50	1.13
UR	398	5.30	3.98
LL	6710	89.35	67.10
LR	289	3.85	2.89

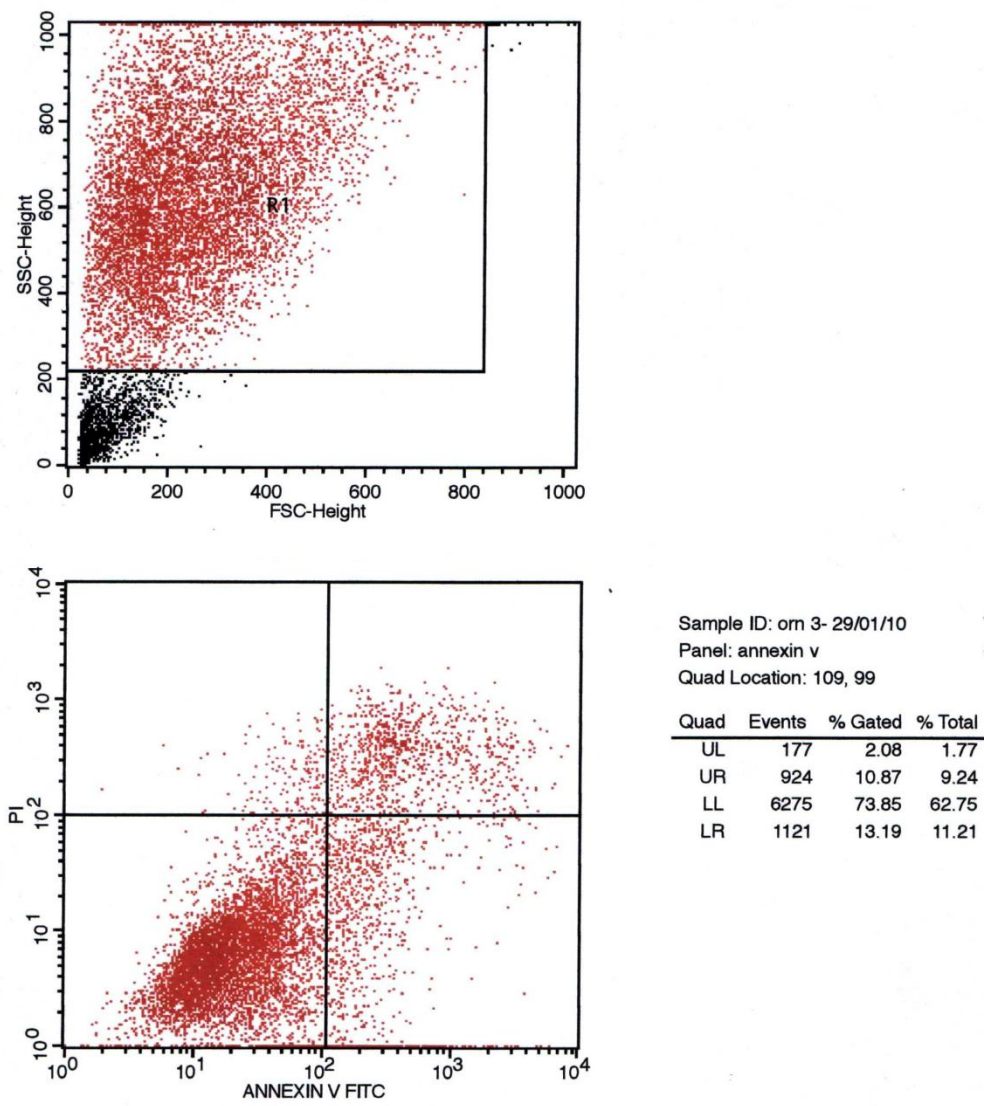
Şekil-11. Kontrol iAD-MKH'lerin annexin V ile boyanması sonrası akım sitometri aygıtında elde edilen verileri. Bu örnekte canlı hücre oranı % 89.35 dir.



