



# Klinik Kullanım İçin Mezenkimal Kök Hücrelerin Hazırlanması

## Mesenchymal Stem Cell Production for Clinical Usage

Zeynep Burçin GÖNEN, Nur Seda ŞAHİN

Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri, Türkiye

### Yazışma Adresi

Correspondence Address

### Zeynep Burçin GÖNEN

Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri, Türkiye

E-posta: zburcin@gmail.com

Geliş tarihi \ Received : 17.05.2018

Kabul tarihi \ Accepted : 11.07.2018

Elektronik yayın tarihi : 08.11.2018

Online published

Bu makaleye yapılacak atf:

Cite this article as:

Gönen ZB, Şahin NS. Klinik kullanım için mezenkimal kök hücrelerin hazırlanması. Akd Tıp D 2019; 5(2):169-75.

Zeynep Burçin GÖNEN

ORCID ID: 0000-0003-2725-9330

Nur Seda ŞAHİN

ORCID ID: 0000-0003-0294-7559

### ÖZ

Mezenkimal kök hücreler (MKH) kendini yenileme potansiyeli olan, osteoblast, kondrosit ve adiposit gibi özelleşmiş hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahip, erişkin, multipotent hücrelerdir. Klinikte kullanılmaları için özel üretim koşulları gerekmektedir. GMP (Good Manufacturing Practice- İyi Üretim Uygulamaları) şartlarında hücre üretimi, temel kök hücre bilimlerinden klinik araştırmalara ve uygulamalara translyasyon için yüksek bir kalite güvence sistemi sağlar. Üretim protokolünde kullanılan enzim içeriği ve konsantrasyonu, parçalanma süresi, santrifüj hız farklılıkları, filtre boyutu gibi değişkenler, MKH eldesindeki farklılıkları oluşturur. Uygun üretim, doz ve uygulama yolu standardize edilerek hastada en başarılı tedavi sonucuna ulaşılır. Derlemede, MKH'lerin özelliklerini ve klinikte kullanımlarına özgü olarak nasıl hazırlandıklarını ve hazırlanma esnasındaki değişkenlerin hücre üzerine etkilerini açıklanması amaçlanmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Mezenkimal kök hücre, Translyasyonel tıp, GMP

### ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent cells that can differentiate into specialized cells such as osteoblasts, chondrocytes and adipocytes, and have the ability for self-renewal. However, special production conditions are required for clinical usage. GMP (Good Manufacturing Practice) Laboratory conditions may provide a high quality control system in translational medicine from basic stem cell research to clinical trials. The content and concentration of the enzyme, digestion period, the speed of the centrifuge and filter size may be among the variables that affect the characteristics of MSCs. The production methods, application and dose of MSCs for certain therapies should therefore be standardized according to the best clinical treatment available for the patient. The aim of this review is to explain the characteristics of MSCs, the special production methods for their use in clinical practice, and their effects on various cells.

**Key Words:** Mesenchymal stem cell, Translational medicine, GMP

### GİRİŞ

Mezenkimal kök hücreler (MKH); kendini yenileme potansiyeli olan, osteoblast, kondrosit ve adiposit gibi özelleşmiş hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahip, erişkin, multipotent, progenitör ve klonal hücrelerdir. MKH'ler heterojendir ve karakterizasyonu için belirlenmiş tek bir biyobelirteç mevcut değildir. Bu nedenle, 2006 yılında Uluslararası Hücre Tedavi Derneği tarafından bildirilen bir dizi özellik ile tanımlanması sağlanır (1). Yaygın olarak kabul gören bu kriterlere göre MKH'lerin; i) kendini yenileme yeteneği (self-renewal) ii) Yüzeylerinde CD73, CD90 ve CD105 belirteçlerini eksprese ederken CD45, CD34, CD14 ve HLA-DR gibi yüzey belirteçlerini eksprese etmemeleri iii) *In-vitro* koşullarda kemik, yağ ve kıvrıma dönüşebilme (diferensiyasyon) özellikleri mevcuttur. MKH'ler stromal kökenleri, fibroblast benzeri morfolojilerinin yanı sıra kültürde plastik yüzeye hızlı adhezyonu ile

DOI: 10.17954/amj.2018.1204

karakterize edilir. Basit ve kolay elde edilebilir, kültür ortamında yüksek ve hızlı proliferasyon sunarlar ve birçok pasaj boyunca karyotiplerinde değişme olmaksızın proliferasyonu devam ettirilebilirler (2,3). MKH'ler dokudan izole edilip kültüre alındıklarında primer MKH kültürü olarak adlandırılır, bu fazı takiben logaritmik faz ve son olarak bir senesent fazdan oluşan bir büyüme eğrisi sergiler. Uygun koşullar altında logaritmik faz esnasında (pasaj 2-3) kolaylıkla 50 popülasyon katlanmasına kadar çoğaltılabilir ve böylece terapötik dozlara ulaşılması mümkün olur. Ayrıca, düşük immünojeniteye sahiptirler ve bu yüzden rejeneratif tedaviler için allojenik kullanıma da uygun olan bir adaydırlar.

