

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seda AKBOLAT

**SIÇAN ADİPOZ DOKUSUNDAN ELDE EDİLEN
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNE AİT KİSSPEPTİN VE
NÖROKİNİN GEN EKSPRESYONLARININ PASAJ
SAYISIYLA İLİŞKİSİ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2022

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇAN ADİPOZ DOKUSUNDAN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNE AİT KISSPEPTİN VE NÖROKİNİN GEN EKSPRESYONLARININ PASAJ SAYISIYLA İLİŞKİSİ

Seda AKBOLAT

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
Yıl: 2022, Sayfa: 65
Jüri : Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
: Prof. Dr. Gülizar ATLI
: Dr. Öğr. Üyesi Merve ÇAPKIN YURTSEVER

Kök hücre, kendini yenileme özelliğine sahip uygun bir mikroçevrede birden fazla özelleşmiş hücre tipine dönüşebilen farklılaşmamış hücrelere denir. Kök hücre türlerinden mezenkimal kök hücrelerin sadece mezenkimal tabakası değil onun haricindeki tabakalardan farklılaşan doku hücrelerine de farklılaştığının keşfedilmesi çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerinin tercih sebebi olmasına neden olmuştur. Adipoz dokudan köken alan mezenkimal kök hücreler kolay bir şekilde çok miktarda elde edilebilmektedir ve hematopoetik kök hücreler kadar etkindirler. Bu özellikler çalışmamızda adipoz dokuyu seçmemizi sağladı. Yaptığımız çalışmada sıçan adipoz dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerine ait kisspeptin ve nörokinin gen ekspresyonlarının pasaj sayısı ile ilişkisi incelendi. Kisspeptin çalışmamızda ki amaç pubertal bozuklukların temelinde yeralan kisspeptin ve nörokininin, infertilitenin mezenkimal hücre temelli tedavisindeki etkinliğini anlamaktır. İlk olarak sıçan adipoz dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücreler hücre kültür ortamında -10. pasaja kadar çoğaltıldı. Akım sitometrisinde hücrelerin CD90,CD45,CD29 yüzey antikorları taşıyıp taşımadığına bakılarak mezenkimal kök hücre olduğu tespit edildi. Sonrasında kök hücrelerin RNA izolasyonu yapıp cDNA eldesinden sonra Kiss-1, Kiss1R, TAC2, TACR2 genlerinin farklı pasajlardaki gen ekspresyonu incelendi. Sonuç olarak adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerde Kiss-1 geninin ifade olmadığını ancak Kiss1R, TAC2 ve TACR2 genlerinin ifade olduğunu ve bu genlerin ekspresyonlarının pasaj sayısına göre çok fazla değiştiğini gözlemledik.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, Kisspeptin, Nörokinin, Kiss-1, TAC2

ABSTRACT

MSc THESIS

THE RELATIONSHIP OF KISSPEPTIN AND NEUROKININ GENE EXPRESSIONS OF MESENCHYMAL STEM CELLS OBTAINED FROM RAT ADIPOSE TISSUE AND PASSAGE NUMBER

SEDA AKBOLAT

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisors : Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
Year: 2022, Pages: 65
Jury : Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
: Prof. Dr. Gülizar ATLI
: Asst. Prof. Dr. Merve ÇAPKIN YURTSEVER

Stem cells are undifferentiated cells with the potential to self-renew and can change into many specialized cell types in a proper milieu. Because it was discovered that mesenchymal stem cells, one of the stem cell kinds, develop not only into the mesenchymal layer but also into tissue cells that differentiate from layers other than it, mesenchymal stem cells have become the most preferred stem cell type in research. Mesenchymal stem cells can be obtained from many places such as bone marrow, adipose tissue, dental pulp, and placenta. Mesenchymal stem cells originating from adipose tissue can be easily obtained in large quantities and are as effective as hematopoietic stem cells. These characteristics allowed us to select adipose tissue for our research. In our study, the relationship of kisspeptin and neurokinin gene expressions of mesenchymal stem cells obtained from rat adipose tissue with the number of passages was examined. First, mesenchymal stem cells obtained from rat adipose tissue were grown in cell culture medium until passage 10. Mesenchymal stem cells were determined by checking whether the cells expressing CD90, CD45, CD29 surface antibodies in flow cytometry. Finally, after RNA isolation of stem cells and cDNA reverse transcription, gene expression of Kiss-1, Kiss1R, TAC2, TACR2 genes in different passages were examined. . As a result, we observed that the Kiss-1 gene was not expressed in adipose-derived mesenchymal stem cells, but the Kiss1R, TAC2 and TACR2 genes were expressed, and the expressions of these genes changed a lot according to the number of passages.

Keywords: Mesenchymal stem cell, Kisspeptin, Neurokinin, Kiss-1, TAC2

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Kök hücreler kendini yenileme, farklılaşma yetkinliği, klon oluşturma yeteneği gibi 3 temel özelliği barındıran hücrelerdir (Şahin, 2005). Kök hücreler işlev ve görev bakımından çok geniş olduklarından çok farklı sınıflandırmalar yapılmıştır ama en çok kabul göreni elde edildikleri kaynağa göre ve farklılaşma kapasitelerine göre sınıflandırmaktır. Farklılaşma kapasitelerine göre 5 gruba ayrılır: totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent, unipotent. Elde edilen kaynağa göre ise embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kök hücreler olmak üzere ikiye ayrılır. Embriyonik olmayan kök hücreler hematopoetik kök hücreler, stromal (mezenkimal) kök hücreler ve organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreleri olarak 3 sınıfa ayrılır (Avcılar ve ark, 2018).

Embriyonik kök hücreler döllenmenin beşinci ve altıncı günlerinde blastosistten elde edilir. Embriyonik kök hücreler uygun ortamda sürekli kendi kendini yenileyebilir. Embriyonik kök hücrelerin en önemli özelliklerinden biri de bütün fetal dokulara ve erişkin kök hücrelere farklılaşabilmesidir (Ateş, 2016).

Embriyonik olmayan kök hücreler, doku ya da organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Embriyonik olmayan kök hücreler kendilerini yenileyebilir ve bulunduğu dokunun hücre tiplerine farklılaşabilir. Embriyonik olmayan kök hücrelerin temel görevleri, bulundukları dokuyu onarmak ve dokunun devamlılığını sağlamaktır. Embriyonik olmayan kök hücreler hematopoetik kök hücreler, stromal (mezenkimal) kök hücreler ve organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreleri olarak 3 sınıfa ayrılır (Avcılar ve ark, 2018).

Hematopoetik kök hücreler (HKH'ler) organizmadaki tüm kan hücrelerini yaşamları boyunca oluştururlar. Hematopoetik hücreler kendi popülasyonlarını yenileyebilmek için tüm kan soylarına farklılaşabilme yeteneğine sahiptir (Szade ve ark, 2018).

Mezenkimal kök hücreler ilk olarak Friedenstein ve meslektaşları tarafından “Kemik iliğinden köken alan ve uygun uyaranlarla üç temel seri; osteojenik, kondrojenik, adipojenik seriye farklılaşabilen CD73, CD54 (ICAM-1), CD105, CD39, CD49e ($\alpha 5$ - integrin) gibi belirteçleri eksprese eden uzantılı fibroblast-benzeri multipotent hücreler olarak tanımlandı (Ateş, 2016; Baker ve ark, 2015). Bu tanım günümüzde kullanılan tanıma çok yakındır. Günümüzde de bir hücrenin mezenkimal kök hücre sayılabilmesi için Uluslararası Hücresel Terapi Derneği’nin (ISCT) belirttiği; hücrelerin plastiğe yapışmaları, yüzey belirteçlerinin CD73, CD90 ve CD105 antikörlerini taşıması ve osteoblast, adiposit, kondroblasta değişebilme kapasitesi göstermeleri gibi özellikleri taşımaları gerekir (Mohamed-Ahmet ve ark, 2018). Mezenkimal kök hücrelerin proliferasyon özelliği oldukça yüksektir. Adiposit, osteosit dahil olmak üzere birçok farklı hücre tiplerine farklılaşabilirler. Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, deri, yağ dokusu, tendon, sinovyal membran, periodontal ligament ve sinir sistemi gibi birçok dokudan kolaylıkla elde edilebilir (Ghanbani ve ark, 2014).

Mezenkimal kök hücrelerin eldesinde en çok kullanılan dokulardan biri kemik iliği olsada mezenkimal kök hücrelerinin örnek toplama için gereken nispeten invaziv prosedürün yanı sıra hücre sayısında, proliferasyonda ve yaşla farklılaşma kapasitesinin azalmasından dolayı klinik uygulanabilirliği sınırlıdır. Bu nedenle, kemiğe alternatif olarak plasenta, adipoz; fetal akciğer, göbek kordon kanı gibi dokular araştırılmıştır (Jeon ve ark, 2016). Bunlardan özellikle adipoz dokunun elde edilebilirliğinin kolay olması, kemik iliğine kıyasla daha fazla kök hücre üretebilmesi, ayrıca adipoz doku kökenli kök hücrelerin etkinliğinin hücre içi ve hücre dışı çalışmalarda kanıtlanması ile birlikte, adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücreler jeneratif doku mühendisliği alanında bir çok tıp branşının dikkatini çekmiştir (Gündeşlioğlu ve ark, 2013).

Adipoz doku, enerji birikiminde depolama alanı olarak görev alır. Herhangi bir organ ihtiyaç duyduğu zamanda enerji sağlar. Adipoz dokudan köken alan mezenkimal kök hücreler kolay bir şekilde çok miktarda elde edilebilme ve

hematopoetik kök hücreler kadar etkin olabilme gibi önemli özelliklere sahiptir. Bu nedenle plastik cerrahi dışında tıbbın birçok branşı tarafından da günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (Gündeşlioğlu ve ark, 2013).

Kisspeptin 145 amino asite sahip bir proteindir (Yardımcı ve Keleştimur, 2019). Kisspeptinler, RF-Amid yapıda olup KİSS-1 geni tarafından kodlanır (Sarıyıldız ve ark). Kisspeptinin reseptörü G-protein reseptör 54'tür. Kisspeptinler GPR54 reseptörüne bağlanırlar. Bu bağlanma GPR54 ün aktivasyonunu sağlar. GPR54 reseptörü, G-protein bağlı reseptörler (GPCR) aile grubunda bulunur (Yardımcı ve Keleştimur, 2019). G-protein reseptör 54 üreme yeteğinin kazanılmasını ve bu yeteneğin sürdürülmesini sağlar. Kisspeptin reseptörü GPR54 ile ilişkili yapılan araştırmalarda, bu reseptör fonksiyonunu baskılayan mutasyonların pubertal gelişim geriliği ve üreme yetenek kaybı ile karakterize hipogonadotropik hipogonadizme sebep olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar GPR54 reseptörünün puberte döneminde normal GnRH aktivitesi için ne kadar önemli olduğunu kanıtlamaktadır (Zülfiye ve Büyükuysal, 2020). GnRH GnRH I ve GnRH II olmak üzere iki moleküle sahiptir. GnRH I, üremede baskın bir rol oynar. GnRH II mevcut çoğu memeli türünde bulunur fakat insandaki görevi hala bilinmemektedir. GnRH II ve reseptörleri, LH artışının kontrol edilmesini sağlar (Barbieri, 2014). GnRH, hipofizden FSH (folikül stimüle edici hormon) ve LH (luteinleştirici hormon) salgılanmasını sağlar (Durmaz ve Dikmen, 2007). FSH ergenlik döneminde memelilerde spermatogenezin başlaması ve genişlemesinde kritik öneme sahiptir (Sharpe, 1989). Luteinize edici hormon hipofiz tarafından çok sayıda moleküler formda kan dolaşımına salgılanır. Luteinize edici hormon bir glikoproteindir. Luteinize edici hormon foliküler olgunlaşmada, korpus luteum gelişiminde, testis ve yumurtalık düzenlemesinde görev alır (Perera ve ark, 2007). LH steroid hormon sentezini düzenler (Rahman ve Rao, 2009). LH yumurtalıklarda granüloza hücrelerini uyarır, FSH ile beraber foliküler olgunlaşma, östrojen üretimi, yumurtlama dönemi, bu dönemden sonra korpus luteumu etkileyerek progesteron üretim ve salgılanmasını gerçekleştirir (Sarıbay ve ark, 2018).