Sample ID: ORNEK8- 29/12/09
Acquisition Date: 29-Dec-09
Gate: No Gate

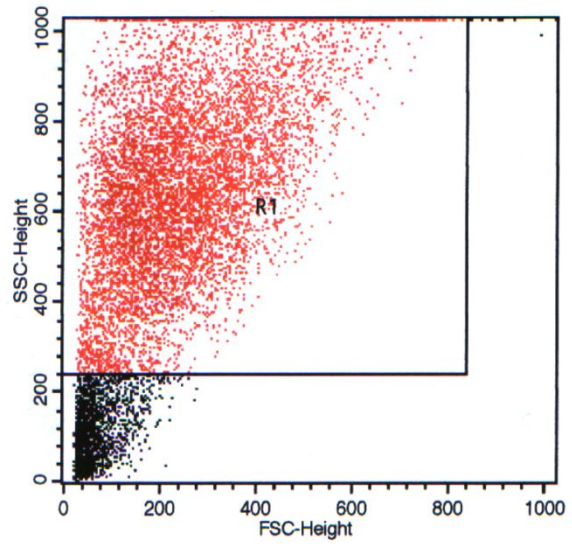
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	482	4.82	4.82
UR	514	5.14	5.14
LL	8823	88.23	88.23
LR	181	1.81	1.81

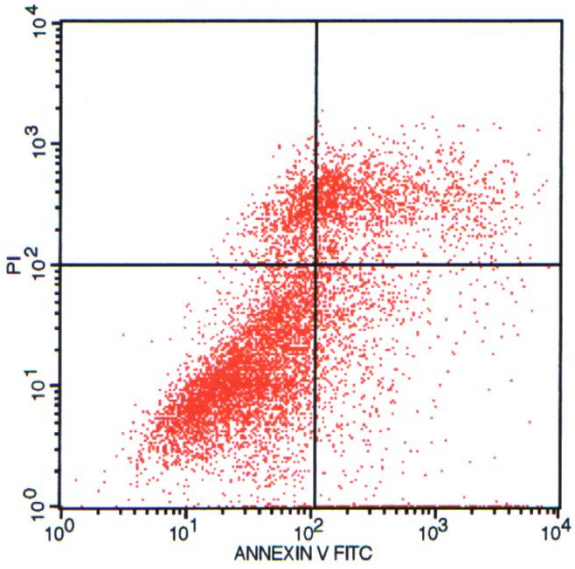
Şekil-12. Kontrol iKİ-MKH'lerin annexin V ile boyanması sonrası akım sitometri aygıtında elde edilen verileri. Bu örnekte canlı hücre oranı % 88.23 dür.



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	177	2.08	1.77
UR	924	10.87	9.24
LL	6275	73.85	62.75
LR	1121	13.19	11.21

Şekil-13. H2O2 ile 45 dakika süreyle inkübe edildikten sonra apoptoz oranlarını belirlemek için annexin V ile boyanması sonrası iAD-MKH'lerin akım sitometri aygıtında elde edilen verileri. Bu örnekte canlı hücre oranı % 73.85 'dir.

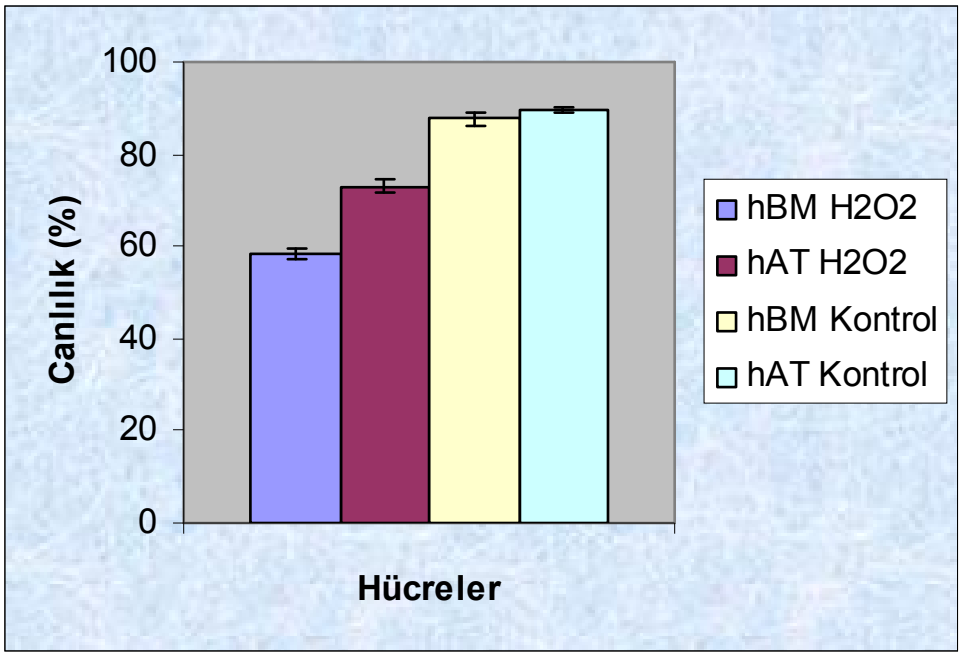




Sample ID: orn 10- 29/01/10
Panel: annexin v
Quad Location: 109, 99

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	712	8.89	7.12
UR	1544	19.27	15.44
LL	4761	59.42	47.61
LR	996	12.43	9.96

Şekil-14. H2O2 ile 45 dakika süreyle inkübe edildikten sonra apoptoz oranlarını belirlemek için annexin V ile boyanması sonrası iKİ-MKH'lerin akım sitometri aygıtında elde edilen verileri. Canlı hücre oranı % 59.42 'dir.