Geleneksel olarak kemik iliği MKH izolasyonundaki en sık kullanılan kaynak olarak bilinse de, zamanla içeriğinin MKH' den çok hematopoetik kök hücreler açısından zengin olması, toplama prosedüründeki zorluklar ve genel anestezi gereksinimi klinik ve araştırmalarda kemik iliğinin kullanımını kısıtlamıştır (4,5). Yağ dokusundan veya lipoaspirat numunelerinden elde edilebilen ve adipoz kökenli MKH olarak sınıflandırılan, farklılaşmamış hücre popülasyonunun multipotent doğası araştırılmaya adaydır (6,7). Adipoz kökenli MKH' de kemik iliği kökenli MKH'ler gibi osteogenez, kondrogenez, adipogenez, miyogenez ve özel koşullar eşliğinde nörojenez potansiyeli sergilerler (6). Adipoz doku minimal girişimsel işlemler ile elde edilir ve hem olog hem allojenik kök hücre tedavilerinde geniş bir yere sahiptir (7). Plasenta, umbilikal kord ve amniyon sıvısı gibi perinatal kaynaklar MKH açısından zengindir. Umbilikal kord mezenkimal kök hücrelerinin allojenik bir MKH kaynağı olarak düşünüldüğünde kemik iliği MKH'lerine göre toplama işleminin ağrısız olması, kord donörlerin tutarlı ve genç olması, neredeyse sınırsız bir başlangıç malzeme kaynağı olması ve bankacılığının kolaylıkla yapılabilmesi gibi avantajları vardır. *In vitro* olarak, umbilikal kord MKH'ler yüksek proliferasyon potansiyeli, farklılaşma yeteneği ve yüksek immünomodülasyon özelliklerine sahiptir. Bu nedenlerden dolayı dünyada 2014'ten itibaren klinik çalışmalarda sıklıkla tercih edilen MKH kaynağıdır (8). Ayrıca literatürde MKH'lerin kemik iliği, yağ dokusu, umbilikal kord dokularından başka eklem kıkırdığı, periost, sinoviyal sıvı, menstrüel kan, iskelet kası, diş pulpası, kalp, beyin dokularından da elde edilebildiği bildirilmiştir (6, 9-18).

MKH'ler, endotel ve stromal hücreler gibi hem doğal hem de adaptif bağışıklık sisteminin hücreleri ile etkileşime girebilir, normal dokuda ve patolojik durumlarda önemli efektör fonksiyonları tetikleyebilir. MKH'ler endojen veya eksojen hasara yanıt olarak, hasarlı dokuya göç eder, anti-inflamatuvar, anti-proliferatif ve anti-apoptotik bir mikroçevrenin oluşumuna katkı sağlar (6).

Mezenkimal kök hücrelerin klinik şartlarda kullanılması için özel laboratuvar şartlarında üretilmesi gereklidir. GMP (Good Manufacturing Practice- İyi Üretim Uygulamaları) şartlarında hücre üretimi, temel kök hücre bilimlerinden klinik araştırmalara ve uygulamalara translyasyon için yüksek bir kalite güvence sistemi sağlar. GMP kılavuzlarına göre; biyolojik ürünün uygun klinik sınıfının belirlenmesi, hazırlanması, klinik uygulamalar için hücre ürünlerinin güvenliğinin sağlanması, kalitesinin değerlendirilmesi, özelliklerinin ve kimliğinin belirlenmesi ve transferinin sağlanması gerekmektedir. Öte yandan, gelişmiş hücresel tedavi protokolleri, kapsamlı doğrulama, süreç kontrolü ve kapsamlı dokümantasyon gerektirir (19). Ülkemizde *İnsan Doku ve Hücre Ürünlerinin Ruhsatlandırılması ve bu Ürünlerin Üretim, İthalat, İhracat, Depolama ve Dağıtım Faaliyetlerini Yürüten Merkezler Hakkında Tebliğ* e göre, hücre-doku üretim faaliyeti, GMP kılavuzunda belirtilen partikül ve mikrobiyal yük açısından B sınıfı hava kalitesine sahip alan içerisinde yerleşik partikül ve mikrobiyal yük açısından A sınıfı hava kalitesine eşdeğer bir ortamda yapılır (20). GMP şartlarında MKH üretimi 3,4 hafta gerektiren bir süreçtir.