Taşikinin merkezi sinir sisteminde ve periferik dokularda yaygın olarak bulunur. Taşikinin nöronların büyümesinde ve hayatta kalmasında rol aldığı düşünülmektedir. Taşikininler ortak bir C-terminalini paylaşan bir peptid ailesidir. Taşikininler memeli türlerinde nörokininler olarak isimlendirilir. Nörokininler üç gen tarafından kodlanır: Tac1 (Taşikinin geni 1) Substance P ile Nörokinin A'yı (NKA), Tac2 (Taşikinin geni 2) kemirgenlerde Nörokinin B'yi (NKB), Tac3 (Taşikini geni 3) insanlarda Nörokinin B'yi (NKB) kodlar (Yurdakoş ve Mengi, 2009).

Hem memeli hem de memeli olmayan türlerde Substance P izole edilen ilk taşikininidir (Longmore ve ark, 1997). Nörokininler, Substance P (SP), nörokinin A ve nörokinin B'yi içeren bir peptid ailesi oluşturur. Bu peptitler merkezi ve periferik sinir sisteminde büyük oranda her yere dağılmıştır ve kapsaisine duyarlı nöronlarda lokalizedir. Artık iyi bir şekilde kanıtlanmıştır ki, nörokininlerin eylemlerine esas olarak aktivasyon aracılık eder (Campos ve Calixto, 2000). Diğer sayısız nöropeptid arasında, P maddesi, nörokinin A dizilerini içeren öncüler ve nörokinin B büyük miktarda ifade edilir (Regoli ve ark, 1990).

Nörokininler, plazma protein ekstrasvazasyonu, vazodilatasyon, düz kas kasılması ve gevşemesi, tükürük salgısı ve hava yolu kasılması dahil olmak üzere farklı biyolojik süreçlerde yer alır (Campos ve Calixto, 2000).

Yaptığımız çalışmada hipotezimiz; puberteye girişte etkili rol oynayan kisspeptin ve nörokininin, adipoz kaynaklı MHK ile alternatif tedavisinde gen ifadelerinin pasaj sayısı ile incelenmesi.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden beri bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren ve desteğini asla esirgemeyensaygı değer danışman hocam Sayın Prof. Dr. M. Bertan YILMAZ'a, tüm çalışmalar boyunca yanımda destek olup sürekli motive eden Hale ÖKSÜZ'e, çalışmalarımın çeşiti aşamalarında yardımcı olan Arş.Gör.Dr. Seda ILGAZ'a, bu süreçte hep yanımda olan Semiha DOĞAN'a ve Shabnam MOHARAMJOODİ' ye çok teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyen, tüm başarı ve başarısızlıklarında yanımda olan aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. Kök Hücre	1
1.1.1. Kök Hücrenin Ortaya Çıkışı	1
1.1.2. Kök Hücre Nedir?	1
1.1.3. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....	3
1.1.3.1. Embriyonik Kök Hücreler	6
1.1.3.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler	8
1.1.3.3. Hemotopoietik Kök Hücreler	8
1.1.3.4. Mezenkimal Kök Hücreler	9
1.1.4. Kök Hücre Tedavisi	12
1.1.5. Kök Hücre Nişi	13
1.2. Adipoz Doku	13
1.3. Kisspeptin	14
1.4. Nörokinin	23
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	29
3. MATERYAL VE METOD	31
3.1. Materyal	31
3.1.1. Kullanılan cihazlar	31
3.1.2. Kullanılan Malzemeler	31
3.2. Metod	31

3.2.1. Sıçan Adipoz Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu.....	31
3.2.2. Hücre Kültürü	33
3.2.3. Akım Sitometrisi İle MKH Analizi	34
3.2.4. RNA İzolasyonu	35
3.2.5. RNA'yı cDNA'ya Dönüştürme	36
3.2.6. RT-PCR	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1. Bulgular.....	37
4.1.1 Akım Sitometri Sonuçları	37
4.1.2. RT-PCR Sonuçları	43
4.2. Tartışma	44
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	65

Şekil 1.1.	Yetişkin somatik kök hücre izolasyonunun şematik temsili ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelere yeniden programlanmasıyla soylardan türetilmiş üç embriyonik katmana yeniden farklılaşma potansiyeli.	5
Şekil 1.2.	Mezenkimal kök hücre ve hematopoietik kök hücre karşılaştırılması	10
Şekil 1.3.	Mezenkimal kök hücre farklılaşmasını düzenleyen başlıca epigenetik faktörler	12
Şekil 1.4.	Memeli hipotalamik hipofiz gonadal eksenin Pubertede, gonadotropik salgılatıcı hormonun (GnRH) pulsatil salgılanması,	17
Şekil 1.5.	Kisspeptin prekürsörü KP-145 ve karboksi terminal parçasından oluşan kisspeptin-54 (metastin), kisspeptin-14,13 ve 10.....	20
Şekil 1.6.	Kisspeptin-GnRH yolunun nöroanatomisini ve insanlarda ve kemirgenlerde KNDy nöronları ile GnRH nöronları arasındaki ilişkiyi gösteren şematik diyagram.	21
Şekil 1.7.	Nörokinin aracılı inflamatuvar yanıtların altında yatan önerilen mekanizmalar.	26
Şekil 3.1.	Sıçandan adipoz dokunun elde edilmesi.....	33
Şekil 3.2.	Hücre kültürü pasaj aşamaları	34
Şekil 4.1.	Granülötesi side scatter (SSC) ve büyüklüğü forward scatter (FSC) olarak P ₅ de hücrenin genel popülasyonu akım sitometrisinde değerlendirildi.	37
Şekil 4.2.	P ₅ 'te Akım sitometrisinde kullandığımız pozitif yüzey belirteçlerinin (CD90, CD29) mezenkimal kök hücrede olduğu saptanmıştır.	38

Şekil 4.3.	P ₅ 'te akım sitometrisinde kullanılan CD45 ve CD29 yüzey markerlerinin hücre popülasyonu yönünden yoğun olduğu tespit edilmiştir.....	39
Şekil 4.4	P ₆ 'da granülite side scatter (SSC) ve büyüklüğü forward scatter (FSC) olarak P ₆ 'da hücrenin genel popülasyonu akım sitometrisinde değerlendirildi.....	40
Şekil 4.5	P ₆ 'da akım sitometrisinde kullandığımız pozitif yüzey belirteçlerinin (CD90,CD29) mezenkimal kök hücrede (MKH) olduğu saptanmıştır.	41
Şekil 4.6	P ₆ 'da akım sitometrisinde kullanılan CD45 ve CD29 yüzey markerlerinin hücre popülasyonu yönünden yoğun olduğu tespit edilmiştir.....	42
Şekil 4.7.	Kisspeptin reseptör geni için P ₄ grubu referans alındığında P ₇ örneğinin katlı değişimi.....	43
Şekil 4.8	Taşikinın reseptör geninde P ₄ grubu referans alındığında P ₅ örneğinin katlı değişimi.....	43
Şekil 4.9.	Taşikinın reseptör geninde P ₅ grubu referans alındığında P ₇ örneklerinin katlı değişimi.....	44
Şekil 4.10.	Taşikinın reseptör geninde P ₄ grubu referans alındığında P ₅ örneklerinin katlı değişimi.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
SP	: Madde P
NKA	: Nörokinin A
NKB	: Nörokinin B
LH	: Luteinleştirici hormon
KH	: Kök hücre
FH	: Farklılaştırılmış soy
MKH	: Mezenkimal kök hücre
ASC	: Yetişkin kök hücre
CFU-F	: Koloni oluşturan birim fibroblastlar
PL	: Plasenta
BM	: Kemik iliği
TK	: Taşikininler
MSS	: Merkezi sinir sistemi
PBS	: Fosfat tamponlu salin
MEM	: Modified Eagle Medium
FBS	: Fetal bovine serum
PCR	: Polimeraz Zincir reaksiyonu
CT	: Eşik döngüsü
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
ICV	: Terapötik ajanlar
AT	: Adipoz doku
ml	: Mililitre (1/1000 l)
µl	: Mikrolitre (1/1000 ml)
MMLV	: Moloneymurin lösemi virüsü
RNA	: Ribonükleik asit
FSH	: Folikül stimüle edici hormon

FGF : Fibroblast büyüme faktörü
mRNA : Mesajcı ribonükleik asit
cDNA : Komplementer deoksiriboz nükleik asit
NK : Nörokinin
SSC : Side Scatter
FSC : Forward Scatter
TNF : Tümör nekroz faktör
SS : Baskılayıcıdizi
IL1a : İnterlökin 1a
IL1b : İnterlökin 1b
IL : İnterlökin
SCA1 : Kök hücre antijeni 1
CD : Farklılaşma kümesi

1. GİRİŞ

1.1. Kök Hücre

1.1.1. Kök Hücrenin Ortaya Çıkışı

İnsanlık tarihinin başından itibaren insanlar hasar gören organları yenisiyle değiştirmeyi hedeflediler. Tarih boyunca transplantasyon düşüncesi bu hedef üzerine yoğunlaştı ve sfenksler, deniz kızları mitolojide birer transplantasyon örneği olarak yerini aldı (Şahin, 2005).

Kök hücre kavramı da tarihte ilk kez mitolojide ortaya çıkmıştır. Hikayede ateşi Olimpos dağındaki, tanrılardan çalarak insanlığa hediye eden Prometheus'un bunun üzerine Zeus tarafından cezalandırılması anlatılır. Zeus Prometheus'u Kafkas (Kaf) dağında bir kayaya bağlar ve karaciğeri her gün bir kartal tarafından yenilmesi şeklinde bir cezaya çarptırır. Prometheus'un karaciğeri her gün kendisini yeniler. Bu hikayede anlatılan karaciğer hücrelerinin rejenerasyon yeteneği kök hücre kavramını meydana getirdiğine inanılır (Sağsöz ve Ketani, 2008). Yüzyıllar sonra bu transplantasyon düşüncesi ve teknolojisi, önemli bir bilim insanının eline geçerek klasik edebiyatın en önemli uç örneklerinden olan Mary Shelley'in "Frankenstein" romanına konu olmuştur (Çapkin ve ark, 2010).

1.1.2. Kök Hücre Nedir?

Kök hücreler, kendini yenileme özelliğine sahip olup in vivo ve in vitro ortamlarda uygun bir mikroçevrede birden fazla *özelleşmiş* hücre tipine dönüşebilen farklılaşmamış hücrelerdir (Karaşahin, 2012).

Kök hücreler insan vücudunun ana hücrelerinden biridir. Geçmişte, kök hücrelerin yalnızca aynı organın olgun hücrelerine farklılaşabileceğine inanılıyordu (Rajabzadeh ve ark, 2019).

Kök hücreler işlev ve içerik bakımından birbirinden farklı bir grup hücrelerdir ve tek bir tanım altında toplamak oldukça zordur. Bu nedenle 3 temel ölçüt kök hücrenin tanımını oluşturur;

- 1) Kendini yenileme
- 2) Farklılaşma yetkinliği
- 3) Klon oluşturma yeteneği

Yapılan çalışmalarda tek tek hücrelerden elden edilen embriyonik kök hücrelerinin 300-400 döngü boyunca çoğaldığı gösterilmiştir ve bu çoğalma sonucunda oluşan hücrelerin özelleşmediği ve bu sebeple de bu hücrelerin uzun süre kendilerini yenileyebilme kabiliyetine sahip olduğu kanıtlanmıştır. Kromozomların uç kısmında telomer denilen DNA zincirleri bulunur ve bu zincir hücrelerin bölünme kapasitesini belirler. Yani hücrelerin bölünebilmesi telomer uzunluğu ile doğru orantılıdır. Telomeraz enzimi ise telomerin uzun kalmasını sağlar. Bir hücrede telomer uzunluğu telomeraz enziminin ne kadar aktif olduğu ile ilgilidir. Kök hücrelerde bulunan telomeraz enzimi oldukça yüksek aktiviteye sahiptir. Bu nedenle de kök hücreler çok sayıda bölünebilirler (Şahin, 2005).