Şekil-15. 2 mmol/L H_2O_2 ile indüklenen apoptozis sonrası MKH'lerin canlılık yüzdelerinin ortalaması. Görüldüğü gibi, adipoz doku kaynaklı MKH'lerin deney sonrası canlılık oranları kemik iliği kaynaklı MKH'lere oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazladır ($p<0.002$).

5. TARTIŞMA

MKH'ler kardiyovasküler hastalığı mevcut olan hastaların tedavisi için umut verici görünmektedir. Bu hücreler osteogenezis imperfekta, multiple sklerozis, romatoid artrit gibi kardiyovasküler dışı hastalıkların tedavisinde de kullanılmıştır. Şu ana kadar yapılmış in-vivo ve in-vitro çalışmalarda en fazla kullanılan kök hücre, kemik iliği kaynaklı MKH'lerdir. Bu hücrelerin etkinliği ve güvenirliği yapılmış olan klinik çalışmalarla onaylanmıştır [30,31]. Fakat, elde edilen sonuçların istenen düzeyde olmaması nedeniyle alternatif uygulama yöntemlerinin ve farklı MKH'lerin kullanılması gündeme gelmiştir. Ayrıca, kemik iliği kaynaklı MKH'lerin elde edilme yöntemi diğer MKH'lerin elde edilme yöntemlerinden daha invaziv ve ağrılıdır. Kıkırdak, adipoz doku, diş pulpası, kordon kanı kaynaklı MKH'lerin etkinliği ve çoğalma kapasitesini araştıran deneylerde yapılmıştır ve bu MKH'leri elde etme yöntemleri daha kolaydır. Bununla birlikte, literatürde insan adipoz doku ve kemik iliği kaynaklı MKH'leri birebir karşılaştıran in-vivo ve in-vitro deneyler çok az sayıdadır. Biz bu çalışmada insan kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı MKH'lerin apoptozise olan dayanıklılıklarını karşılaştırarak klinik çalışmalarda kullanılabilecek ideal hücreyi bulmayı amaçladık.

Çalışmamızın sonucunda temel olarak bulduklarımız kısaca; 1) Adipoz doku kaynaklı MKH'lerin kemik iliği kaynaklı MKH'lere göre daha iyi proliferasyon yeteneğine sahip olduğunu gözlemledik. 2) H_2O_2 ile indüklenen apoptozise adipoz doku kaynaklı MKH'lerin daha dayanaklı olduklarını saptadık. 3) Serumsuz kültürler karşılaştırıldığında, adipoz doku kaynaklı MKH'lerin bulunduğu kültürlerde daha fazla canlı hücre olduğunu tespit ettik. Böylece, adipoz doku kaynaklı MKH'lerin serum eksikliği ile indüklenen apoptozise de daha dirençli olduğunu tespit ettik.

Kern ve ark,nın yaptığı bir çalışmada insandan elde edilmiş kemik iliği, kordon kanı ve adipoz doku kaynaklı MKH'ler morfolojik, çoğalma kapasitesi, farklılaşabilme kapasitesi ve immünfenotipik açıdan karşılaştırılmıştır. Morfolojik ve immünfenotipik olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. İzolasyon başarısı adipoz doku ve kemik iliği kaynaklı MKH'lerde %100 iken, kordon kanı kaynaklı MKH'lerde bu oran % 63 saptanmıştır. Koloni frekansı kordon kanı kaynaklı MKH'lerde en az, adipoz doku kaynaklı MKH'lerde en yüksek saptanmıştır. Buna rağmen en yüksek proliferasyon kapasitesi oranı kordon kanı kaynaklı MKH'lerde, en düşük proliferasyon kapasitesi oranı kemik iliği kaynaklı MKH'lerde gözlemlenmiştir. İlginç olarak, kordon kanı kaynaklı MKH'lerde kemik iliği kaynaklı MKH'lere göre adipojenik farklılaşma izlenmemiştir. Bu çalışmanın sonucunda adipoz doku

ve kordon kanı kaynaklı MKH'lerin kemik iliği kaynaklı MKH'lere iyi bir alternatif olabileceği sonucuna varmışlardır [99]. Ancak, bu çalışmada MKH'lerin anti-apoptotik yetenekleri karşılaştırılmamıştır. Adipoz doku kaynaklı MKH'lerin koloni frekansının kemik iliği kaynaklı MKH'lere göre daha iyi saptanması, adipoz doku kaynaklı hücrelerin kemik iliği kaynaklı MKH'lere altenatif olabileceğini düşündürmektedir.