## MKH ÜRETİMİ

### Dokunun Alınması ve Taşınması

Doku ve hücrelerinin tedariki; alanında uzmanlaşmış bir klinik ekip tarafından, doku ve hücrelerin bağış ve tedariki usul ve esaslara uygun olarak yapılır (21). MKH' lerin terapötik kullanımında, hastalığın patofizyolojisine göre etkin olduğu prelinik çalışmalar ile bildirilen hücre kaynağı tercih edilmelidir. Donör yaşı ve MKH kökeni terapötik cevapta farklılıklara yol açar (22-24). Dokunun alınış yeri, şekli ve alınma esnasındaki cerrahi protokol, başlangıç materyalindeki hücre sayısını etkiler (25). Hücre üretim merkezine örnek kabul öncesi gerekli donör tarama testleri yapılır ve cerrahi işlem ardından dokuya özgü belirlenen antibiyotik içeren 'ham ürün transfer solüsyonu' içerisine alınır. Uygun taşıma koşullarında üretim gerçekleştirecek merkeze transferi sağlanır. Adipoz kaynaklı kök hücreler kemik iliği kök hücrelerine benzerlik göstermesine rağmen, hücre yüzeyi belirteçlerinde, farklılaşma potansiyellerinde ve vücutta bulunma oranlarına göre bazı farklı özelliklere sahiptir. Adipoz kaynaklı kök hücrelerin en büyük avantajı, 100 g yağ dokusundan, 100 ml kemik iliği aspiratına kıyasla, 300 kat daha fazla kök hücre elde edilebilecek olmasıdır (9). Adipoz kökenli MKH, diğer mezenkimal kök hücrelere benzer bir farklılaşma potansiyeline sahiptir (26). Umbilikal kord dokusundan MKH izolasyonunun kolay olması ve bankacılık fikrinin de günümüzde rağbet görmesinden dolayı umbilikal kord dokusu sık kullanılan bir başlangıç materyalidir. Normal doğumdan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin sayısı, sezeryan doğuma oranla daha fazladır (27).

## Dokunun Parçalanması ve Primer Kültür

Primer eksplant kültür, hücre izolasyon ve kültürü için bildirilen en eski yöntemdir. Başlangıç materyali olarak belirlenen doku parçası GMP Laboratuvarına taşıma (transfer) solüsyonu içerisinde taşınır. Başlangıç materyalinin kalite kontrolü; laboratuvara kabul için gelen dokunun boyutu, ağırlığı, serolojik uygunluğu, ambalaj bütünlüğü, ısı takibi gibi kriterler ayrı ayrı değerlendirilerek yapılır. Uygun koşullarda taşındığı ve kabul kriterlerine uygun olduğu belirlenen doku üretim için kabul edilir. Dokulardan MKH izolasyonu yapılırken enzimatik ve/veya mekanik parçalama yöntemleri kullanılabilir. Genellikle, doku kan hücrelerinden arındırıldıktan sonra mekanik olarak parçalanarak milimetrik boyuta getirilir. Doku boyutunun küçültülmesi hücrelerin difüzyonla beslenmesini kolaylaştırır (28). Fazla parçalama yapılır ise hücreler mekanik olarak dekstrükte olur. Enzimatik parçalama yönteminde ise, ekstrasellüler matriksi parçalayan enzimler ile degradasyon gerçekleştirilir. Mekanik olarak parçalama yöntemi ile gerçekleştirilen eksplant kültürde heterojenitesi daha az, proliferasyonu ve canlılığı daha fazla hücre elde edilebilir (29-31). Bunun nedeni, migrasyon yapan hücreler bir enzime maruz kalmadığından, ekstrasellüler matriksin korunması ve bu sayede proteolitik ve mekanik stresten daha az etkilenmesi olarak açıklanabilir (32,33). Adipoz kaynaklı MKH izolasyonunda yaygın olarak her iki protokol de kullanılır. Enzimatik ve mekanik parçalamanın birlikte kullanımının yalnızca mekanik parçalamaya göre iki kat daha verimli hücre izole edilebileceği bildirilmiştir (34). Lazzina ve ark. insan umbilikal kord MKH'lerde geleneksel parçalama ve otomatik parçalama sistemini (GentleMACs) karşılaştırmışlar ve otomatik parçalama sistemi protokolündeki hücre sayısı ve canlılığının geleneksel enzimatik parçalamaya göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (35). Merkeze taşınan transfer solüsyonunda yapılan kalite kontrol testleri ile kabulüne karar verilir. Uygun parçalama seçildikten sonra dokuya uygun bazal besiyeri ile hazırlanan medium ile flasklara ekim yapılarak 37° C inkübatöre kaldırılır.