Kendini yenileme kavramı birçok kaynakta sınırsız bölünme anlamında kullanılsa da bu yanlış bir tanım olur. Çünkü birçok kök hücre ölümsüz değildir. Örneğin kemik iliği mezenkimal kök hücresi 40-60 bölünme sonucu yaşlanıp kök hücre özelliklerini kaybeder (Can, 2013). Kök hücreler 2 yolla kendini yenilemeyi gerçekleştirir: çevre asimetrisi, bölünme asimetrisi. Her iki yolda da ortaya çıkan yeni hücrelerin biri kök hücre havuzuna katılır diğeri farklılaşma yoluna gider. Ancak çevre asimetrisinde çevre faktörleri seçici rol oynar ve bazen ortaya çıkan iki yeni hücre de farklılaşmadan kök hücre havuzuna girer. Bölünme asimetrisinde hücre içeriği ve yakınındaki başka bir hücre ile ilişkisi sonucunda sitoplazmada ortaya çıkan faktörlerin hücre içerisindeki dağılımının farklı olması sebebiyle sitoplazmanın bölünmesi beraberinde farklı iki yapıda hücreyi meydana getirir.

Bunlardan kök hücreye benzeyen kök hücre olmaya devam ederken diğer hücre farklılaşır (Can, 2013).

Farklılaşma kök hücrenin gelişim aşama sırasında hangi basamakta yer aldığı ile ilişkilidir. Farklılaşma göreceli bir kavramdır. Yani bir hücrenin farklılaşması ve bu nedenle fenotipinde meydana gelen farklılıklar ancak bir başka hücreyle kıyaslandığında anlaşılmaz. Farklılaşmada rol oynayan faktörlerden en önemlisi epigenetik mekanizmalardır. C.Waddington 1957’de oluşturduğu model sayesinde bu hücre farklılaşması üzerinde rol alan ve kalıtılabilen genom düzenlemeleri sözü edilen hücrenin hangi farklılaşma olacağını belirlemekte daha da önemlisi bu mekanizmaların etkisinin artması ya da azalması nedeniyle hücre durum değiştirebilmekte yani vücuttaki öncü ya da kök hücrelerde ona göre davranır. Farklılaşma ileriye ya da geriye farklılaşma olmak üzere ikiye ayrılır. Olağan olan bir hücrenin farklılaşma yolunda ileri gitmesidir ancak gerektiğinde farklılaşmaya başladığı noktaya geri dönmesi geriye farklılaşma olarak adlandırılır. Uyarılmış pluripotent kök hücreler geriye farklılaşmanın gerçekleştiği en önemli örneklerdendir (Can, 2013).

Kök hücrenin vazgeçilmez özelliklerinden biri de klon oluşturma yeteneğidir. Bu yetenek tek kök hücreden çok sayıda yeni kök hücrelerin üremesi olarak tanımlanabilir. Klonalite kök hücreler arasında yapılacak kıyaslamalarda kullanılır. Örneğin; klon büyüklüğü, klon oluşturma hızı gibi kıyaslamalar yapılabilmektedir. (Can, 2013).

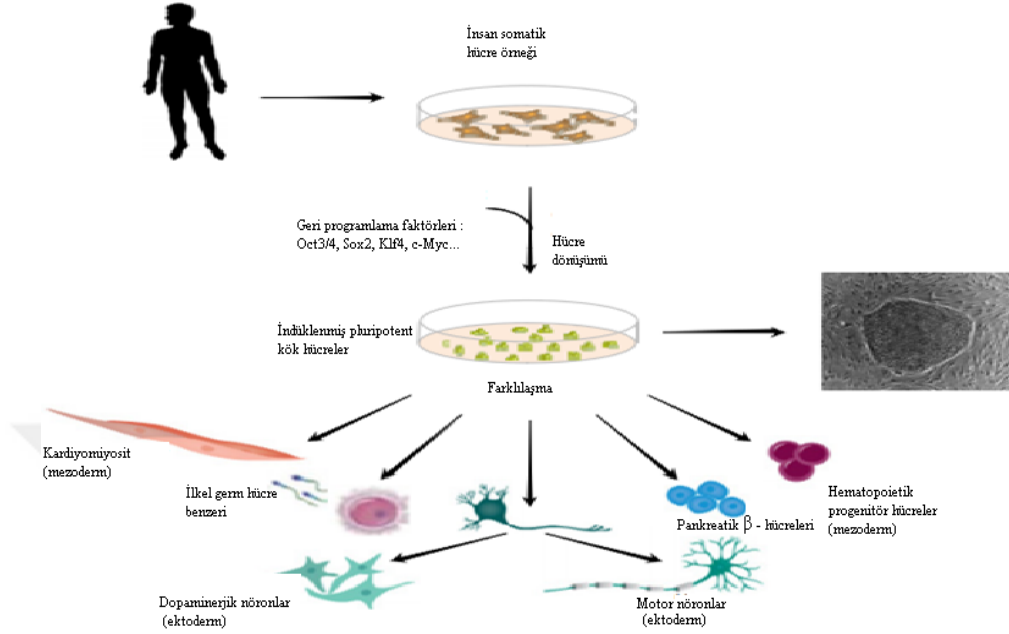
1.1.3. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre 5 grupta incelenir; (Avcılar ve ark, 2018)

- 1) Totipotent Kök Hücreler: Bu hücreler; embriyo ve sonrası tüm doku ve organlar ile embriyo dışı membranları ve organları veren, sonsuz farklılaşma ve bambaşka yönlere gidebilme yeteneğine sahip hücrelerdir

(Karaşahin, 2012). Fertilizasyondan sonra her bir bölünme ile oluşan hücreye ise blastomer denir (Yılmaz ve Tekmen, 2018). Fertilizasyondan sonra sekiz hücreye kadar olan tüm blastomerler totipotent kök hücre olarak kabul edilir (Karaşahin, 2012).

- 2) Pluripotent Kök Hücreler: Canlı vücudundaki birden fazla doku oluşurken bu kök hücrelerden köken alır. Embriyoblast olarak adlandırılan blastosistin iç hücre kitlesinde bulunan hücreler çok farklı hücre çeşidine farklılaşabilirler ve bu hücreler endoderm, ektoderm ve mezodermden köken alır. Pluripotent kök hücrelere en iyi örnek blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonel kök hücrelerdir (Karaşahin, 2012). 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka isimli bilim insanları indüklenmiş pluripotent kök hücre tanımını ortaya atmışlardır. İndüklenmiş pluripotent kök hücre kısaca somatik hücrenin pluripotent özellik kazanmasıdır (Sevim ve Gürpınar, 2012). Yamanaka ve ark. tarafından retroviral gen aktarım metodu ile Oct^{3/4}, Sox-2, Klf-4, c-Myc, genleri kullanılarak fare cilt fibroblast hücreleri pluripotent kök hücrelerine dönüştürebilmeyi başarmışlardır. Bu hücrelere indüklenmiş pluripotent kök hücre adını vermişlerdir (Avcılar ve ark, 2018). Aynı çalışma grubu bir yıl sonra erişkin insan hücrelerinden insan indüklenmiş pluripotent kök hücresi elde etmiştir. Bu çalışmalar farklılaşmış olan bir hücrenin bile kök hücre haline dönebileceğinin kanıtıdır (Çoban, 2013).



Şekil 1.1. Yetişkin somatik kök hücre izolasyonunun şematik temsili ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelere yeniden programlanmasıyla soylardan türetilmiş üç embriyonik katmana yeniden farklılaşma potansiyeli (Bayart ve Cohen-Haguenauer, 2013).

- 3) Multipotent Kök Hücreler: Multipotent kök hücreler diğerlerinin aksine bölündüklerinde tek bir yönde farklılaşan kök hücrelerdir. Gelişimlerinin ileri safhalarında hücreler daha özelleşmiş görevlere yönelir ve artık onlar erişkin kök hücrelerdir. Bu kök hücreleri erişkinliklerinde tipik olarak bulundukları dokunun hücre tiplerini üretmekle görevlidirler. Multipotent kök hücrelere en iyi örnek kemik iliği kök hücresidir (Karaşahin, 2012).
- 4) Oligopotent Kök Hücreler: Belirli bir doku ya da organda en az iki hücre hattına farklılaşabilen kendini yenileme özelliğine sahip kök hücrelerdir. Oligopotent kök hücrelere miyeloid ve lenfoid hücrelere dönüşebilen miyeloid ve lenfoid öncül (progenitör) hücreler örnek verilebilir (Avcılar ve ark, 2018).

- 5) Unipotent Kök Hücreler: Sadece tek bir hücre çeşidine dönüşebilen kendini yenileme özelliğine sahip en az farklılaşan kök hücrelerdir. Kas kök hücreleri de yalnız olgun kas hücrelerine farklılaşabilir bu nedenle unipotent kök hücre grubunda yer alır (Avcılar ve ark, 2018).

Kök hücreler rejeneratif tıp uygulamalarının temelini oluşturur çünkü tahribe uğramış bir organın fonksiyonlarını düzeltmek için en iyi seçim yerine yenisini koymaktır. Bu noktadan hareketle kök hücreler birden fazla kaynaktan elde edilip, vücudun çeşitli doku ve hücre tiplerine dönüştürülüp hasarlı bölgeleri tamir ederek pek çok sağlık sorununun tedavisine ışık tutabilir. Kök hücre ile tedavinin temelinde hastaya ait hücreler görevini artık yapamadığında bu bölgelere kök hücre enjekte ederek işlev kazandırmak yatar (Atalayın ve ark, 2012).

Kök hücrelerle ilgili birçok gruplandırma yapmak mümkündür ama günümüzde en çok kabul göreni elde edinilen kaynağa göre yapılan gruplandırma yöntemidir.

- A) Embriyonik kök hücreler
- B) Embriyonik olmayan kök hücreler
 - I- Hematopoetik kök hücreler
 - a- Kemik iliği kök hücreleri
 - b- Periferik kan kök hücreleri
 - c- Göbek kordon kanı kök hücreleri
 - II- Stromal (mezenkimal) kök hücreler
 - III- Organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreleri

1.1.3.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler fertilizasyonun beş ve altıncı günlerinde iki katmanlı olarak oluşan blastosistin içerisinde bulunan hücre kitlesinden elde edilir. Dış hücre katmanı olan trofoblast plasentayı ve amnion zarını oluşturur, iç hücre

kitlesi ise ektoderm, endoderm ve mezoderm doku hücrelerini oluşturur. Embriyonik kök hücrelerin eldesi ise ilk defa iki farklı araştırmacı grubu tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu iki araştırma grubu da embriyonik kök hücreleri fare embriyolarından elde etmiştir. 1998’de ise Thomson ve arkadaşları tarafından kendini yenileyebilme ve pluripotent özelliğe sahip olan ilk insan embriyonik kök hücresi elde edilmiştir (Avcılar ve ark, 2018).

Embriyonik kök hücreler blastosist ve tümörjenez ile ilişkilidir. İnsan embriyonik kök hücrelerinin kullanımı yasal ve etik hususları içerir. Yetişkin kök hücrelerde ise bu sorunlar daha az ciddidir (Ding ve ark, 2011).

Embriyoid cisimcikler ise embriyonik kök hücreden elde edilen hücre kümeleridir. Bunlar plasenta dahil olmamakla birlikte ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarından köken alan çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilir. Embriyonik kök hücreler, hücre kültür ortamında uzun süre yüksek derecede telomeraz ekspresyonu ve aktivasyonu gösterirler. Embriyonik kök hücrelerin kendi kendilerini yenileme kapasiteleri sınırsızdır ayrıca tüm fetal dokulara ve erişkin kök hücrelerle birlikte daha bunların farklılaşmış progenitörlerine farklılaşabilir (Ateş, 2016).