Peng ve ark, sıçanlardan elde ettikleri kemik iliği, kıkırdak ve adipoz dokudan MKH'leri izole ederek bu hücrelerin immünofenotipik özelliklerini, proliferasyon kapasitelerini, farklılaşma yeteneklerini ve anti-apoptotik yeteneklerini karşılaştırmışlardır. Bizim çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmada sıçanlardan elde edilmiş MKH'ler karşılaştırılmıştır. Büyüme eğrisi, telomeraz aktivitesine bakıldığında en yüksek proliferasyon yeteneğine sahip MKH adipoz doku kaynaklı kök hücre saptanmış. Bu hücreyi kemik iliği kaynaklı MKH ve kıkırdak kaynaklı MKH izlemiştir. Adipoz doku kaynaklı MKH'lerde büyüme eğrisinin analizi ile elde edilen popülasyon yarılanma zamanı (doubling time) 45.2 saat, kemik iliği kaynaklı MKH'lerde 61.2 saat, kıkırdak kaynaklı MKH'lerde 51.4 saat saptanmıştır. Her üç kaynaktan elde edilen MKH'lerde osteojenik, adipojenik, kondrojenik farklılaşabilme yeteneği saptanmıştır. Akış sitometri ve MTT analizleri kıkırdak kaynaklı MKH'lerin H_2O_2 ile uyarılmış apoptozise en yüksek miktarda direnç gösteren MKH olduğunu saptamış. Serum eksikliği ile uyarılmış apoptozisede en dirençli saptanan hücre adipoz doku kaynaklı MKH'ler olduğu izlenmiştir [100].

Kern ve Peng'in çalışmasının ve bizim çalışmamızın saptadığı ortak nokta adipoz doku kaynaklı MKH'lerin kemik iliği kaynaklı MKH'lere göre daha iyi proliferasyon yeteneğine sahip olduğudur. Ayrıca, Peng ve ark, sıçan adipoz doku kaynaklı MKH'lerin sıçan kemik iliği kaynaklı MKH'lere göre apoptozise daha dirençli olduğunu göstermesi ve bizim çalışmamızda da insan adipoz doku kaynaklı MKH'lerin insan kemik iliği kaynaklı MKH'lere göre apoptozise daha dirençli saptanmış olması çalışmaların bir diğer ortak noktasıdır.

Literatürde kemik iliği kaynaklı MKH'leri ve adipoz stromal doku kaynaklı MKH'leri karşılaştıran bir adet in-vivo çalışma mevcuttur. Ancak bu çalışma preklinik bir çalışmadır. Adipoz stromal doku ve kemik iliği kaynaklı MKH'ler farelerden izole edildikten sonra AMİ yapılan farelere intramiyokardiyal olarak enjekte edilmiştir. Kontrol grubunada intramiyokardiyal serum fizyolojik enjekte edilmiştir. Kök hücre naklinden 6 hafta sonra fareler biyolumines görüntüleme ve ekokardiyografi ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak her iki hücre tipininde transplantasyon sonrası kardiyak ortamda yaşayamadığı ve akut donör hücre ölümü gerçekleştiği saptanmıştır. Kök hücre nakli yapılan hücrelerde kardiyak

fonksiyonlar kontrol grubu ile benzer bulunmuştur. Bu çalışmada yüz güldürücü sonuç alınmamasının nedeni hücrelerin erken dönemde ölmesi olarak belirtilmiştir [101].

Nakamura ve ark'nın, yaptığı bir çalışmada transplante edilen MKH'lerin yalnız % 4.4'ünün transplantasyondan 1 hafta sonra yaşadığı gösterilmiştir [102]. Amsalem ve ark, MKH'lerin transplante edilmesinden 4 hafta sonra kardiyak ortamda MKH izlenmediğini bildirmişlerdir [103]. Bu çalışmalardan da anlaşıldığı gibi kök hücre tedavisinin önündeki en büyük problemin nakil yapılan hücrelerin uzun süre kardiyak ortamda yaşayamamasıdır. Bu yüzden araştırmacılar bu konu üzerinde de odaklanmışlardır. P13K/Akt aksı ve stromal-cell-derived faktör 1 (SDF-1)/CXCR4 aksı MKH'lerin kardiyak ortamda yaşabilmesi için araştırılan konuların başında gelmektedir.