## Kültürün Devamlılığının Sağlanması

3-4 günde bir uygun besi yeri ile idame işlemi yapılır. 2 hafta kadar bu işleme devam edilir ve hücrenin kültür ortamında çoğaltılması sağlanır. Terapötik uygulamalar için fazla sayıda hücre elde edilmesi gereklidir. Bu nedenle, optimal kültürün belirlenmesi için besi ortamı içerikleri, kültür ortamı, hücre ekim yoğunluğu, çözünmüş O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> gibi fiziko-kimyasal çevre, konsantrasyonlar, pH ve sıcaklık gibi MKH kültürü özelliklerini değiştiren faktörlerin optimize edilmesi gerekmektedir. Birçok laboratuvarında rutin olarak kullanılan kan türevli ortam takviyeleri, besi ortamı kompozisyonlarının karmaşıklığı, hücresel tedavi ürününün optimizasyonunu engellemektedir. Kültür ortamı

takviyeleri olarak kullanılan bu ürünler hücre verimini sayıca artırmaya yöneliktir. MKH kültürü için serum, yaygın olarak % 10-20 konsantrasyonda kullanılmaktadır (36-38). Serum, yüksek hücre büyümesini sinyaliz eden bileşikler içermektedir ve bağlanma faktörleri ile birlikte beslenme ve fiziko-kimyasal hücre bakımı için gereklidir (39). %15 insan serumu içerisinde hücreler, %10 FBS'e (fetal bovine serum) göre 2,5 kat daha fazla proliferasyon göstermiştir (36). Trombosit lizatı ilk olarak Doucet ve ark. tarafından hücrelerin *ex vivo* gelişmesi için seruma alternatif olarak önerilmiştir (40). Trombosit lizat içerdiği biyoaktif moleküller ve büyüme faktörleri sayesinde, kemik iliği (41,42), göbük kordonu kanı (43) ve adipoz dokusu (44) MKH'lerinin büyümesini destekler. MKH'lerin in vitro genişlemesinde kültür koşullarının optimize edilmesi için önemli bir çaba gösterilmiştir. Bunlar, kültür ortamının, serum içeriğinin, hücre yüzey kaplama yoğunluğunun, kültür yüzeylerinin değerlendirilmesiyle açıklanabilir (45-47). Bu değişkenlerden, büyüme faktörü ve sitokin takviyelerinin kullanımı en yaygın şekilde araştırılmış ve MKH'lerin çoğalması ve kendini yenileme üzerine belirgin etkileri olduğu gösterilmiştir. FGF-2 (fibroblast büyüme faktörü) takviyesinin kullanımı MKH lerin genişlemesini artırmak için yaygın olarak tanımlanmış ve kullanılmıştır (46,48-51). Büyüme faktörleri ile uzun süreli ekim, MKH farklılaşma potansiyelinde kayba yol açabilir. Uygun faktör kombinasyonları kemik iliği kaynaklı MKH'lerin 1000 kat ekspansiyonuna izin verir (52). Çoğunlukla hematopoetik kök hücre transplantasyonundan sonra gelişen steroid-refrakter akut graft versus host hastalığına (GVHD) sahip hastaların tedavisinde ve osteoartritte kullanılan trombosit lizat, zenginleştirilmiş besiyeri ile ekspansiyon edilen MKH'lerin başarılı tedavi sonuçları bildirilmiştir (53,54).

