



Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi

<http://www.cumhuriyet.edu.tr/sbe/index.php?cubid=1&Dil=TR&Id=1057>

Kobaylarda Olfaktör Kök Hücre İzolasyonu ve Nörojenik Farklılaşması

Yusuf M.Durna¹, Olga Nehir Öztel², Deniz Tuna Edizer², Özgür Yiğit², Sevgi Durna Daştan³,
Ercüment Ovalı⁴, Taner Daştan⁵

¹ Kırklareli Lüleburgaz Devlet Hastanesi, Kulak Burun Boğaz Kliniği, Kırklareli

² İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kulak Burun Boğaz Kliniği, İstanbul

³ Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyometri ve Genetik AD, Sivas

⁴ Acıbadem LabCell Hücre Laboratuvarı ve Kordon Kanı Bankası, İstanbul

⁵ Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Organik Kimya AD, Elazığ

Geliş Tarihi / Received	Kabul Tarihi / Accepted	Yayın Tarihi / Published
20.06.2016	30.06.2016	31.07.2016

Özet: Kök hücreler organizmayı oluşturan ve organizmanın yaşamı boyunca birçok hücre tipine farklılaşabilme, kendini yenileyebilme ve çoğalabilme yeteneğine sahip özel hücrelerdir. Her doku iyice farklılaşmış, özelleşmiş karmaşık özelliklere sahip olsa da, kendilerine ait kök hücrelere sahip oldukları son zamanlarda deneysel uygulamalarla da bildirilmektedir. Kök hücrelerin iyileştirici, yenileştirici, gençleştirici uygulamalardaki fonksiyonel rolleri şiddetle vurgulanmaktadır. Olgun kök hücrelerin uygun besiyeri şartlarında, uygun zamanda yapılmış, yeterli uyarılarla farklı hücre ve farklılaşmış dokulara dönüşebildiğini gösteren pek çok çalışma vardır. Tıbbi tedavileri destekleyen kök hücre uygulamaları, teknolojinin gelişimiyle birlikte ortaya çıkan mühendislik ürünleri ve uygun biyolojik faktörlerin kullanımıyla birlikte hastalıkların tedavi edilmesine bağlı olarak rejeneratif tıp alanında da yeni yaklaşımlar ortaya çıkmaktadır. In vitro koşullarda çok sayıda hücre çeşidine farklılaşma kapasitesi taşıyan kök hücrelerin sağlıklı ve fonksiyonel olarak izolasyonu rejeneratif tıp alanında büyük heyecan ve istek uyandırmaktadır. Çeşitli amaçlarla farklı hücre hatlarını elde etmeye yönelik yöntem ve protokoller sürekli geliştirilmektedir. İstenen hücre hatlarında farklılaşmayı sağlamak üzere özel büyüme geliştirici kombinasyonları, hücre - hücre ve hücre- çevre etkileşimlerini iyileştiren polimer sistemleri araştırılmaktadır. Bizim şu anki çalışmamızda kobaylarda fonksiyonel olfaktör kök hücre izolasyonu, uygun ortamda olfaktör kök hücre üretimi ve nörolojik farklılaştırma yapabilmek hedeflenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kök hücre, Klinik uygulamalar, Rejeneratif tıp, Farklılaşma

Isolation of Olfactory Stem Cells and Neurogenic Differentiation in Guinea Pigs

Abstract: Stem cells are special cells that form the organism and have the ability to differentiate into many cell types throughout the life of the organism, self-renew and proliferate. Although each tissue has thoroughly differentiated, specialized and complex properties, recent experimental applications also report that they have their own stem cells. Functional roles of stem cells are strongly emphasized in

rehabilitative, regenerative and rejuvenating applications. There are many studies showing that adult stem cells may be transformed into different cells and differentiated tissues with sufficient warnings made at the appropriate time, under suitable medium conditions. New approaches also emerge in regenerative medicine depending on the treatment of diseases together with the use of appropriate biological factors and engineering products that emerge with the development of technologies and stem cell applications supporting medical treatments. A healthy and functional isolation of stem cells that are capable of differentiating into various cell types under in vitro conditions arouses great excitement and aspiration in the field of regenerative medicine. Methods and protocols are continually being developed to obtain different cell lines for various purposes. In order to provide differentiation in the desired cell lines, special growth-promoting combinations, and polymer systems that improve cell - cell and cell - environment interactions are investigated. In the current study, it was aimed to perform functional olfactory stem cell isolation in guinea pigs, olfactory stem cell production and neurogenic differentiation in the appropriate environment.