P13K/Akt aksı çoğu hücre tipinde hücre yaşamı için rol alan önemli bir mediatör grubudur. Protein kinaz aracılı hücre büyümesi, hücre yaşamının devamı, proliferasyon, metabolizma, gen ekspresyonu ve hücreler arası iletişimi sağlar. Akt (Akt proteini kodlayan gen) ile transfekte olmuş kök hücrelerin miyokart infarktüsü sonrası yeniden şekillenme ve apoptozisi önlediği gösterilmiştir. MKH'ler Akt-1 geni ile transfekte edilerek MKH'lerin kardiyak ortamda yaşayabilmeleri sağlanmıştır, böylece kardiyak fonksiyonlarda da artış sağlanmıştır [104].

SDF-1'de Akt geni gibi kök hücre tedavisinde umut vaad etmektedir. SDF-1, CXC kemokin ailesinin bir üyesidir. SDF-1 etkisini sadece bilinen tek reseptörü CXCR4 üzerinden gösterir. Artan kanıtlar ile SDF-1/CXCR4 aksının yeni damar oluşumunda ve gelişmesinde önemli bir rol aldığı gösterilmiştir. Farklı dokulardan salınır. Kök hücrelerin kemik iliğinde, progenitor hücrelerin kalpte tutulumunu sağlar. Hücre büyümesi, proliferasyon, ani-apoptosis ve embriyogenezis gibi biyolojik fonksiyonları düzenler [105].

6. SONUÇLAR

MKH'lerle kardiyak hastalıkların tedavisi gün geçtikçe ilgi çekmekte ve bu konuda araştırmalar artmaktadır. Kök hücre naklinin kardiyolojide geleceğin vazgeçilmez tedavileri arasına girmesi için hala zamana ihtiyacımız olduğunu söyleyebiliriz. Kemik iliği kaynaklı MKH'lerle yapılmış çalışmaların meteanalizinde AMİ'li hastalarda LVEF'de %2.99 (%95 CI, 1.26-4.72, P=0.0007), kronik iskemik kalp hastalığı olan hastalarda %5.85 (%95 CI, 2.50-9.19, P=0.0006) artış sağlanmıştır [30,31]. Elbette bu sonuçlar istenen düzeyde değildir. Kök hücre nakli sonrası yapılan görüntüleme çalışmaları, kök hücre tedavisinde neden kötü sonuçlar elde edildiğini gözler önüne sermektedir. Nakil sonrası hücrelerin apoptozise uğrayarak ölmesi ve kardiyak hücrelere farklılaşmasının yeterli olmaması temel nedenlerdendir [101-103].

Bu yüzden alternatif uygulama yöntemleri, hücre tipleri ve kök hücre yaşamını sağlayacak gen tedavileri araştırılmıştır. Biz çalışmamızda adipoz doku kaynaklı MKH'lerin kemik iliği kaynaklı MKH'lere göre daha iyi prolifere olduğunu ve apoptozise daha dirençli olduğunu in-vitro ortamda gösterdik. Adipoz doku kaynaklı MKH'lerin kemik iliği kaynaklı MKH'lere daha iyi bir alternatif olabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca adipoz doku kaynaklı MKH'lerin elde edilmesi daha kolay ve ağrısızdır. İki kök hücre tipini karşılaştıran bir klinik çalışma henüz mevcut değildir. Adipoz doku kaynaklı MKH'lerin etkinliğini ve güvenirliğini araştıran APOLLO çalışmasının 2011'de sonuçlanacağı tahmin ediliyor. SDF-1 veya Akt geni ile transfekte edilmiş adipoz doku kaynaklı MKH'lerle yüz güldürücü sonuçlar alınabileceğini düşünmekteyiz. Sonuç olarak, kardiyolojide kök hücre tedavisinde adipoz doku kaynaklı MKH'ler kemik iliği kaynaklı MKH'lere iyi bir alternatif olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1- Rosamond W, Flegal K, Friday G, et al. Heart Disease and stroke statistics—2007 update. A report from the American heart association statistics committee and stroke statistics subcommittee. Circulation 2007; 115: 69.

2- Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadai-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Chimerism of the transplanted heart. N Engl J Med 2002; 346: 5-15.

3- Müller P, Pfeiffer P, Koglin J, Schafers HJ, Seeland U, Janzen I, Urbschat S, Böhm M. Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. Circulation 2002; 106: 31.

4- Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE, Murry CE. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. Circ Res 2002; 90: 634-640.

5- Gill C, Mestril R, Samali A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease—a novel therapeutic target? FASEB J 2002; 16: 135–146.

6- Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis : Basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. Circ Res 1998; 82: 1111-1129.

7- Davis RC, Hobbs FDR, Lip GYH. ABC of heart failure: history and epidemiology. BMJ 2000; 320: 39-42.

8- Hassink RJ, Dowell JD, Brutel dlR, Doevendans PA, Field LJ. Stem cell therapy for ischemic heart disease. Trends Mol Med 2003; 9: 436-441.

9- Zwaginga JJ, Doevendans P. Stem cell-derived angiogenic/vasculogenic cells: possible therapies for tissue repair and tissue engineering. Clin Exp Pharmacol Physio l 2003; 30: 900-908.

10- Gepstein L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. Circ Res 2002; 91: 866-876.

11- Heng BC, Haider HK, Sim EK, Cao T, Ng SC. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. Cardiovasc Res 2004; 62: 34-42.

12- Hodgson DM, Behfar A, Zingman LV, Kane GC, Perez-Terzic C, Alekseev AE, Puceat M., Terzic A. Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction, Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 287: H471-H479.

13- Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, Huber I, Satin J, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 2004; 22: 1282-1289.

14- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282: 1145-1147.

15- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997; 275: 964-967.

16- Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays. Cell Stem Cell 2008; 2: 313–319.

17- Chen FH, Rousche KT, Tuan RS. Technology Insight: Adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. Nat Clin Pract Rheumatol 2006; 2: 373–382.

18- Menasché P, Hagège AA, Scorsin M et al. Myoblast transplantation for heart failure. Lancet 2001; 357: 279-280.

19- Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, Bountioukos M, Onderwater EE, Lee CH et al. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. J Am Coll Cardiol. 2003; 42: 2063-2069.

20- Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. Lancet 2003; 361: 45-46.

21- Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT et al. Transendocadial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. Circulation 2003; 107: 2294-2302.

22- Siminiak T, Fiszer D, Jerzykowska O, Grygielska B, Rozwadowska N, Kalmucki P, et al. Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial. Eur Heart J 2005;26:1188-1195.

23- Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI trial. J Am Coll Cardiol 2004; 44: 1690-1699.

24- Wollert KC, Meyer GP, Latz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breindenbach C et al. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. Lancet 2004; 364:141-148.

25- Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H et al. Intracoronary infusion of bone marrow derived progenitor cells in acute myocardial

infarction: a randomised, double-blind, placebo-controlled multicenter trial (REPAIR-AMI). Circulation 2005; 112: 3362.

26- Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Eckard H, Rehders T, Burska D et al. Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by granulocyte colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI) trial. Circulation 2005; 112: I73-I80.

27- Ripa RS, Jorgensen E, Wang Y, Thune JJ, Nilsson JC, Sondergaard L et al. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte colony-stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute st-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. Circulation 2006; 113: 1983-1992.

28- Zohlnhöfer D, Ott I, Mehilli J, Schömig K, Michalk F, Ibrahim T et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. JAMA 2006; 295: 1003-1010.

29- Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. Eur Heart J 2006; 27:1114-1122.

30- Brunskill SJ, Hyde CJ, Doree CJ, Watt SM, Martin-Rendon E. Route of delivery and baseline left ventricular ejection fraction, key factors of bone-marrow derived cell therapy for ischaemic heart disease. Eur Journal of Heart Fail 2009;11:887–896.

31- Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, Stanworth SJ, Mathur A, Watt SM. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. Eur Heart J 2008;29:1807–1818.

32- Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol 2003; 41: 1078-1083.

33- Makkar RR, Lill M, Chen PS. Stem cell therapy for myocardial repair. Is it arrhythmogenic? J Am Coll Cardiol 2003; 42: 2070-2072.

34- Katritsis DG, Sotiropoulou P, Giazitzoglou E, Karvouni E, Papamichail M. Electrophsiological effects of intracoronary transplantation of autologous mesenchymal and endothelial progenitor cells. Europace 2007; 9: 167-171.

35- Caplice NM, Bunch TJ, Stalboerger PG, Wang S, Simper D, Miller DV et al. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 4754-4759.

36- Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. Lancet 2004; 363: 751-756.

37- Kang HJ, Lee HY, Na SH, et al. Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and remodeling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: The MAGIC Cell-3-DES randomized, controlled trial. Circulation 2006; 114: I145-I151.

38- Assmus B, Walter DH, Lehmann R, Honold J, Martin H, Dimmeler S et al. Intracoronary infusion of progenitor cells is not associated with aggravated restenosis development or atherosclerotic disease progression in patients with acute myocardial infarction. Eur Heart J 2006; 27: 2989-2995.