Son yıllarda, insan kaynaklı suplementlerin ve serumun dezavantajlarını ortadan kaldırmak için serumsuz besiyeri üzerine çalışılmaktadır. Serumsuz besiyeri (serum-free media); lot ile değişen farklılıkların ortadan kaldırılabilmesini, kan ürünü kaynaklı tanımlanamayan proliferasyon değişiklikleri sorununun azalmasını, genomik-proteomik karşılaştırmaların yapılabileceği ortamın oluşmasını sağlar. Chase ve ark. MKH lerin ekspansiyonunu serumsuz besiyeri (SFM; StemProVR MSC SFM, Invitrogen) ile gerçekleştirmiş ve sonuçlarını serum içeren kültür ile karşılaştırıldığında, MKH'lerde fenotip, ekspresyon profili ve farklılaşma karakterinde bir değişikliğe yol açmadığını bildirmiştir (55). Buna benzer olarak MesencultVR (Stem Cell Technologies, Kanada) ve TheraPEAKTM (Lonza, İsviçre) ticari olarak ulaşılabilir serumsuz içeriklerdir. Ancak mutlaka bildirilen ticari serumsuz içerikler ile klinik kullanıma hazır hücre hazırlama esnasında bu besiyerlerine eklenen ilave faktörlerin ve tuzlar, aminoasitler, yağ asitleri, iz elementer gibi bazal besiyeri komponentlerinin kalite kontrolünün yapılması gerekmektedir. Hudson ve ark. mTeSR (Stem

Cell Technologies) isimli bir besiyeri tanımlamışlardır (56). İçeriğinde Wnt sinyal yolağı aktivatörü olan LiCl (57,58) ve insülin benzeri büyüme faktörünü aktive etmek üzere yüksek konsantrasyonda insülin (22.8mg/5ml) gibi ilave faktörler ihtiva eder. Bu formül ile primer kültürde istenmeyen hücreleri baskılayarak daha homojen bir MKH kültürü oluşmasını sağlar. Ancak, formülasyondaki değişiklikler hücrelerdeki spesifik bazı genlerin ekspresyonunu değiştirebileceğinden (59), klinik etkinlik ve cevap açısından dikkatli değerlendirilmelidir.

### Hücrenin Kaldırılması

Hücrenin kültür ortamında çoğaltma işlemi takiben hücre, flaskta % 70-80 doluluk oranına ulaşıncaya pasajlama işlemi yapılır. Flask içerisine tripsin eklenerek 37°C de 5 dakika bekletilir. Serum ile nötrale edildikten sonra konik tüpe toplanarak 350xg de 10 dakika santrifüj edilir. Flask başına 1-1.5x10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde ekim yapılır ve pasajlama işlemi tamamlanmış olur. Bu aşamadan sonra 3-4 günde bir idame işlemine devam edilerek hücrenin kültürde devamlılığı sağlanır.

### Sonlandırma ve Saklama İşlemi

Kültürde çoğaltılan hücreler tedavi için hastaya gideceği zaman kültürün sonlandırılması işlemi yapılır. Hücre PBS (phosphate buffered saline) ile 1 kere yıkanır sonrasında 2 kere SF (serum fizyolojik) ile 350xg de santrifüj edilerek yıkanır. Santrifüj sonrasında immünofenotipik analiz, sayı ve canlılık analizleri, endotoksin testi, mikoplazma testi ve telomeraz enzim aktivite testleri açısından değerlendirildikten sonra hazırlanan ekspansiyon hücre 'son ürün' haline gelir. Üretimi tamamlanan hücre hastaya uygulanabilir ve/veya kriyoprezervasyon yoluna gidebilir. MKH' lerin hücresel terapi, rejeneratif tıp ve doku mühendisliği gibi alanlardaki artan potansiyeli nedeniyle, kriyoprezervasyon ve banka erişilebilirliklerini, dondurulan materyali geri çağırmak ve istenilen özelliklerde tekrar kullanmak için önemli ölçüde emek ve zaman harcanmaktadır. MKH' lerin kriyoprezervasyon sonrasında terapötik özelliklerini korurken ve güvenli olduklarından emin olmak için uygulanan protokolleri optimize etmek gereklidir. Başarılı bir kriyoprezervasyon için yavaş ve hızlı soğutmadan kaçınılmalı ve hücrelerin ozmotik dengesini korumak gereklidir. Farklı hücre tipleri farklı membran geçişine sahip oldukları için soğutma oranı hücre tipine bağlıdır ancak genel olarak MKH' lerde vapor faza geçene kadar dakikada 1 °C - 5 °C soğutma önerilir (60). Roy ve ark. tarafından wharton jeli kaynaklı MKH' lerin saklanması, dondurma solüsyonu olarak %10 DMSO (Dimethyl Sulfoxide) ve farklı sükröz oranları kullanılarak yüksek canlılık elde edilebileceğini bildirmiştir (61). Yuan ve ark. %5 DMSO ve %95 HSA (Human