Embriyonik kök hücreler vücuttaki diğer hücrelerle kıyaslandığında çok daha yüksek bir çekirdek/sitoplazma hacmine sahiptir. Pronükleus yapısı çok belirgindir. Diğer bir önemli özelliği ise kanser hücreleri gibi sürekli bölünebilme yeteneğine sahiptir ancak kanser hücrelerinden ayrı olarak normal bir karyotip yapısına sahiptirler. Embriyonik kök hücreler tanımlanırken ileri moleküler tanımlama teknikleri kullanılır ancak embriyonik kök hücrelerin erken döneminde ekspresyon gösteren işaretçilerin (SSEA -1, 3, 4, TRA-1-60 ve 81 vb) ya da gen ürünlerinin (OCT-4, Alkalın Fosfataz vb.) immünohistokimyasal yöntemler ile boyanması tekniği kullanılarak immünolojik olarak da tanımlanabilirler (Karaşahin, 2012).

İnsan embriyonik kök hücrelerinin çalışılmasındaki etik sorunlar ve hücrelerin tedaviye yönelik kullanımları sırasında oluşabilecek immün yanıt

sebebiyle bu alandaki çalışmalar olumsuz olarak etkilenmiştir (İskender ve Canatan, 2013). Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı 2005 yılında yayımladığı bir genelge ve 2006 yılında yayımladığı bir kılavuz ile insan embriyonik kök hücre çalışmaları yasaklanmıştır (Karaşahin, 2012).

1.1.3.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

Bir diğer kök hücre grubu doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan, farklılaşmamış hücrelerden oluşan, kendi kendini yenileyebilen ve içinde bulunduğu doku veya organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahip olan embriyonik olmayan kök hücrelerdir. Bu kök hücrelerin organizmadaki asıl görevleri ise içinde bulundukları dokuyu tamir etmek ve dokunun bütünlüğünü sağlamaktır (Ateş, 2016).

Yapılan çalışmalarda henüz erişkin kök hücrelerin de embriyonik kök hücrelerinde olduğu gibi her çeşit dokuya kaynaklık edebileceği konusunda net bir sonuca varılamamıştır. Erişkin kök hücreler, bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücre olarak tanımlanabilir. Erişkin kök hücreler kendilerini yenileyebilir ayrıca içinde bulunduğu doku veya organın özelleşmiş hücre tiplerine de farklılaşabilir. Erişkin kök hücrelerine somatik kök hücre de denir. Somatik kök hücrelerin asıl görevleri, bulundukları dokuyu onarmak ve dokunun devamlılığını sağlamaktır (Sağsöz ve Ketani, 2008).

1.1.3.3. Hematopoietik Kök Hücreler

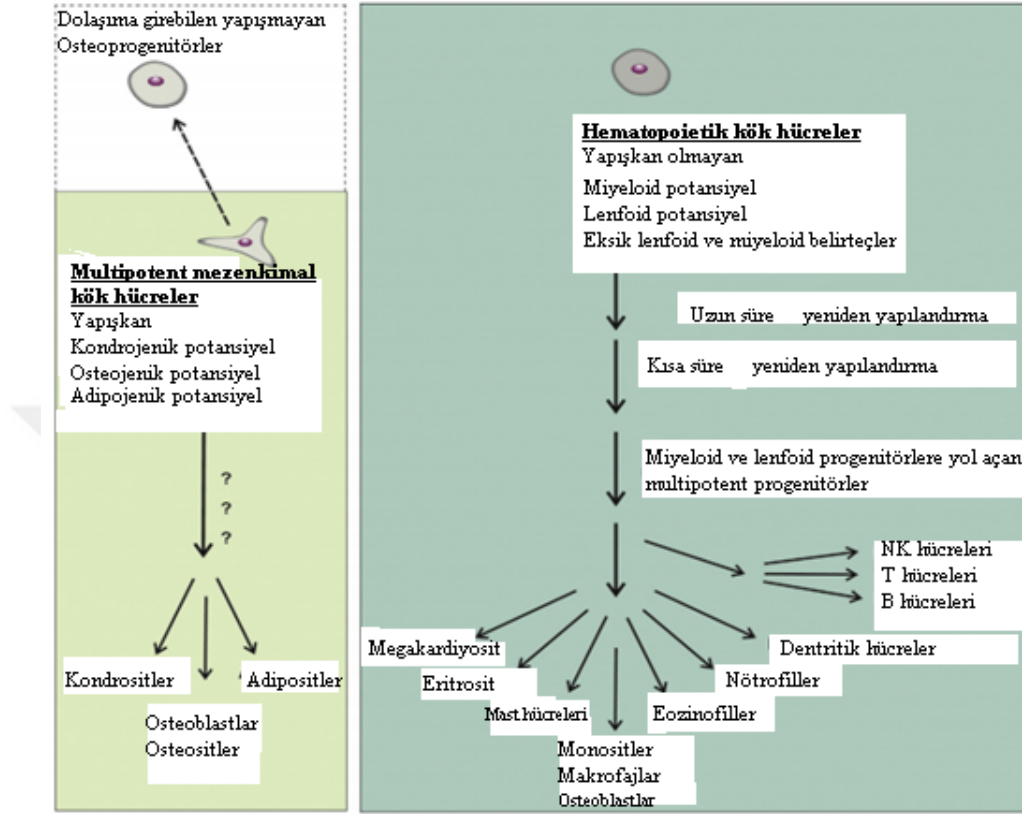
1963'te, Till ve McCulloch kemik iliğinde klonal olarak çoğalan ve hematopoietik hücrelerin tüm soylarına yükselen tek bir progenitör hücre tipi tanımladı. Bu araştırma HKH'lerin ilk karakterizasyonunu temsil eder (Rajabzadeh ve ark, 2019). Hematopoetik kök hücreler organizmadaki tüm kan hücrelerini hayat boyu oluşturur. Hematopoetik hücreler kendi popülasyonlarını yenileyebilmek için tüm kan soylarına göre farklılaşabilirler. Kan hücrelerinin devir hızı çok yüksek olması nedeniyle diğer hücrelerden ayrılır. İnsan organizmasında bir saniyede 10^6

kan hücresinin üretildiği tahmin edilmektedir. Bundan dolayı hematopoetik kök hücreler dinamik kan üretim sistemini sürdürebilmek için organizmanın taleplerine hızlı bir şekilde cevap vermek ve çevresel stresten kendilerini korumak için evrimsel olarak korunmuş mekanizmalara sahiptir. Bu mekanizmaların birçoğu yalnızca hematopoetik kök hücreye aittir (Szade ve ark, 2018). 60 yaş üstü için hematopoietik kök hücrelerin nakli birkaç genetik hastalık için başlıca iyileştirici tedavi olmuştur (Rajabzadeh ve ark, 2019).

1.1.3.4. Mezenkimal Kök Hücreler

Somatik kök hücre kaynağı olarak en iyi tanımlanan mezenkimal kök hücrelerdir. Bunların başında ise kemik iliğinden izole edilen stromal hücreler ve kandan aferez yöntemi ile izole edilen hematopoetik kök hücreler gelse de yakın zamanlarda yapılan çalışmalar, mezenkimal kök hücrelerin sadece mezenkim tabakası değil onun haricindeki tabakalardan farklılaşan doku hücrelerine de farklılaştığını göstermiştir (Çapkın ve ark, 2010).

Kemik iliğindeki stromal bölmede hematopoetik olmayan multipotent hücreler ilk olarak Friedenstein ve meslektaşları tarafından tanımlandı. Yapılan tanım “Kemik iliğinden köken alan ve uygun uyaranlarla üç temel seri; osteojenik, kondrojenik, adipojenik seriye farklılaşabilen CD73, CD54 (ICAM-1), CD105, CD39, CD49e ($\alpha 5$ - integrin) gibi belirteçleri eksprese eden uzantılı fibroblast benzeri multipotent hücrelerdir (Ateş, 2016; Baker ve ark, 2015). Bu hücreler yüksek proliferatif potansiyele ve kabiliyete sahiptir. Ayrıca, immünsüpresyona ve doku iyileşmesine katkıda bulunabilen immünomodülatör olarak görev yapmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin geniş çapta hasar görmüş ve yaşlanmış hücrelerin yerini almak için bir rezerv olarak hizmet ettiği düşünülmektedir ve doku rejeneratif hücre tedavilerinde potansiyel kullanımları için en uygun hücre grubudur. Mezenkimal kök hücreler her ne kadar yüksek rejeneratif özelliğe sahip olsa da araştırmalar dokuda bulunan yerleşik mezenkimallerin rejeneratif fonksiyonunun zamanla yani yaşlılıkla birlikte azaldığını göstermektedir (Baker ve ark, 2015).



Şekil 1.2. Mezenkimal kök hücre ve hematopoietik kök hücre karşılaştırılması (Baker ve ark, 2015)

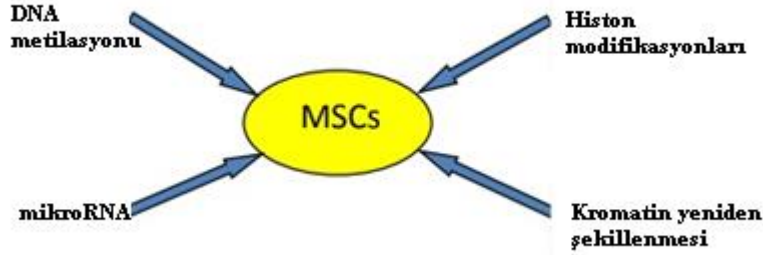
Mezenkimal kök hücreler oldukça yüksek proliferasyon özelliğe sahiptir. Adiposit, osteosit dahil olmak üzere birçok farklı hücre tiplerine farklılaşma yetenekleri bulunur. Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, deri, yağ dokusu, tendon, sinovyal membran, periodontal ligament ve sinir sistemi gibi dokulardan kolaylıkla temin edilebilir (Ghanbani ve ark, 2014).

Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (ISCT) belirttiği şartlara göre bir hücrenin mezenkimal kök hücre sayılması için hücrelerin plastiğe yapışmaları, yüzey belirteçlerinin CD73, CD90 ve CD105 antikorlarını taşıması ve osteoblast, adiposit, kondroblastta değişebilme kapasitesi göstermeleri gibi özellikleri taşımaları gerekir (Mohamed-Ahmet ve ark, 2018).

Canlılarda bulunan beyin, kalp, karaciğer benzeri organlar önemli görevleri yerine getirir ve önemli bir tahribata uğradıklarında yenilenmeleri çok zordur. Kök hücrelerin en belirgin özellikleri bölünebilme ve farklılaşma yeteneğine sahip olmalarıdır bu nedenle hastalık ya da yaralanma sonucu hasar gören organ ve dokuların kendini onarmasında kullanılabilirler. Günümüzde bilim insanları transplantasyonun yerini alabilecek ve transplantasyon imkanı olmayan hastalar için kullanılacak kök hücre tedavisi ile ilgili çalışmalar yapmaktadırlar. Bu çalışmalar sayesinde kök hücreler diyabet, kalp kasının yenilenmesi, romatizma grubundaki hastalıklar, parkinson ya da alzheimer gibi sinir sistemi hastalıkları, sinir sistemi ve omurilik yaralanmaları, karaciğer hasarları gibi bozukluklarda kullanılabilir (Sağsöz ve Ketani, 2008).

Epigenetik faktörlerin kök hücre kaderini ve farklılaşmasını belirlemede önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Mezenkimal kök hücreler, biyoloji ve rejeneratif tıptaki deneysel alanlardaki önemli uygulamaları nedeniyle en çok çalışılan kök hücre popülasyonudur. Epigenetik değişikliklerin mezenkimal kök hücre biyolojisi ve farklılaşma protokolleri üzerindeki rolünü osteositik, kondrositik ve adipositik farklılaşmasını belirler.

Epigenetik, DNA dizisinde değişiklik olmaksızın genlerin ifadesini içeren kalıtsal değişiklikler kümesini ifade eder. Geçtiğimiz birkaç sene içinde, çoğu araştırma epigenetiğin embriyonik üzerindeki etkilerini araştırdı. Bu çalışmada pluripotent kök hücrelerde ki epigenetik değişikliklerin alternatif soylara farklılaşmayla ilişkili genleri baskılayarak belirli bir soyağacına bağlandığı gösterildi. Bu araştırma, epigenetiğin mezenkimal kök hücreninlerin biyolojisi üzerindeki etkisine ve osteositik, kondrositik, adipositik farklılaşma protokollerine odaklanarak ışık tuttu (Mortada ve Mortada, 2018).