39- Davidoff AM, Ng CY, Brown P, Leary MA, Spurbeck WW, Zhou J et al. Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. Clin Cancer Res 2001; 7: 2870-2879.

40- Suuronen EJ, Price J, Veinot JP, Ascah K, Kapila V, MD, Guo X-W, Wong S, Mesana TG, Ruel M. Comparative effects of mesenchymal progenitor cells, endothelial progenitor cells, or their combination on myocardial infarct regeneration and cardiac function. J Thorac Cardiovasc Surg 2007; 134: 1249-58.

41- van der Bogt KEA, Sheikh AY, Schrepfer S, Hoyt G, Cao F, Ransohoff KJ, Swijnenburg R-J, Pearl J, Lee A, Fischbein M, Contag CH, Robbins RC, Wu JC. Comparison of different adult stem cell types for treatment of myocardial ischemia. Circulation 2008; 118: 121–129.

42- van der Bogt KEA, Schrepfer S, Yu J, Sheikh AY, Hoyt G, Govaert JA, Velotta JB, Contag CH, Robbins RC, Wu JC. Comparison of transplantation of adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the infarcted heart. Transplantation 2009; 87: 642–652.

43- Jiang C-Y, Gui C, He A-N, Hu X-Y, Chen J, Jiang Y, Wang J-A. Optimal time for mesenchymal stem cell transplantation in rats with myocardial infarction. J Zhejiang Univ Sci B 2008; 630: 630-637.

44- Alles A, Alley K, Barrett JC et al. Apoptosis: a general comment. FASEB J 1991; 5: 2127-8.

45- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-57.

46- Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. Pathol Ann 1982; 17: 229-59.

47- Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA: Apoptosis: definition,mechanisms, and relevance to disease. Am J Med 1999; 107: 489-506.

48- Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. CHEST 2000; 117: 1771-7.

49- Tomatır AG. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. T Klin J Med Sci 2003; 23: 499-508.

50- Israels LG, Israels ED. Apoptosis. The oncologist 1999; 4: 332-9.

51- Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? BMJ 2001; 322:1536-8.

52- Budihardjo I, Oliver HLM. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annu Rev Cell Dev Biol 1999; 15: 269-90.

53- Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and Apoptosis. Annu Rev Microbiol 1999; 53: 577-628.

54- Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. Sendrom 2001; 13:102-7.

55- Johnson DE. Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. Leukemia 2000; 14: 1340-44.

56- Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. PNAS 2001; 98:13884-8.

57- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. Annu Rev Biochem 2000; 69:217-45.

58- Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. Biofactors 1998; 8:1-5.

59- McCarthy NJ, Evan GI. Methods for detecting and quantifying apoptosis. Curr Top Dev Biol 1998; 36: 259-78.

60- Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. Neuroreport 1995; 7: 61-4.

61- van Heerde WL, Robert-Offerman S, Dumont E, et al. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. Cardiovasc Res 2000; 45: 549-59.

62- Fadok VA, Savill JS, Haslett C, et al. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. J Immunol 1992; 149: 4029-35.

63- Fox JC, Patel VV. Apoptosis and cardiovascular system. ACC Curr J Rev 1998; 7: 13-5.

64- Kültürsay H, Kayıkçıoğlu M. Apopitozis ve kardiyovasküler hastalıklar. Anadolu Kardiyol Derg 2002; 4: 323-9.

65- James T.N. Apoptosis in cardiac disease. Am J Med 1999; 107: 606-20.

66- James T.N. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart: from postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. Circulation 1994; 90: 556-73.

67- Brechenmacher C, Fauchier JP, James TN. Persistent fetal dispersion of the atrioventricular node. Association with the Wolf-Parkinson-White syndrome. Arch Intern Med 1980; 140: 377-82.

68- Fisher SA, Langille BL, Srivastava D. Apoptosis during cardiovascular development Circ Res 2000; 87: 856-64.

69- Uhl HSM. Uhl's anomaly revisited. Circulation 1996; 93: 1483-4.

70- James TN, Nichols MM, Sapire DW, et al. Complete heart block and fatal right ventricular failure in an infant. A clinicopathologic conference describing massive apoptosis selectively destroying the entire right ventricle and the His bundle in an infant with complete heart block: significance for understanding the pathogenesis of Uhl's anomaly and arrhythmogenic right ventricular dysplasia. Circulation 1996; 93:1588-600.

71- Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, et al. Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. NEJM 1996; 335:1190-6.

72- Valente M, Calabrese F, Thiene G, et al. In vivo evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Am J Pathol 1998; 152:479-84.

73- Brink AJ , Torrington M. Progressive familial heart block-two types. South African Med. J 1977; 52: 53-9.