Serum Albumin) kullanılan solüsyonda en yüksek canlılığı elde etmiştir (62). Miyamoto ve ark. insan adipoz kaynaklı MKH' lerde %10 DMSO ve cell banker 2'yi dondurma ve çözme takiben hücrelerin hayatta kalma oranını, çoğalma potansiyelini karşılaştırarak hücre sağkalım oranı, her iki kriyoprezervasyon çözeltisinde % 95'in üzerinde olduğunu bununla birlikte, hücre çoğalma potansiyelinin cell banker 2 çözeltisinde önemli derecede yüksek olduğunu belirtmiştir (63). Al-Saqi ve ark.'na göre insan adipoz kök hücrelerinde % 10 DMSO ve cell banker 3 arasındaki hücre sağkalım oranını ve farklılaşma potansiyelini karşılaştırarak bu iki tip kriyoprezervasyon çözeltisi arasında dondurma ve çözülmeden önce ve sonra hücre formunda herhangi bir fark olmadığını bildirmiştir (64). Chatzistamatiou ve ark. umbilikal kord doku parçalarını 2-3 mm<sup>3</sup> halinde parçalayarak dondurmuştur. Bunu yapmaktaki amaçları ise dokuyu kültüre etmeden zamandan, enerjiden tasarruf etmek ve kültüre almadaki zorunluluğu ortadan kaldırmaya çalışmaktır (65).

### Hücrenin Paketlenmesi ve Hastaya Verilmesi

Gönderilecek toplam ürün genellikle kg başına 1-2x10<sup>6</sup> olacak şekilde steril cam flakonlara süspansiyon halinde aktarılır ve flakon kapatılır. 1 ml şahit numune dondurulur ve hastaya gönderilecek hücre etiketlenir. Taşıma çantası üzerine canlı biyolojik ürün, dik taşıma ibaresi ve radyasyona dayanıksız olduğunu içeren güvenlik bantları yapıştırılır (20). 2-8°C arası sıcaklık sağlanır ve 48 saat içerisinde hastaya ulaştırılmalıdır. Hastaya intravenöz veya lokal olarak serum fizyolojik içerisinde süspansiyon halinde uygulanır ve ileri dönemde advers olay ve yan etki açısından takip edilir.

### SONUÇ

MKH' ler birçok dokuya farklılaşma ve orijinal özelliklerini yitirmeden ekspansiyon edilebilme özelliklerinden dolayı translayonel tıp için yaygın kullanım alanına sahip rejeneratif biyolojik ürünlerdir. Kesin ve standart protokollerin olmamasından dolayı üretilen hücrelerin içeriği değişkenlik gösterir ve bu da hücrelerin immünmodülatör özelliğini etkiler. Üretim protokolünde kullanılan enzim içeriği (19,26), %0.05 ve % 0.15 aralığında değişen enzim konsantrasyonu (66), 30-90 dakika arasında değişen parçalanma süresi (16), kollajenaz aktivitesini durdurmak için kullanılan tampondaki değişkenlikler (16,66), santrifüj hız farklılıkları (67), 70 mm ile 100-250 mm arasında değişen filtre boyutu (68) ve son basamakta hücre debrisinin uzaklaştırılıp uzaklaştırılmaması (19,68) MKH eldesindeki farklılıkları oluşturur. Uygun üretim, doz ve uygulama yolu standardize edilerek hastada en başarılı tedavi sonucuna ulaşılır.