Keywords: Stem cell, Clinical applications, Regenerative medicine, Differentiation

Sorumlu yazar: adı, Sevgi Durna DAŞTAN,
Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Biyometri ve Genetik AD, Sivas- TÜRKİYE
e-mail: sdurna@cumhuriyet.edu.tr

GİRİŞ

Kök hücreler organizmayı oluşturan ve organizmanın yaşamı boyunca birçok hücre tipine farklılaşabilme, kendini yenileyebilme ve çoğalabilme yeteneğine sahip özel hücrelerdir (10). Uygun koşullarda farklılaşarak çeşitli doku ve organları oluşturan farklı hücrelere dönüşebilme özelliğine sahip olan kök hücreler bu özellikleri ile günümüzde tıbbın birçok alanında ve doku mühendisliği çalışmalarında yoğun şekilde kullanılmaktadır. Gelecekte, kök hücreler bu özellikleri ile hasar görmüş doku veya organların hücresele tedavisinde uygulanabilme potansiyeline sahiptir. Kök hücreler, birçok araştırmacının ilgisini çekmiş ve kemik iliği başta olmak üzere, birçok kök hücre kaynağını kullanarak yapılan araştırmalar ve uygulamalar sonucu, "rejenaratif tıp" kavramı gelişmiştir (5). Elde edildikleri kaynaklara göre farklı farklılaşma potansiyellerine sahip olan kök hücreler ile yapılan çalışmalar, hücrelerin elde edildiği kaynaklar ve kullanım alanları, birçok tartışmayı da beraberinde getirmiştir (3, 9,12, 17).

Kök hücreler kemik iliği dışında yağ dokusu, kas dokusu, tükrük bezi, sinoviyal sıvı, plasenta ve olfaktör dokudan elde edilebilmektedir (3). Yapılan birçok çalışma göstermiştir ki olfaktör mukozada nöral ve nöral olmayan bileşenlerden

oluşan bir kök hücre hattı bulunmaktadır (9). Olfaktör kök hücrelerin nörojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (18). Olfaktör kök hücrelerin spinal kord travmalarına bağlı hasarların ve çeşitli nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde etkili olabileceği belirtilmektedir (7).

Kök hücreler genellikle normoksik veya son yıllarda popülerite kazanmaya başlayan hipoksik ortamda üretilebilmektedir. Hipoksik ortamda hazırlanan kök hücrelerin engraftman, yaşam süresi ve parakrin özelliğinin arttığı bildirilmiştir (19). Hipoksiye bağlı olarak hücre proliferasyonu ve migrasyonu, anjiogenez ve antioksidan etki ile ilgili kemoattraktanların ve büyüme faktörlerinin ekspresyonunda artış sağlandığı gösterilmiştir (4).

Çalışmamızda kobaylarda olfaktör kök hücre izolasyonu sonrası olfaktör kök hücre üretimi sağlanarak, deneysel olarak olfaktör kök hücrelerin nörojenik diferansiasyonunu göstermek hedeflenmiştir.

MATERYAL VE METOD

Çalışmadaki kobaylar Yerel Etik Kurulu'ndan alınan **2013/140** sayılı etik kurul onayı ile kullanılmıştır. Hayvan deneyleri Deney Hayvanı Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışma esnasında 5199 numaralı "Hayvanları Koruma Kanunu" ve Tarım ve Köy İşleri Bakanlığının deneysel ve

diğer bilimsel amaçlar için kullanılan deney hayvanlarının korunması, deney hayvanlarının üretim yerleri ile deney yapacak olan laboratuvarların kuruluş, çalışma, denetleme, usul ve esaslarına dair yönetmeliğine ve Helsinki Bildirgesi'nin deney hayvanları ile ilgili maddelerine uyulmuştur.

Deney Hayvan Uygulamaları

Çalışmamızda 6 adet 6-8 haftalık yaklaşık ağırlıkları 500-658 gr arası olan dişi kobaylar (Guinea pig, *Caviaporcellus*) kullanıldı ve 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık siklusunda, 25 °C sıcaklıkta, serbest besin ve su alabildikleri bir ortam hazırlandı.