74- James TN, St. Martin E, Willis PW, Lohr TO. Apoptosis as a possible cause of gradual development of complete heart block and fatal arrhythmias associated with absence of the AV node, the sinus node and the internodal pathways. Circulation 1996; 93: 1424-30.

75- Brugada J, Brugada R, Brugada P. Right bundle-branch block and ST-segment elevation in leads V1 through V3. A marker for sudden death in patients without demonstrable structural heart disease. Circulation 1998; 97: 457-60.

76- James TN, Alperin JB. Apoptotic myocardial degeneration in thrombotic thrombocytopenic purpura. Apoptosis 1997; 2: 384-94.

77- Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium.Circ Res 1996; 79: 949-56.

78- Lyn D, Liu X, Bennett NA, Emmett NL. Gene expression profile in mouse myocardium after ischemia. Physiol Genomics 2000; 2: 93-100.

79- Chen C, Ma L, Linfert DR,et al. Myocardial cell death and apoptosis in hibernating myocardium.J Am Coll Cardiol 1997; 30: 1407-12.

80- Gottlieb RA, Gruol DL, Zhu JY, Engler RL. Preconditioning in rabbit cardiomyocytes. Role of pH, vacuolar proton ATPase, and apoptosis. J Clin Investig 1996; 97: 2391-8.

81- Piot CA, Padmanaban D, Ursell PC, et al. Ischemic preconditioning decreases apoptosis in rat hearts in vivo. Circulation 1997; 96: 1598-604.

82- James TN. The variable morphological coexistence of apoptosis and necrosis in human myocardial infarction: significance for understanding its pathogenesis, clinical course, diagnosis and prognosis. Cor Artery Dis 1998; 9: 291-307.

83- Kajstura J., Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. Lab Investig 1996; 74: 86-107.

84- Sabbah HN. Apoptotic cell death in heart failure. Cardiovasc Res 2000; 45: 704-12.

85- Feuerstein G, Ruffolo RR, Yue T. Apoptosis and heart failure. Trends Cardiovasc Med 1997; 7: 249-55.

86- Ferrari R. Tumor necrosis factor in CHF: a double facet cytokine.Cardiovasc Res 1998; 37: 554-9.

87- Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. Circulation 1998; 97: 276-81.

88- Goussev A, Sharov VG, Shimoyama H, et al. Effects of ACE inhibition on cardiomyocyte apoptosis in dogs with heart failure. Am J Physiol 1998; 275: H626-31.

89- Haunstetter A, Izumo S. Future perspectives and potential implications of cardiac myocyte apoptosis. Cardiovasc Res 2000; 45: 795-801.

90- Feuerstein G, Yue TL, Ma X, Ruffolo RR. Novel mechanisms in the treatment of heart failure: inhibition of oxygen radicals and apoptosis by carvedilol. Prog Cardiovasc Dis 1998; 41: 17-24.

91- Kockx MM, Knaapen MW. The role of apoptosis in vascular disease. J Pathol 2000; 190: 267-80.

92- Kockx MM, Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? Cardiovasc Res 2000; 45: 736-46.

93- Pollman MJ. Hall JL, Mann MJ, Zhang GH, Gibbons L. Inhibition of neointimal cell Bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. Nat Med 1998; 4: 222-7.

94- Kockx MM, De Meyer GRY, Muhring J, et al. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. Circulation 1998; 97: 2307-15.

95- Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. Circ Res 1999; 84: 253-6.

96- Kockx MM, Seye C, De Meyer GR , Knaapen MW. Decreased apoptosis and tissue factor expression after lipid lowering. Circulation 2000; 102: E99.

97- Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. Blood 1997; 87: 2429-42.

98- Greeno EW, Bach RR, Moldow CF. Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity. Lab Invest 1996; 75: 281-9.

99- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem cells 2006; 24: 1294–1301.

100- Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, Ma K, Zhou C. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. Stem cells and development. 2008; 17: 761–774.

101- van der Bogt KEA, Schrepfer S, Yu J, Sheikh AY, Hoyt G, Govaert JA, Velotta JB, Contag CH, Robbins RC, Wu JC. Comparison of transplantation of adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the infarcted heart. Transplantation 2009; 87: 642–652.

102- Nakamura Y, Wang X, Xu C, et al. Xenotransplantation of long-term cultured swine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells 2007; 25: 612.

103- Amsalem Y, Mardor Y, Feinberg MS, et al. Iron-oxide labeling and outcome of transplanted mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium. Circulation 2007; 116 (11suppl): I38.

104- Mangi AA, Noiseux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. Nat Med 2003; 9: 1195.

105- Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner K, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. Lancet 2003; 362: 697–703.