**KAYNAKLAR**

1. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315-17.
2. Pendleton C, Li Q, Chesler DA, Yuan K, Guerrero-Cazares H, Quinones-Hinojosa A. Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue vs bone marrow: In vitro comparison of their tropism towards gliomas. *PLoS One* 2013;8:581-98.
3. Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ. Clinical grade adult stem cell banking. *Organogenesis* 2009;5:143-54.
4. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-7.
5. Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, Lim HC, Scheduling S. Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Ann NY Acad Sci* 2016; 1370:109-18.
6. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7(2):211-28.
7. Kolaparthi LK, Sanivarapu S, Moogla S, Kutcham RS. Adipose tissue-adequate, accessible regenerative material. *Int J Stem Cells* 2015;8:121-7.
8. Bersenev A. Cell therapy clinical trials-2014 report. *Cell Trials Blog*, 2015.
9. Fellows CR, Matta C, Zakany R, Khan İM, Mobasher A. Adipose, bone marrow and synovial joint-derived mesenchymal stem cells for cartilage repair. *Front Genet* 2016;7:213.
10. Tatullo M, Codispoti B, Pacifici A, Palmieri F, Marrelli M, Pacifici L, Paduano F. Potential use of human periapical cyst-mesenchymal stem cells (hPCy-MSCs) as a novel stem cell source for regenerative medicine applications. *Front Cell Dev Biol* 2017;5:103.
11. Mobasher A, Kalamegam G, Musumeci G, Batt ME. Maturitas chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions 2014; 78(3):188-98.
12. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatology* 2010; 6(11):625-35.
13. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(25):13625-30.
14. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Rheum A* 2004; 50 (5):1522-32.
15. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badyak S, Buhning HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008;3(3):301-13.
16. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansoer W. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005;33:1402-16.
17. Ozbey O, Sahin Z, Acar N, Ozcelik FT, Ozenci AM, Koksoy S, Ustunel I. Characterization of colony-forming cells in adult human articular cartilage. *Acta Histochem* 2014;116(5):763-70.
18. Ustunel I, Ozenci AM, Sahin Z, Ozbey O, Acar N, Tanriover G, Celik-Ozenci C, Demir R. The immunohistochemical localization of notch receptors and ligands in human articular cartilage, chondroprogenitor culture and ultrastructural characteristics of these progenitor cells. *Acta Histochem* 2008;110(5):397-07.
19. Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R, Gelmini S, Guasti D, Benvenuti S, Annunziato F. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J* 2009; 23:3494-05.
20. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumundan: İnsan Doku ve Hücre Ürünlerinin Ruhsatlandırılması ve bu Ürünlerin Üretim, İthalat, İhracat, Depolama ve Dağıtım Faaliyetlerini Yürüten Merkezler hakkında Tebliğ. 4 Nisan 2014 Resmi gazete sayı: 28962.
21. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumundan: İnsan Doku ve Hücreleri İle Bunlarla İlgili Merkezlerin Kalite ve Güvenliği Hakkında Yönetmelik 27 Ekim 2010 Resmi Gazete sayı: 27742.
22. Shi YY, Nacamuli RP, Salim A, Longaker MT. The osteogenic potential of adipose derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg* 2005; 116:1686-96.
23. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 2007;25:1384-92.
24. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, Oliveira J, Martins J, Kuligovski C, Mansur F, Christofis A, Amaral VF, Brofman PS, Goldenberg S, Nakao LS, Correa A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233:901-13.

25. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int* 2012;8:12693.
26. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: A better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct* 2008;26:664-75.
27. Smith RJ, Pfeifer K, Petry F, Powell N, Delzeit J, Weiss M. Standardizing umbilical cord mesenchymal stromal cells for translation to clinical use: Selection of GMP-compliant medium and a simplified isolation method. *Stem Cells Int* 2016; 6810980.
28. Atala A. *Methods of Tissue Engineering*. Houston, Texas: Gulf Professional Publishing; 2002.
29. Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, Omar AR, Mohit M, Janzamin E, Samani FS, Torshizi Z, Nematollahi-Mahani SN. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly *In Vitro Cell. Dev Biol Anim* 2012; 48:75-83.
30. Yoon JH, Roh EY, Shin S, Jung NH, Song EY, Chang JY, Kim BJ, Jeon HW. Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from Wharton's jelly. *Biomed Res Int* 2013;4:28726.
31. Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, Politis C, Lambrichts I, Bronckaers A. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res* 2013; 353:65-78.
32. Hendijani F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell Prolif* 2017;50:12334.
33. Hynes RO. The extracellular matrix: Not just pretty fibrils. *Science* 2009;326:1216-19.
34. Raposio E, Simonacci F, Perrotta RE. Adipose-derived stem cells: Comparison between two methods of isolation for clinical applications. *Ann Med Surg (Lond)* 2017;20: 87-91.
35. Lazzina R, Mariotti A, Procoli A, Fioravanti D, Iudicone P, Scambia G, Pierelli L, Bonanno G. A new standardized clinical-grade protocol for banking human umbilical cord tissue cells. *Transplantation and Cellular Engineering* 2015;55(12):2864-73.
36. Jurgens WJ, Oedayrjasingh-Varma MJ, Helder MN, Zandiehoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, Ritt MJ, van Milligen FJ. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res* 2008;332:415-26.
37. Heiskanen A, Satomaa T, Tiitinen S, Laitinen A, Mannelin S, Impola U, Mikkola M, Olsson C, Miller-Podraza H, Blomqvist M, Olonen A, Salo H, Lehenkari P, Tuuri T, Otonkoski T, Natunen J, Saarinen J, Laine J. N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells* 2007;25:197-202.
38. Sundin M, Ringd O, Sundberg B, Nava S, Geotherstrom C, Le Blanc K. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica* 2007; 92:1208-15.
39. Dimarakis I, Levicar N. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem Cells* 2006;24:1407-08.
40. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Lense JR, Begot L, Holy X, Lataillade JJ. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiology* 2005; 205(2):228-36.
41. Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, Viebahn S, Gieseke F, Langer H, Gawaz MP, Horwitz EM, Conte P, Handgretinger R, Dominici M. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy* 2006;8(5):437-44.
42. Bartmann C, Rohde E, Schallmoser K, Pustner P, Lanzer G, Linkesch W, Strunk D. Two steps to functional mesenchymal stromal cells for clinical application. *Transfusion* 2007;47(8):1426-35.
43. Bieback K, Hecker A, Kocaomer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, Klüter H. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* 2009; 27(9):2331-41.
44. Fekete N, Rojewski MT, Furst D, Kreja L, Ignatius A, Dausend J, Schrezenmeier H. GMP-compliant isolation and large-scale expansion of bone marrow-derived MSC. *PLoS One* 2012;7(8):43255.
45. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: Further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol* 2007;211:121-30.
46. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24:462-71.
47. Both SK, Muijsenberg AJ, Blitterswijk CA. A rapid and efficient method for expansion of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2007;13:3-9.
48. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:413-19.