Şekil 1.3. Mezenkimal kök hücre farklılaşmasını düzenleyen başlıca epigenetik faktörler (Mortadave Mortada, 2018)

Bir çalışmada embriyonik kök hücrelerin pluripotent oldukları için hücresel tedavide kullanılması her ne kadar avantajlı görülsede hem yasal düzenlemeler hem de etik problemler nedeni ile ikinci planda kalmaktadır. Bu durum mezenkimal kök hücreler ile gerçekleştirilen araştırmaların artmasını ve daha büyük bir umutla bu hücreler üzerinde çalışılmasını sağlamıştır. Mezenkimal kök hücrelerinin farklılaşması her ne kadar köken aldığı tabaka hücreleri ile sınırlı olsa da immün yanıt oluşturmaması açısından en çok tercih edilen hücreler olmalarına sebep olmaktadır (Çapkın ve ark, 2010).

1.1.4. Kök Hücre Tedavisi

Kök hücre tedavisi son on yılda geliştirilmiştir. Yine de, istenmeyen yan etkileri içermesi, nakledilen hücrelerin zayıf hücre göçü ve hayatta kalma sorunları gibi engeller kalmıştır. Bu problemlerin üstesinden gelebilmek için hücre kaybını azaltmayla birlikte uzun vadeli *in vitro* kök hücrelerin tutulmasını sağlayan biyolojik olarak uyumlu ve *biyolojik* olarak parçalanabilen biyomalzemeler hücre tedavisi kullanılmaya başlandı. Şu anda klinik deneylerde, bu biyomalzemeler ilaç ve hücre tedavi sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Belirtilen biyomalzemeler sayesinde rejeneratif ilaçların, doku mühendisliğinde kullanılan vücuttaki yabancı maddelerin uzun süreli hayatta kalmasını sağlar ve hücrelerin salınımı kontrol edilir (Rajabzadeh ve ark, 2019).

İnsanlar ve hayvan arasında biyoloji bakımından birden fazla benzerlikler bulunur. İmmün fonksiyon: İnsan-Fare; kardiyovasküler fonksiyon: İnsan-Köpek; çocuk felci: Maymun-İnsan gibi eşleşmeler bu benzerliklere örnek verilebilir (Kaya ve Çevik, 2011). Fare, sıçan gibi hayvanların köpek, domuz, koyun gibi büyük türlerle göre maliyetinin düşük olması, bulunmasının daha kolay olması ve deney sonrasında yaşatılabilmesinin daha kolay olması gibi nedenlerden dolayı tercih sebebidir (İskit, 2005).

Hayvanlarda çeşitli hastalıklar hücre bazlı terapi ile tedavi edilebilir. Ancak, kök hücrelerin kullanıldığı hücre tedavisine ilişkin bağışıklık sorunları bulunabilir. Bu nedenle kök hücrelerin nihai olarak kullanılması hayvan modellerinin iyileştirilmesi ve uygun yöntemlerin seçilmesi aşılama ve nakil için yardımcı olabilir ve kolaylık sağlar (Rajabzadeh ve ark, 2019).

1.1.5. Kök Hücre Nişi

Kök hücreler kendilerini farklılaşmamış ve yenileyen bir durumda tutan özel mikro ortamlarda bulunur. Bu ortam kök hücre nişi olarak adlandırılır. Çeşitli dokularda yapılan kapsamlı çalışmalar nişin önemini göstermiştir. Kemik iliği dahil olmak üzere kök hücre davranışını modüle etmede cilt, bağırsak, iskelet kası, ses teli, beyin, omurilik, mide, yemek borusu kullanılabilir. Yakın geçmişte modern teknikler kullanılarak kök hücre nişlerini tanımlama ve karakterizasyonda olağanüstü ilerleme sağlanmıştır. Bu ilerleme mikro ortamda ana hücresel bileşenlerin tanımı hücreler bulunur ve kök hücrenin moleküler mekanizmalarının belirlenmesi davranış kontrol edilir böylece kök hücre düzenlemesinde yer alan anahtar niş sinyalleri ortaya çıkarır. Bir organizmanın ekolojik nişine benzer şekilde, bir kök hücre nişine özeldir. Kök hücre aktivasyonu veya hareketsizliği, kök hücre mikro ortamının birkaç bileşeni, niş bileşiminin karmaşıklığına bağlıdır (Birbrair,2017).

1.2. Adipoz Doku

Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin örnek toplama için gereken nispeten invaziv prosedürün yanı sıra hücre sayısında, proliferasyonda ve yaşla

farklılaşma kapasitesinin azalmasından dolayı klinik uygulanabilirliği sınırlıdır. Bu nedenle, kemiğe alternatif olarak birden fazla doku araştırılmıştır. Bunlar: plasenta, adipoz; fetal akciğer, göbek kordon kanı ve diğerleri (Jeon ve ark, 2016).

Adipoz doku, enerji birikiminin başlıca depolama alanlarıdır ve diğer organlar için ihtiyaç zamanında enerji sağlar. Depolama kapasitesine sahip hücreler olan olgun adipositlerden oluşur. Normalleştirildiğinde hücre sayısı, adipoz dokusunun sadece % 20-30'u olgun adipositlerden oluşur; diğer % 70-80'i sözde stromal vasküler fraksiyondan oluşur (Müller ve ark, 2015).

Adipoz dokunun elde edilebilirliğinin kolay olması, kemik iliğine kıyasla daha fazla kök hücre üretebilmesi, ayrıca adipoz doku kökenli kök hücrelerin etkinliğinin hücre içi ve hücre dışı çalışmalarda kanıtlanması ile birlikte, yağ doku kökenli mezenkimal kök hücreler jeneratif doku mühendisliği alanında bir çok tıp branşının dikkatini çekmiştir (Gündeşlioğlu ve ark, 2013).

Buna paralel olarak, geçmiş yıllara göre adipoz doku anlayışımız değişti. Sadece 20 yıl önce adipoz doku, inert bir enerji depolama organı olarak kabul edilirken, günümüzde adipoz dokunun enerji depolama ve dağıtımındaki rolünün yanı sıra tüm vücut enerji metabolizmasının düzenlenmesi gibi önemli görevleri olduğu fark edildi (Müller ve ark, 2015).

Adipoz dokudan köken alan mezenkimal kök hücreler kolay bir şekilde çok miktarda elde edilebilmeleri ve hematopoetik kök hücreler kadar etkin olmaları nedeniyle plastik cerrahi dışında tıbbın birçok branşı tarafından da günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (Gündeşlioğlu ve ark, 2013).

1.3. Kisspeptin

Puberte hipotalamo-hipofizer gonadal eksenin aktif duruma gelmesi ile başlar (Semih ve Abdülvahit, 2021). Hipotalamo-hipofizer-gonadal eksen fertilité yeteneğinin oluşması ve sürdürülmesini sağlayan ve diğer sistemlerle karmaşık ilişkileri olan merkezi bir sistem olarak bilinmektedir (Zülfiye ve Büyükuysal, 2020). Puberte döneminde üreme kabiliyeti kazanılır (Yardımcı ve Keleştimur, 2019). Üreme davranışı hayvanların hepsinde önemli bir davranışsal özelliktir. Cinsel davranış, memelilerin karşı cinsle döllenmesini sağlar (Hellier ve ark, 2019).

Puberte döneminde aynı zamanda yetişkinliğe adım atıldığında meydana gelen anatomik, davranışsal ve fizyolojik farklılıklar gerçekleşir (Yardımcı ve Keleştimur, 2019). Hipotalamo-hipofizer-gonadal eksenin puberte döneminde aktivasyonunu nasıl gerçekleştirdiği uzun yıllar gizemini korumuş ve hala bilinmeyen yönleri ile güncel bir araştırma konusu olma özelliğini devam ettirmektedir. Günümüzde, gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) uyarılmasının artmasının puberte başlangıcındaki tetikleyici mekanizmanın önemli bir parçası olduğu düşünülmektedir (Kafa ve Eyigör, 2011). Gonadotropin salgılatıcı hormon omurlulardaki seksüel olgunlaşma ve üremeden sorumlu en önemli düzenleyici hormondur (Durmaz ve Dikmen, 2007). GnRH'ın GnRH I ve GnRH II olarak adlandırılan iki molekülü vardır. GnRH I, Schally ve Guillem'in tarafından keşfedilmiştir. Üremede baskın bir rol oynar. GnRH II mevcut çoğu memeli türünde bulunur ancak insanda işlevi açıkça belirlenmemiştir. GnRH II ve reseptörleri, LH artışının kontrol edilmesinde kritik öneme sahip olabilir (Barbieri, 2014). GnRH, hipofizden FSH ve LH salgılanmasını sağlayan, hipotalamusta üretilen bir dekaeptittir (Durmaz ve Dikmen, 2007).

FSH konusunda genel bir fikir birliği vardır. Bu da FSH'ın ergenlik döneminde memelilerde spermatogenezin başlaması ve genişlemesinde kritik öneme sahip olduğudur ancak normal yetişkin erkekte rolü hala tartışılmaktadır (Sharpe, 1989). Folikül uyarıcı hormon, üreme fizyolojisinin kritik bir düzenleyicisidir. FSH α ve β olmak üzere iki farklı alt birimden oluşan heterodimerik glikoprotein. α -alt birimi tüm hipofiz ve plasental glikoprotein hormonlarında ortak iken β -alt birimi hormona özgü ve heterodimer biyolojik aktivite verir (Das ve Kumar, 2018).

Luteinize edici hormon hipofiz tarafından çok sayıda moleküler formda kan dolaşımına salgılanır. Bu çeşitlilik oligosakkaritlerin yapısındaki farklılıklar nedeniyle oluşur (Perera ve ark, 2007). Luteinleştirici hormon, luteal yapının oluşumunda ve sürekliliğinde görevli olan, 28-34.000 dalton molekül ağırlığı gibi bir büyüklüğe sahip, yarılanma ömrü ise yarım saatten az olan gonadotropik bir hormondur (Sarıbay ve ark, 2018). Luteinize edici hormon bir glikoproteindir. Luteinize edici hormon foliküler olgunlaşmada, korpus luteum gelişiminde, testis

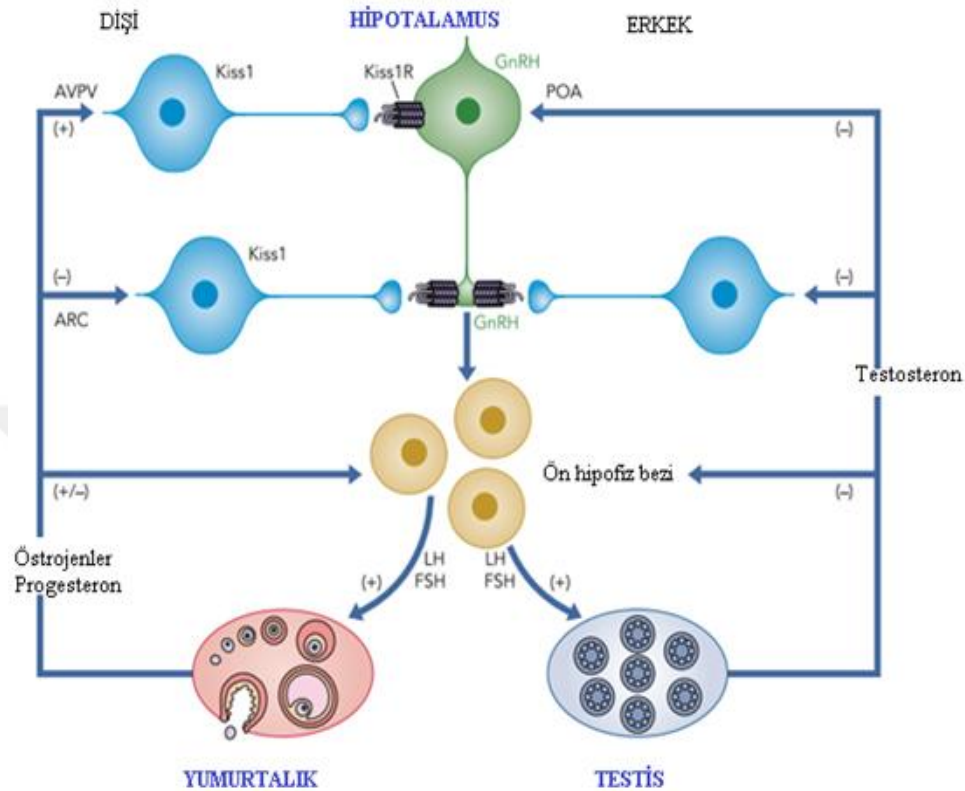
ve yumurtalık düzenlemesinde görev alır (Perera ve ark, 2007). LH steroid hormon sentezini düzenler (Rahman ve Rao, 2009). LH iki farklı glikosile polipeptit zincirinden oluşur ve kovalent olmayan bağlarla bağlanmıştır (Perera ve ark, 2007).