Kobaylar intraperitoneal sodyum tiopental (120 mg/kg) kullanarak sakrifiye edildi. Seperatör yardımı ile kobayların kraniumu sagital planda açıldı. Olfaktör bölge mikroskop yardımı ile ortaya konuldu(Zeiss OPMI®; Carl Zeiss, Goettingen, Germany). Olfaktör mukoza eksize edilerek soğuk zincir sağlanarak kök hücre laboratuvarına ulaştırıldı.

Olfaktör Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü

Kobayın olfaktör bölgesinden alınan olfaktör mukoza tripsin-kollejenaz vasıtası ile enzimatik disseksiyona alındıktan sonra 800 g'de santrifügasyon ile hücrelerinden ayrıldı. Elde edilen hücreler primer kültür oluşturmak için T-150 flaskta %1 antibiyotik, %10 Fetal Bovine Serum (FBS) içeren Düşük Glikozlu Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu (DMEM-LG) içerisinde 37 C° ortam şartları sağlanarak kültüre edildi. Primer kültür süreci tamamlanan hücreler tripsinle kaldırılarak aynı besiyeri ortamında tekrar kültüre alındı . Bu şekilde pasajlama işlemleri yapıldı. Bu işlemler sırasında 3 günde bir besiyeri değiştirilen flasktaki hücrelerin %70 konfluense ulaşması beklendi. Primer kültür süreci tamamlanan hücreler tripsinle kaldırılarak aynı besiyeri ortamında tekrar kültüre alındı

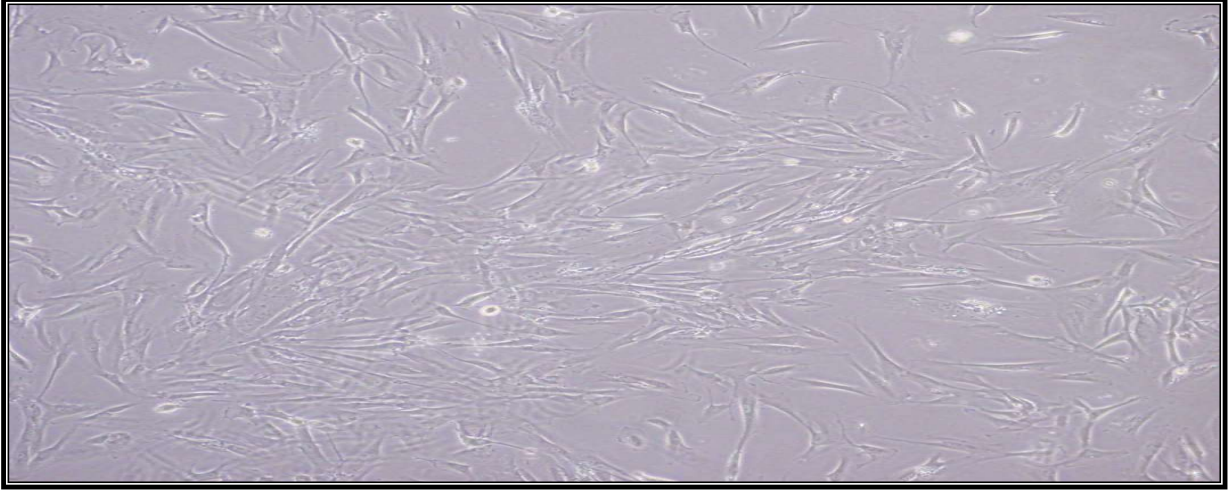
(birinci pasaj) (Resim 1). Birinci pasaj sürecinde flasktaki hücreler \geq %70 konfluense ulaştıktan sonra tripsin ile kaldırılarak FBS ile yıkaması yapıldıktan sonra %1 penisilin ve %10 FBS içeren DMEM-LG ile resüspanse edildi (ikinci pasaj) (Resim 2). Hücre süspanسیونundan kalite kontrol testleri için örnek alındı ve üretim sonunda %80 üzerinde canlı hücre olması (üretim öncesi en az 20.000, üretim sonrası en az 20.000.000 hücre) arandı. Akım sitometrik analizde, CD73, CD105, CD90 pozitif, CD34, CD45, HLA-DR negatif olduğu gösterildi.