49. Solchaga LA, Penick K, Porter JD. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2005;203:398-409.
50. Martin I, Muraglia A, Campanile G. Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology* 1997;138:4456-62.
51. Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res* 2003;287:98-105.
52. Gharibi B, Hughes F. Effects of medium supplements on proliferation, differentiation potential, and in vitro expansion of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Translasyonel Medicine* 2012;1(11):771-82.
53. Sanchez-Guijo F, Caballero-Velazquez T, Lopez-Villar O, Redondo A, Parody R, Martínez C, Olavarría E, Andreu E, Prósper F, Díez-Campelo M, Regidor C, Villaron E, López-Corral L, Caballero D, Cañizo MC, Pérez-Simon JA. Sequential third-party mesenchymal stromal cell therapy for refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(10):1580-5.
54. Astori G, Amati E, Bambi F, Bernardi M, Chierogato K, Schäfer R, Sella S, Rodeghiero F. Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: Present and future. *Stem Cell Res Ther* 2016;7:93.
55. Chase LG, Lakshmiathy U, Solchaga LA, Rao MS, Vemuri MC. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2010;21-8.
56. Hudson JE, Mills RJ, Frith JE, Brooke G, Jaramillo-Ferrada P, Wolvetang EJ, Cooper-White JJ. A defined medium and substrate for expansion of human mesenchymal stromal cell progenitors that enriches for osteo- and chondrogenic precursors. *Stem Cells Dev* 2011;20:77-87.
57. Song L, Webb NE, Song Y, Tuan RS. Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells* 2006;24:1707-18.
58. Neth P, Ciccarella M, Egea V, Hoelters J, Jochum M, Ries C. Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24:1892-103.
59. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide cell. *Stem Cell* 2008;2:141-50.
60. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology* 2015;71(2):181-97.
61. Roy S, Arora S, Kumari P, Ta M. A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cell. *Cryobiology* 2014;68(3):467-72.
62. Yuan Z, Lourenco S, Sage EK, Kolluri K, Lowdell M, Janes SM. Cryopreservation of human mesenchymal stromal cells expressing TRAIL for human anti-cancer therapy. *Cytotherapy* 2016;18(7):860-9.
63. Miyamoto Y, Oishi K, Yukawa H, Noguchi H, Sasaki M, Iwata H, Hayashi S. Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. *Cell Transplant* 2012;21(2-3):617-22.
64. Al-Saqi SH, Saliem M, Quezada HC, Ekblad A, Jonasson AF, Hovatta O, Götherström C. Defined serum- and xeno-free cryopreservation of mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Bank* 2015;16(2):181-93.
65. Chatzistamatiou T, Papassavas A, Michalopoulos E, Gamaloutsos C, Mallis P, Gontika I, Panagouli E, Koussoulakos S, Stavropoulos-Giokas C. Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: an MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transplantation and Cellular Engineering* 2014;54(12):3108-20.
66. Dragoo JL, Choi JY, Lieberman JR, Huang J, Zuk PA, Zhang J, Hedrick MH, Benhaim P. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res* 2003;21:622-9.
67. Galie M, Pignatti M, Scambi I, Sbarbati A, Rigotti G. Comparison of different centrifugation protocols for the best yield of adipose-derived stromal cells from lipoaspirates. *Plast Reconstr Surg* 2008;122:233-4.
68. Kim WS, Park BS, Sung JH. Protective role of adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging. *Arch Dermatol Res* 2009;301:329-36.