LH yumurtalıklarda granüloza hücrelerini uyararak, FSH ile beraber foliküler olgunlaşma, östrojen üretimi, yumurtlama dönemi, bu dönemden sonra korpus luteumu etkileyerek progesteron üretim ve salgılanmasını sağlar (Sarıbay ve ark, 2018).

GnRH hipotalamustan fetal dönemde salgılanmaya başlar ve bu dönem boyunca aralıklı olarak devam eder. Doğum gerçekleştikten sonra GnRH seviyesi 6 ve 12 ay arasında giderek azalır. Bu azaldığı seviyede çocukluk dönemi boyunca kalır. Sessizlik dönemi bittikten sonra GnRH salınımındaki artış puberte dönemini başlatır. Çocukluk döneminde meydana gelen sessizliğin nasıl bir mekanizma ile gerçekleştiği ve bu duruma neyin sebep olduğu hala bilinmemektedir. Memelilerde GnRH salınımının artması puberteyi başlatırken pubertal sonrası dönemde ise üreme organlarının fonksiyonlarını gerçekleştirilmesini ve bu fonksiyonların devamlılığını sağlamaktadır (Durmaz ve Dikmen, 2007).

Keşfedildiği günden bu yana, GnRH'nin hipotalamik salgılanmasının işlevi üremeyi başlatan ve kontrol eden anahtar yol olarak belirlenmiştir. GnRH'nin yer aldığı temel merkezi rol açıklanmadan kalırken, GnRH nöronal ağının bir dizi işlevsel sınırlaması tespit edilmiştir. Örneğin, sıçanlarda GnRH nöronları östrojen içermez (Skorupskaite ve ark, 2014).

GnRH sistemi, hormon salgılanmasını inhibitör ve eksitator sinyallerle düzenleyen ve hipotalamusun birçok bölgesine kümelenmiş nöronlardan oluşur. Son dönemlerde yapılan araştırmalar ile GnRH etkinliğinin hipotalamustan salınan kisspeptinler tarafından düzenlendiği belirlenmiş ve kisspeptinin puberte döneminin başlaması için uyarıcı bir mekanizmanın en önemli bileşenlerinden olduğu saptanmıştır (Zülfiye ve Büyükuysal, 2020).



Şekil 1.4. Memeli hipotalamik hipofiz gonadal eksenin Pubertede, gonadotropik salgılatıcı hormonun pulsatil salgılanması, ön hipofizi gonadotropik hormonları, luteinize edici hormonu ve folikül uyarıcı hormonu salması için uyarır. Bunlar, gamet oluşumunu ve GnRH, LH ve FSH salınımını düzenlemek için geri besleme döngüleri oluşturan gonadal steroid hormonlarının üretimini teşvik etmek için gonadlar üzerinde hareket eder. Dişilerde, yüksek seviyelerde östrojen ve progesteron, GnRH/LH'nin preovulatuvar dalgalanmasını indüklemek için AVPV'nin kisspeptin nöronlarını uyarır, oysa kavisi çekirdekte (ARC) KISS1 ekspresyonunu inhibe ederler. Erkeklerde, GnRH ve gonadotropik hormon salınımı, kısmen ARC'nin kisspeptin nöronlarının aktivitesi yoluyla, dolaşımdaki testosteron tarafından negatif olarak düzenlenir (d'Angloment ve Colledge, 2010).

Kisspeptinleri kodlayan gen olan KISS1, ilk olarak 1996'da Lee ve arkadaşları tarafından insan habis melanomunda metastaz baskılayıcı olarak tanımlanmıştır. Hershey'de (PA, ABD) keşfedildiği için gen adını kasabada üretilen

ünlü çikolata markası "Kisses" dan almıştır. KiSS1'deki SS, bunun bir "baskılayıcı dizi" olduğunu gösterir. KiSS1 geni kromozom 1q32'de lokalizedir ve dört ekzona sahiptir (Skorupskaite ve ark, 2014).

Kisspeptin sistemi kuş türleri hariç bütün omurgalılar arasında korunur. Ancak omurgalılarda dokularda bulunan kisspeptin miktarı hala belirsizdir (Trevisan ve ark, 2018).

Kisspeptinler, RF-Amid yapıda KiSS-1 geniyle ifadelenen bir nöropeptid ailesidir (Sarıyıldız ve ark). Kisspeptinin reseptörü G-protein reseptör 54'tür. G-protein reseptör 54 üreme yeteğinin kazanılması ve bu yeteneğin sürdürülmesini sağladığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Kisspeptin reseptörü GPR54 ile ilişkili yapılan araştırmada, bu reseptör fonksiyonunu baskılayan mutasyonların pubertal gelişim geriliği ve üreme yetenek kaybı ile karakterize hipogonadotropik hipogonadizme sebep olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar GPR54 reseptörünün puberte döneminde normal GnRH aktivitesi için ne kadar önemli olduğunu kanıtlamaktadır (Zülfiye ve Büyükuysal, 2020).

İlk olarak sıçan beyinde tanımlanan GPR54 daha sonra insanda AXOR12 ve hOT7T175 olarak adlandırıldı (Skorupskaite ve ark, 2014). GPR54 ve ligandı ilk önce kanser üzerine çalışmamalar yapan biyolog araştırma grubu tarafından keşfedilmiştir. Bu araştırma grubu yaptığı deneylerde GPR54 reseptörüne sahip ligandın meme kanseri ve maling melanomlarda tanımlanmış olan bir tümör baskılayıcı geni olan Kiss-1 geninin ürünü olduğunu belirlemiştir (Durmaz ve Dikmen, 2007).

Kisspeptin reseptörü olan GPR54, hipokampus ve korteks gibi beyin ekstra-hipotalamik kısımlarında ifadenir. En başta kiss1 geninin metastazı baskılama ürünü metastin olarak adlandırıldı. Kisspeptinin hipotalamik-hipofiz gonadal aksı düzenlediği ve oksidatif hasara karşı antioksidan enzimin ifadenmesini değiştirdiği bulunmuştur (Akkaya, 2018).

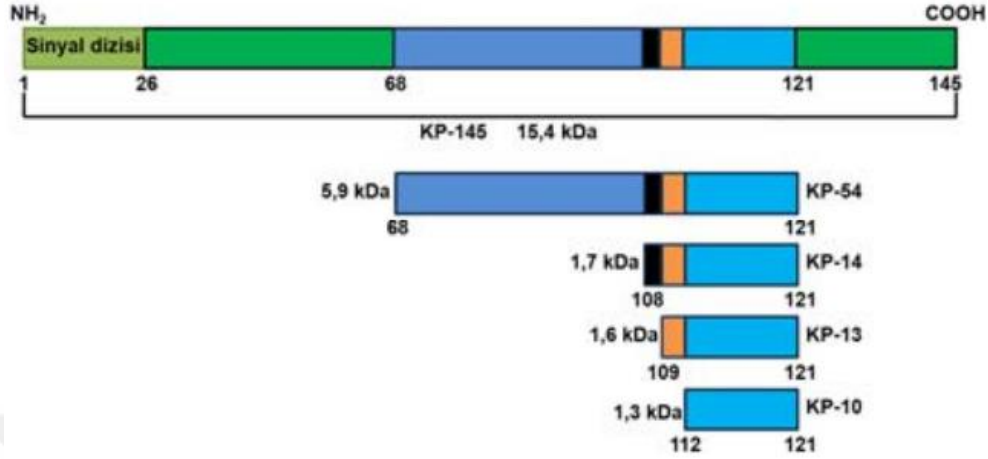
GPR54 reseptörü, memeli beyinde oldukça fazla bulunan galanin almacı ile %45 benzerlik bulundurmaktadır (Kafa ve Eyigör, 2011). 1999'da, GPR54 şu

şekilde keşfedildi: galanın reseptör ailesinin bir üyesi, ancak bu reseptör galanınle spesifik bağlanma göstermedi. 2001'de bağımsız gruplar, kisspeptinin doğal bir ligand olduğunu açıkladı (Trevisan ve ark, 2018).

1999 yılında birden fazla merkezi sinir sistemi bölgeleriyle birlikte çevresel olarak da yerleşen GPR54 reseptörünü kodlayan gen kisspeptin keşfedilmiştir (Kafa ve Eyigör, 2011). 2001 yılına kadar kisspeptin, öksüz G-proteini için bir ligand olarak tanımlandı (Skorupskaite ve ark, 2014). 2001 yılında üç farklı araştırma grubu tarafından yürütülen bağımsız çalışmalar ile GPR54 reseptörünün metastinin (ilerleyen zamanda kisspeptin-54 olarak adlandırılacak) etkilerine aracılık ettiği saptanmış ve bu nedenle öksüz (orphan) bir reseptör olma sınıflandırmasından çıkarılmıştır. İnsanlarda, GPR54 reseptörünün özellikle plasenta, hipofiz, pankreas ve medulla spinaliste fazla miktarda ifade edildiğinin görülmesinden dolayı endokrin fonksiyonları olabileceği varsayılmıştır (Kafa ve Eyigör, 2011).

Northern blot ve in situ hibridizasyon analizleri gösterdi ki GPR54, beyin bölgeleri (orta beyin, talamus, hipotalamus, hipokampus, korteks) ve ayrıca periferik bölgelerle (karaciğer, pankreas ve bağırsak) birlikte plasenta, hipofiz bezi, pankreas, gonadotroflar, testislerde yüksek oranda ifade edilir (Trevisan ve ark, 2018).

Kisspeptin 145 amino asitli bir proteindir ve KiSS-1 geni tarafından kodlanır. Kisspeptin, enzimlerle kisspeptin-54 veya metastin gibi peptidlere parçalanabilir. Kisspeptinlerin 14, 13 veya 10 amino asit içeren küçük peptidlere parçalandıkları da olur ve hepsine kisspeptin adı verilir. Kisspeptin 54, 14, 13 ve 10 arjinin (R) ve amit halde fenilalanin (F) içeren (Rfamid) protein grubunda bulunur. Bu grubun üreme ve enerji metabolizmasıyla ilişkili çok sayıda görevi bulunur. Kisspeptinlerin hepsinde ortak olarak C-terminal dekaeptid (kisspeptin-10) bulunur. Kisspeptinler GPR54 reseptörüne bağlanırlar. Bu bağlanma GPR54'ün aktivasyonunu sağlar. GPR54 reseptörünün aktive olması için gereken en kısa kisspeptin dizisi KiSS-10'dur. GPR54 reseptörü, G-protein bağlı reseptörler (GPCR) aile grubunda bulunur (Yardımcı ve Keleştimur, 2019).