Olfaktör Kök Hücrelerin Nörojenik Farklılaştırılması

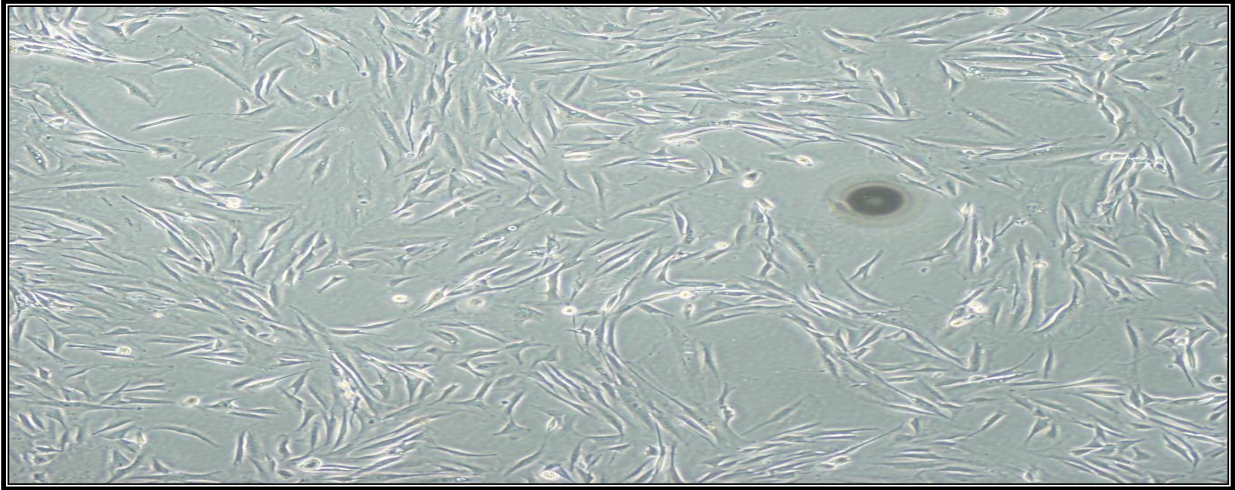
İzolasyonun ardından ikinci pasajı yapılan olfaktör kök hücreler 10^4 hücre olacak şekilde önceden fibronektin ile kaplanan center well içine aktarıldı. Hücreler, kültüre adaptasyon için 24 saat %10 FBS içeren DMEM besiyerinde inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda hücrelerin bulunduğu besiyeri uzaklaştırıldı. Center well içindeki hücreler PBS ile 2 kez yıkandı. Hücrelerin üzerine 2ml Mesenchymal Stem Cell Neurogenic Differentiation medyumu eklendi. Hücrelerin nörojenik farklılaşma medyumu 7 gün boyunca gün aşırı değiştirildi. Hücrelerdeki morfolojik değişiklikler her gün invert faz kontrast mikroskop ile gözlemlendi (Resim 3).

BULGULAR

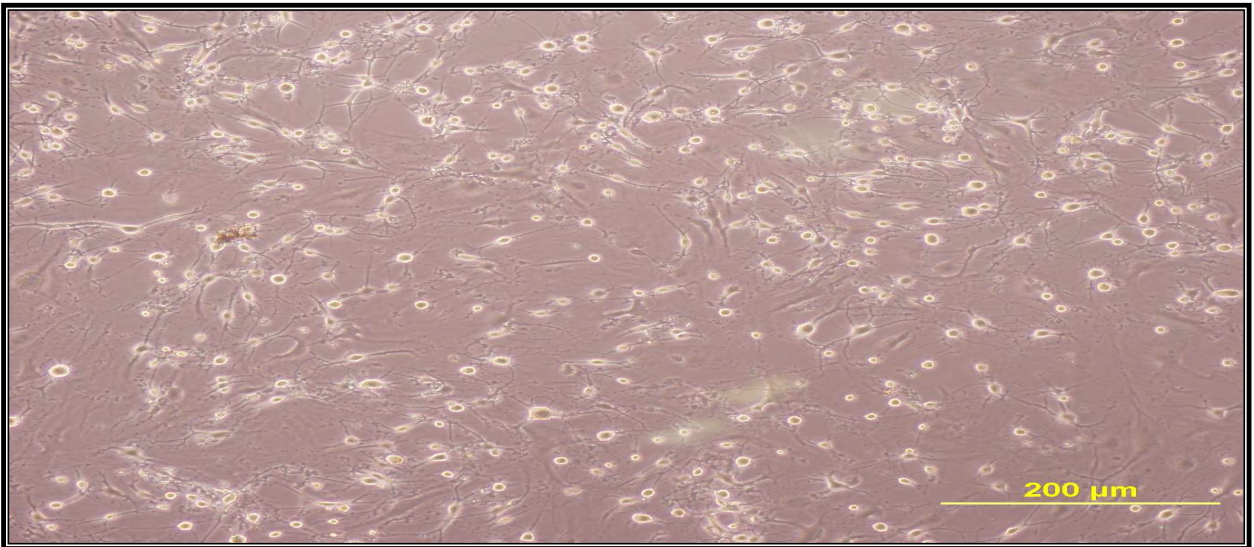
İzolasyonu yapılarak kültüre edilen olfaktör kök hücrelerin nörojenik farklılaştırılması sağlandı. Primer pasajlarında kültür ortamındaki olfaktör kök hücrelerin boyutları nispeten daha küçüktü ve sayıca az olarak gözlemlendi (Resim 1-2). Nörojenik farklılaştırma sonrası oluşan hücrelere bakıldığında üretilen hücrelerin boyutları daha büyük ve nöron yapılarına daha fazla benzerlik göstermekteydi (Resim 3).