Şekil 1.5. Kisspeptin prekürsörü KP-145 ve karboksi terminal parçasından oluşan kisspeptin-54 (metastin), kisspeptin-14, 13 ve 10.(Kafa ve Eyigör, 2011)

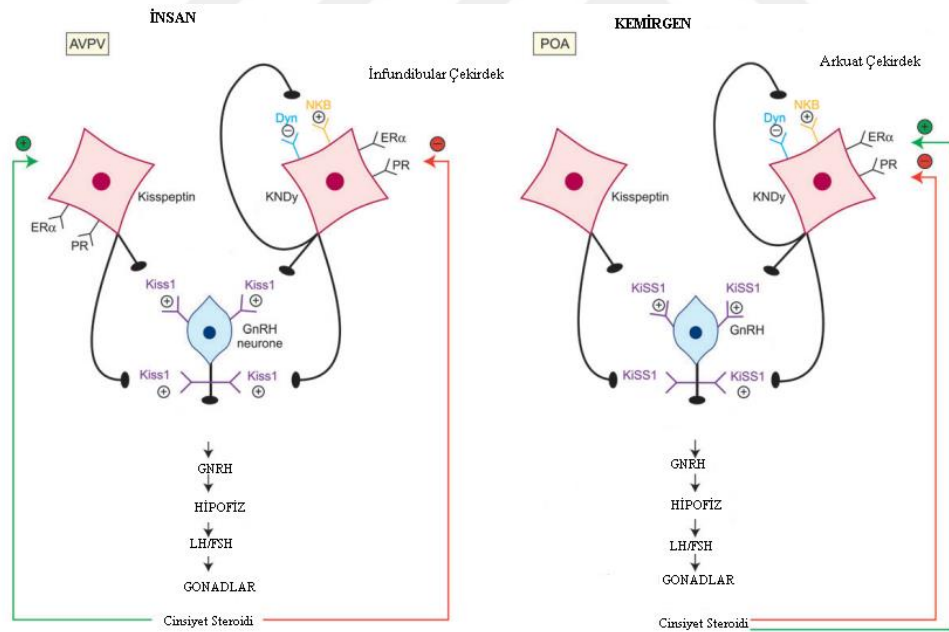
Kisspeptin, insan üremesinin kontrolünde yer alır. KISS1 / GPR54 sisteminin üremeyi kontrol ettiğini gösteren ilk kanıt GPR54 mutasyonları belirten iki farklı çalışmada keşfedilmiştir. Bu çalışmalarda yetersiz luteinize edici hormon ve folikül uyarıcı hormon salgılanmasıyla; Kiss1 / Gpr54 ifade etmeyen ve cinsel olgunluğun olmadığını gösteren transgenik farelerde gonadların hipo gelişimi, hipogonadotropik hipogonadizm ve infertilite gözlenmiştir. İnsanlarda da üreme fonksiyonunun gecikmesi ve kısırlık gibi benzer etkiler gözlenmesi hipogonadotropik hipogonadizm ile ilişkilendirilmiştir (Trevisan ve ark, 2018).

Kisspeptidin üreme ve kısırlığı dikkate alan çalışmalar sınırlıdır. G-protein-bağlı reseptör (GPR54 / KISS1R) hipotalamik tarafından GnRH salınımını uyarır. Kisspeptin ergenliğin başlangıcının önemli bir düzenleyicisi olarak, seks hormonunun düzenlenmesi gonadotropinlerin salgılanması ve doğurganlığın kontrolünü sağlar. Buna rağmen, kisspeptinin ve kısırlıkla ilgili çalışmaları oldukça azdır. Kisspeptinin rolünün anlaşılması, kısırlıkta bir biyobelirteç olarak kullanılmasına yol açabilir (Trevisan ve ark, 2018).

KISS1R, Kisspeptin tarafından bağlandıktan sonra, fosfolipaz C'yi aktive eder ve ikincil hücre içi habercileri, inositol trifosfat ve diasilgliserolü alır, bunlar da Kisspeptinin işlevine aracılık etmek için kalsiyum salınımına ve protein kinaz C aktivasyonuna aracılık eder (Skorupskaite ve ark, 2014).

Son 15 yılda yapılan çalışmalarda kisspeptin nöronal popülasyonunun üreme olgunlaşması ve işlevi dışında ergenlik başlangıcı, gonadotropinin geribildirim regülasyonu, yumurtlamanın nöroendokrin kontrolü, metabolik doğurganlığın modülasyonu, obezite gibi birçok fonksiyonu bulundu (Hellier ve ark, 2019).

Kisspeptin beyindeki hipotalamus bölgesinde KNDy sinir hücreleriyle salgılanır. Normal bir doğurganlık için Kisspeptin'in yanı sıra kisspeptin üretiminde görev alan Nökinin B'nin de bulunması gerekir (Varoğlu ve Erdoğan, 2020).



Şekil 1.6. Kisspeptin-GnRH yolunun nöroanatomisini ve insanlarda ve kemirgenlerde KNDy nöronları ile GnRH nöronları arasındaki ilişkiyi gösteren şematik diyagram.

Kisspeptin, doğrudan Kisspeptin reseptörünü ifade eden GnRH nöronlarına sinyal gönderir. Kisspeptin nöron popülasyonlarının hipotalamus içindeki konumu türe özgüdür, kemirgenlerde anteroventral periventriküler çekirdek ve arkuat çekirdek içinde ve insanlarda preoptik alan ve infundibular çekirdek içinde bulunur. İfundibular çekirdekteki Kisspeptin nöronları, nörokinin B reseptörü ve kappa opioid peptit reseptörü aracılığıyla otosinaptik olarak pulsatil kisspeptin salgısını düzenleyen nörokinin B ve dinorfini (KNDy nöronları) birlikte eksprese eder, nörokinin B uyarıcı ve dinorfindir. Negatif (kırmızı) ve pozitif (yeşil) seks steroidi geribildirimi, sırasıyla AVPV ve arkuat çekirdek yoluyla kemirgenlerde farklı kisspeptin popülasyonları aracılığıyla sağlanır. İnsanlarda infundibular çekirdekteki KNDy nöronları hem negatif (kırmızı) hem de pozitif (yeşil) geribildirimi iletir. POA kisspeptin popülasyonunun insanlarda seks steroid geri bildirimine aracılık etmedeki rolü tam olarak araştırılmamıştır (Skorupskaite ve ark, 2014).

Keşfedilmesinden bu yana, GnRH'nin hipotalamik salgılanması, üreme fonksiyonunu başlattığı ve kontrol ettiği belirlenmiştir. GnRH'nin oynadığı önemli merkezi rol tartışmasız kalırken, GnRH nöronal ağının bir takım işlevsel sınırlamaları tanımlanmıştır. Örneğin, sıçanlarda, GnRH nöronları, başlıca östrojen reseptörü olan ER- α 'dan yoksundur, bu nedenle gonadal geri bildirimine aracılık eden bir ara sinyal yolağına ihtiyaç olduğunu düşündürür. Kisspeptinin insan ergenliğinde zorunlu rolünün keşfi, insan üremesinin nöroendokrin düzenlemesine ilişkin mevcut anlayışta devrim yaratması sadece 2003 yılındaydı. KiSS1 geni tarafından kodlanan bir hipotalamik peptit olan Kisspeptin, GnRH'nin yukarı akışında hareket eden ve cinsiyet steroid geribildirimine ve metabolik ipuçlarına duyarlı yeni bir nöromodulatördür. Kisspeptin artık ergenliğin başlamasının, gonadotropinlerin seks hormonu aracılı salgılanmasının düzenlenmesinin ve doğurganlığın kontrolünün önemli bir düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir. Nörokinin B için üreme rolünün ilgili keşfi, alana daha fazla ilgi gösterilmesini

sağlamıştır. Aynı fonksiyonel nöronal ağ, Kisspeptin ve Nörokinin B'yi salgılar (Skorupskaite ve ark, 2014).

1.4. Nörokinin

Taşikininler ortak bir C-terminalini paylaşan bir peptit ailesidir. Taşikininler memeli türlerinde nörokininler olarak isimlendirilir. Hem memeli hem de memeli olmayan türlerde Substance P izole edilen ilk taşikinindir (Longmore ve ark, 1997). Taşikinin ilk defa 1931 senesinde Von Euler ve Gaddum atların beyin ve bağırsaklarıyla ilgili yaptıkları çalışmada bulunmuştur. Yaklaşık 40 yıl sonra ise taşikininin saf hale getirilip toz şekle dönüşümü başarılmış ve “Substance P” diye adlandırılmıştır (Yurdakoş ve Mengi, 2009; Koca, 2019). Substance P, sinir sisteminde ilk tanımlanan nöroaktif peptiddir ve nöronlar arasında iletişimi sağlar. Substance P taşikininler olarak bilinen peptid familyasına bağlıdır. Substance P Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ olmak üzere 11 amino asitten oluşan bir undekapeptiddir (Yurdakoş ve Mengi, 2009).

Memeliler sınıfında olmayan türlerde birden fazla taşikinin keşfedilmiştir, memeli merkezi sinir sisteminde ise nörokinin olarak adlandırılmıştır (Yurdakoş ve Mengi, 2009). Nörokininler, Substance P, nörokinin A ve nörokinin B'yi içeren bir peptit ailesi oluşturur. Bu peptitler merkezi ve periferik sinir sisteminde büyük oranda her yere dağılmıştır ve kapsaisine duyarlı nöronlarda lokalizedir. Artık iyi bir şekilde kanıtlanmıştır ki, nörokininlerin eylemlerine esas olarak aktivasyon aracılık eder (Campos ve Calixto, 2000). Diğer sayısız nöropeptit arasında, P maddesi, nörokinin A dizilerini içeren öncüler ve nörokinin B büyük miktarda ifade edilir (Regoli ve ark, 1990). Nörokinin A, nörokinin B, nöropeptid K ve nöropeptid γ Maggi ve arkadaşları tarafından 1993'te keşfedilmiştir (Longmore ve ark, 1997).

Substance P ve nörokininler gibi taşikininlerin bir kısmı prolaktin salgılanmasının düzenlenmesine katılır (Czelejewska ve arkk, 2020). Nörokininler

üç gen tarafından kodlanır. Bu genler: Taşikinin Geni 1 (Tac1), Taşikini Geni 2 (Tac2) ve Taşikinin Geni3 (Tac3)

Tac1: preprotaşikin A (PPT-A) ve Substance P ile Nörokinin A'yı kodlar.

Tac2: preprotaşikin B (PPT-B) ve kemirgenlerde Nörokinin B'yi kodlar.

Tac3: preprotaşikin C (PPT-C) , Hemokinin-1'i ve insanlarda Nörokinin B'yi kodlar (Yurdakoş ve Mengi, 2009).

1983 ve 1984'te araştırma yapan iki farklı grup Nörokinin A ve Nörokinin B'yi keşfetmiştir ve hem merkezi hem de çevresel sinir sistemlerinde yaygın olarak dağıldığını göstermiştir (Koca, 2019).

NKA His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH₂ olmak üzere 10 amino asit dizisi içeren bir dekaeptiddir. N terminal ucundaki 5 aminoasidin 4'ü Substance P ile aynıdır (Yurdakoş ve Mengi, 2009). NKA, Kimura ve diğer çalışanlar tarafından izole edildi ve tanımlandı (Regoli ve ark, 1990). Nörokinin A, preprotaşikin-A geni ekspresyonunun bir ürünüdür ve ağırlıklı olarak taşikin reseptörü 2 aracılığıyla hareket eder. NKA'nın dişi sıçanlarda geç prolaktin salgılanmasını uyurabildiğini ve bu etkinin hormonal ortama bağlı olduğunu bildirmiştir. Sıçan dişi hipofizindeki NKA ve SP, östrus sırasında değişir (Czelejewska ve ark, 2020). Kasların kasılmasını uyaran en aktif nörokinin NKA'dır. SP ve NKA, özellikle periferik duysal veya otonomik nöronlarda ifade edilir. Sıçanda, NKA Substance P'den daha zayıf kan basıncını düşürmede ve tükürük salgısını uyarmada daha zayıftır (Regoli ve ark, 1990).

NKB Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH₂ olmak üzere 10 amino asit (dekaeptid) içeren bir dekaeptiddir. NKB ile NKA'nın 10 amino asidinin 6'sı ile aynıdır. N terminal ucundaki son 5 amino asitten 4'ü Substance P ile aynıdır (Yurdakoş ve Mengi, 2009).