Resim 1. Olfaktör dokudan elde edilen kök hücrelerin alt kültürü. 1. Pasaj.



Resim 2. Farklaşmamış olfaktör kök hücre kültür ortamı 2. pasaj.



Resim 3. Üretilen olfaktör kök hücrelerin nörojenik farklılaşması (Nörojenik diferansiasyon daha belirgin ve hücre boyutları daha büyük)

TARTIŞMA

Kök hücreler, kendini yenileme ve farklı hücre hatlarına farklılaşabilme yeteneğine sahip özel hücrelerdir (11). Ancak, her kök hücre türü, elde edildiği kaynağa bağlı olarak farklı farklılaşma potansiyeline sahiptir. Kök hücreler farklı sinyaller verildiğinde bu özellikleri *in vitro* koşullarda da gösterebilir (15, 16). Yapılan birçok çalışma göstermiştir ki olfaktör epitelden normal gelişen erişkin olfaktör mukozada nöral ve nöral olmayan bileşenlerden oluşan bir kök hücre hattı hiyerarşisi bulunur (6). Literatürde olfaktör kök hücrelerin karakterizasyonu için immünohistokimya ve farklılaşma çalışmaları yapılmış elde edilen sonuçlara göre olfaktör kaynaklı kök hücrelerin kendini yenileyebilme ve nörosfer oluşturma, kondrojenik, nörojenik, kardiyak ve adipojenik farklılaşma kapasitesine sahip, aynı zamanda multipotent kök hücre antijenleri olan CD29, CD73, CD 90, CD105, CD146 antijenlerini taşıyan hücreler oldukları bildirilmiştir (6, 9).

Yapılan deneysel çalışmalarda olfaktör kök hücrelerin sıçanlarda intervertebral disk rejenerasyonunda etkili olabileceği bildirilmiştir (18). İlave olarak, deneysel hipokampal hasar oluşturulan farelerde olfaktör kök hücrelerin hasar bölgesine göç ettiği ve endojen nörojenezi uyardığı ve sinaptik iletiyi düzelttiği bunlara bağlı olarak da farelerde öğrenme ve hafıza davranışlarını düzenlediği gösterilmiştir (13). Olfaktör kök hücreler omurilik hasarlarında kortikospinal yol rejenerasyonunda rol oynadıkları üzerinde de durulmuştur (1, 2). Otolarengoloji alanında ise olfaktör kaynaklı kök hücrelerin, erken ortaya çıkan sensörinöral işitme kaybı varlığında işitme kaybı üzerinde olumlu etki oluşturabileceği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (14). Bizim çalışmamızda kobaylardan olfaktör hücre izolasyonu sonrası bu hücrelerin nörojenezi sağlanmıştır. Böylece deneysel olarak yapılacak çalışmalarda olfaktör kök hücrelerin bu özelliklerinin kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Nörojenik diferansiyasyon sonrası elde edilen nöron özellikleri taşıyan hücrelerin ise yapılacak deneysel çalışmalarda gerek fasyal sinir hasarında gereksede sensörinöral işitme kaybı modellerinde alternatif çalışma alanları oluşturabileceği düşünülebilir. Kök hücreler genel olarak normoksik koşullarda üretilmektedir. Alternatif olarak son dönemlerde hipoksik ortamda üretilen

kök hücrelerin bazı klinik tablolarda daha etkin olabileceği bildirilmiştir (6, 15). Hipoksik ortamda hazırlanan kök hücrelerin engraftman, yaşam süreleri ve parakrin özelliklerinin arttığı bildirilmiştir. İdiopatik pulmoner fibrozis, hipoksik kök hücrelerin etkisinin incelendiği en önemli örneklerden biridir (6, 15). Hipoksik ortamda üretilen kök hücreler bleomisine sekonder gelişen idiyopatik pulmoner fibrozis gelişimini engellediği gösterilmiştir (6, 13). Bizim çalışmamız olfaktör kök hücrelerin kültürünün yapıldığı bir çalışmadır. Fakat çalışmamızda az sayıda kobay kullandığımız için morfolojik olarak farklılıkları istatistiksel olarak tespit edilememiştir. Daha fazla sayıda kobay ile yapılacak çalışmalarda farklı kültür ortamı alternatifleri denenerek hücre farklılıklarının daha net ortaya konulacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- 1. Abbasi M, Salehi M, Pasbakhsh P, Sobhani A.** Repair of spinal cord injury by co-transplantation of embryonic stem cell-derived motor neuron and olfactory ensheathing cell. *J Stem Cells Regen Med.* 6: 81, 2010.
- 2. Ao Q, Wang AJ, Chen GQ, Wang SJ, Zuo HC, Zhang XF.** Combined transplantation of neural stem cells and olfactory ensheathing cells for the repair of spinal cord injuries. *Med Hypotheses.* 69: 1234-1237, 2007.
- 3. Atalay Ç, Ergücü Z, Tezel H.** Stem cells in dentistry and dental pulp stem cells. *GÜ. Diş Hek Fak Dergisi,* 29(2): 115-120, 2012.
- 4. Cruz FF, Rocco PRM.** Hypoxic preconditioning enhances mesenchymal stromal cell lung repair capacity. *Stem Cell Research&Therapy,* 6: 130, 2015
- 5. DaSacco S, Sedrakyan S, Boldrin F, Giuliani S, Parnigotto P, Habibian R.** Human amniotic fluid as a potential new source of organ specific precursor cells for future regenerative medicine applications. *J Urol.,* 183: 1193-1200, 2010.
- 6. Delorme B, Nivet E, Gaillard J, Haupl T, Ringe J, Deveze A.** The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells Dev.,* 19: 853-866, 2010.

8. **Feron F, Perry C, Cochrane J, Licina P, Nowitzke A, Urquhart S.** Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain* 128: 2951-2960, 2005.
9. **Karaşahin T.** Embriyonik Kk Hücreler. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.*, 9(1) 65-71, 2012.
10. **Katsumoto K, Shiraki N, Miki R, Kume S.** Embryonic and adult stem cell systems in mammals: ontology and regulation. *Dev Growth Differ*, 52: 115-129, 2010.
11. **Lan YW, Choo KB, Chen CM, Hung TH, Chen YB, Hsieh CH.** Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Stem Cell Res Ther.* 6: 97, 2015.
12. **Moore KE, Mills JF, Thornton MM.** Alternative sources of adult stem cells: a possible solution to the embryonic stem cell debate. *Gend Med.*, 3: 161-168, 2006.
13. **Nivet E, Vignes M, Girard SD, Pierrisnard C, Baril N, Deveze A.** Engraftment of human nasal olfactory stem cells restores neuroplasticity in mice with hippocampal lesions. *J Clin Invest.*, 121: 2808-2820, 2011.
14. **Pandit SR, Sullivan JM, Egger V, Borecki A, Oleskevich S.** Functional Effects of Adult Human Olfactory Stem Cells on Early-Onset Sensorineural Hearing Loss. *Stem Cells*, 29:670-677, 2011.
15. **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147, 1999.
16. **Sousa BB, Parreira RC, Fonseca EA, Amaya MJ, Tonelli FM, Lacerda SM.** Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytometry A.*, 85: 43-77, 2014.
17. **şahin F, Saydam G, Omay SB.** Kk Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kk Hücre Tedavisi. *The Turkish Journal of Hematology and Oncology*, 1: 15, 2005.
18. **Vaananen HK.** Mesenchymal stem cells. *Ann Med.* 37: 469-479, 2005.
19. **Wetzig A, Mackay-Sim A, Murrell W.** Characterization of olfactory stem cells. *Cell Transplant* 20: 1673-1691.7, 2011.