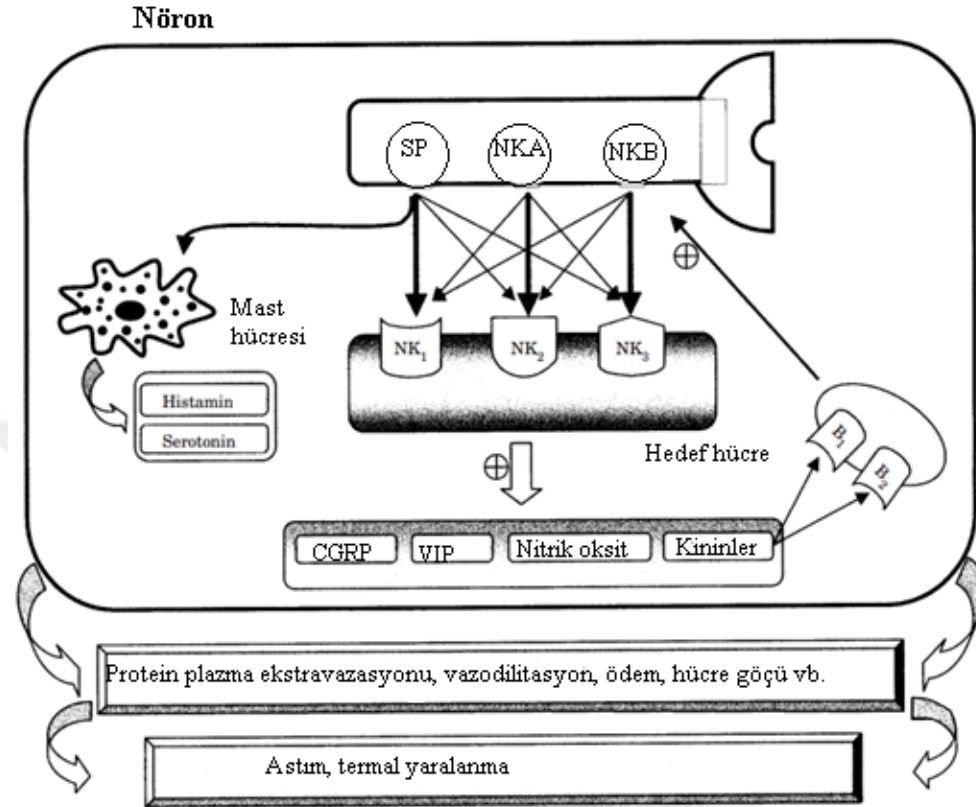
Hemokinin-1 ise Arg-Ser-Arg-Thr-Arg-Gln-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH₂ olmak üzere 11 amino asit içerir (Yurdakoş ve Mengi, 2009).

Taşikininin nöronların büyümesinde ve hayatta kalmasında rol aldığı düşünülmektedir. Bu zamana kadar 6 adet memeli taşikinini keşfedilmiştir ve

bunlar Substans P, nörokinin A, nörokinin B, nöropeptit K, nöropeptit gama ve hemokinin 1 olarak adlandırılmıştır. NK1R ve NK3R beyinde dağınık bir şekilde yaygın olarak bulunur (Koca, 2019). Birkaç araştırmacı nörokinin reseptörlerini karşılaştırarak üç peptidin aktivitelerini *in vivo* farmakolojik testlerle ve *in vitro* biyokimyasal analizlerle karakterize etmeye çalışmışlardır (Regoli ve ark, 1990). Nörokinin 1 (NK1) reseptörü, bilinen nörokinin reseptörlerinin P maddesine en yüksek afiniteye sahiptir ve bu nedenle bu peptit için mantıklı bir hedeftir (Nazlı ve Morris, 2000). NK2R ise sadece beyinde sadece belirli alanlarda bulunur. Substance P NK1R2'ye, NKA NK2R2'ye ve NKB ise NK3R'ye büyük bir çekimle bağlanır, yine de bütün taşıkininlerin üç reseptöre de bağlanabilme kabiliyeti bulunur. Substance P, NKA ve NKB'nin aminoasit dizisi çalışmalarda kullanılan tüm memelilerde aynı iken, HK1'in aminoasit dizisi fare, sıçan gibi türler arasında farklılık göstermektedir (Koca, 2019).

G proteinlerinin bağlanmasından sorumlu bölge, tüm nörokinin içinde yüksek oranda korunmuştur. NKA ve NKB sırasıyla NK2 ve NK3 reseptörlerine potansiyel olarak bağlanmayı tercih ederken, NK1 reseptörüne afinite gösterir (Campos ve Calixto, 2000).

Nörokininler, plazma protein ekstrasvazasyonu, vazodilatasyon, düz kas kasılması ve gevşemesi, tükürük salgısı ve hava yolu kasılması dahil olmak üzere farklı biyolojik süreçlerde yer alır. Enflamatuar süreçlerdeki rolleri ile ilgili olarak, nörokininlerin duyuşal aktarıma ve ayrıca çoğu immünolojik ve enflamatuar duruma, trofik ve mitojenik maddeler olarak eylemleri yoluyla katılımını destekleyen belirli miktarda kanıt vardır. Nörokininlerin etkileri, enflamatuar medyatörlerin ikincil üretimi yoluyla doğrudan veya dolaylı eylemlerden kaynaklanır; başlıca histamin, nitrik oksit ve kininler (Campos ve Calixto, 2000).



Şekil 1.7. Nörokinin aracılı inflamatuvar yanıtların altında yatan önerilen mekanizmalar.(Campos ve Calixto, 2000)

Ayrıca, nörokininler, adezyon molekülleri ve hücre dışı matrisin bileşenleri ile lökosit göçüne aracılık ederek ve inflamatuvar yanıtı kontrol ederek etkileşime girebilir. Nörokininlerin ve reseptörlerinin inflamatuvar olaylara katılımı, çok sayıda farmakolojik ve biyokimyasal çalışma ile gösterilmiş ve çoğu patolojik yanıtta önemini göstermektedir. Nörokinin düzeylerinde artışa neden olan ana değişikliklerden biri duyuşal sinir hasarıdır. Nöronal terminallerin yıkımı, inflamatuvar kronik hastalıkları takiben veya kimyasal ajanların veya yanıkların uygulanması gibi bazı zararlı uyarılara yanıt olarak ortaya çıkabilir (Campos ve Calixto, 2000).

Substance P, nörokinin A ve nörokinin B nöronal uyarılma, düz kas kasılması, endotel hücrelerinden NO salınımı, bağışıklık sisteminin aktivasyonu, doku büyümesi ve onarımı gibi çok çeşitli biyolojik etkilere sahiptir. Taşikininlerin biyolojik etkilerine ilişkin araştırmaların çoğu geçmişte, mevcut olan tek antagonistlerin kendileri peptit olması ve bu peptitlerin kullanışlılığı, özellikle *in vivo* kullanım için düşük afinite ve metabolik istikrarsızlık nedeniyle sınırlı olduğundan, bu tür deneyler zorluklarla doluydu. Bununla birlikte, bu durum, peptit olmayan, seçici NK1-, NK2- ve NK3-reseptör antagonistlerinin yakın zamanda piyasaya sürülmesiyle önemli ölçüde değişti. Ekzojen nörokinin reseptör agonistlerinin uygulanmasını ve bunu takiben yanıtın ölçülmesini içermektedir. Reseptör antagonistlerinin kullanılmasıyla taşikininlerin fizyolojik rolü daha güvenilir şekilde tahmin edildi (Longmore ve ark, 1997).

Taşikininler miyelinsiz birincil duyuşal afferent nöronlarda ve bazı merkezi nöronlarda, sempatik ve parasempatik nöronlarda ve nöronal olmayan hücre tiplerinde bulunabilir. İmmünohistokimyasal çalışmalar, bazı afferent liflerin yalnızca P maddesini içerdiğini, diğerlerinin ise hem P maddesini hem de nörokinin A'yı içerdiğini ve her ikisinin de kalsitonin geni ile ilişkili peptit gibi diğer peptitlerle birlikte var olabileceğini düşündürmektedir. Taşikininlerin periferik salınımı plazma protein ekstrasvazasyonuna, sekresyona, bağışıklık sisteminin aktivasyonuna ve mast hücre degranülasyonuna neden olur. Periferik olarak salınan taşikininlerin etkileri genellikle proinflamatuardır ve bu nedenle nörokinin-reseptör antagonistlerinin periferik olarak aracılık edilen anti-inflamatuvar etkilere sahip olması beklenebilir (Longmore ve ark, 1997).



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kök hücre tanım olarak ilk defa 1909 yılında Rus kökenli bilim insanı Alexander A. Maximow tarafından kullanılmıştır (Akkoç ve Toplu, 2016).

1939 yılında ise ilk kök hücre nakli gerçekleşmiştir. Hastaya aynı kan grubu taşıyan kardeşinden kemik iliği nakli yapılmıştır. Nakil başarılı olmamış ve hasta transplantasyonun beşinci gününde ölmüştür. Bu çalışmanın ardından II. Dünya savaşına kadar başka bir nakil çalışması yapılmamıştır. İlk başarılı çalışmayı ise Jacopson ve arkadaşları 1949 yılında yayınlamıştır. Fare ile yaptıkları çalışmada farenin dalağının radyasyondan korunduğunu farketmişlerdir. Dalaktan elde ettikleri hücreleri kemik iliği hücrelerini enjekte etmişler ve kemik iliği hücrelerinin de radyasyondan korunmasını başarmışlardır (Tanyeli ve ark, 2014).

1960 yıllarında “koloni yapıcı hücreler” olarak adlandırılken ve sonraki yıllarda ise kendini yenileme ve farklılaşmış nesil oluşturma özelliklerine sahip “kök hücre” ismi kullanılmaya başlanmıştır. (Akkoç ve Toplu, 2016)

1970’lerde ise ilk olarak Friedenstein ve ark. tarafından fare kemik iliğinden bir hücre popülasyonu izole edildi ve bunların koloniler oluşturma yeteneğine sahip olduğunu gösterildi. Yıllar sonra Caplan ilgili terminolojiyi tanımladı ve yaklaşık 10 yıl sonra mezenkimal kök hücreler nihayet insan yetişkin kemik iliğinde tanımlanmıştır (Karaşahin, 2012).

1981 yılına geldiğimizde birbirinden bağımsız iki çalışma grubu olan Evans ve Kaufman embriyonik kök hücrelerle yaptıkları çalışmada 3-5 günlük fare blastosistleri iç hücre kitlesinden köken alan sürekli olarak farklılaşmadan çoğalan embriyonik kök hücreleri elde etmeyi başardılar (Karaşahin, 2012).

Ülkemizde ise bugünün kök hücre tedavisi üzerine dünyada belki de ilk çalışmaları yapan, insan ömrünü uzatmanın yolunun plasentalarda, kordon hücrelerinde olduğunu söyleyen araştırmacı talidomid faciasını da önleyen Ord. Prof. Dr. Vet. Hek. Tuğ. Gen. Süreyya Tahsin Aygün’dür. 1950-1960 yıllarında

Almanca tıp dergilerinde hayvanlarda fetal greftler ve kordon kanı greftleri ile çeşitli hastalıkların tedavisinde araştırmaları yayınlamıştır (Çapkın ve ark, 2010).

1983 ve 1984'te araştırma yapan iki farklı grup Nörokinin A ve Nörokinin B'yi keşfetmiştir ve hem merkezi hem de çevresel sinir sistemlerinde yaygın olarak dağıldığını göstermiştir (Koca, 2019).

1996'da Lee ve arkadaşları tarafından KISS1 geni keşfedilmiştir (Skorupskaite ve ark, 2014).

1993'te Maggi ve arkadaşları tarafından Nörokinin A, nörokinin B, nöropeptid K ve nöropeptid γ keşfedilmiştir (Longmore ve ark, 1997).

1999 yılında birden fazla merkezi sinir sistemi bölgeleriyle birlikte çevresel olarak da yerleşen GPR54 reseptörünü kodlayan gen kisspeptin keşfedilmiştir (Kafa ve Eyigör, 2011).

3. MATERYAL VE METOD**3.1. Materyal****3.1.1. Kullanılan cihazlar**

Laminer akımlı kabin, CO₂ inkübatörü, akım sitometrisi, ışık mikroskopu, invert mikroskop, otoklav, santrifüj, vorteks, sıcak su banyosu, buzdolabı-derin dondurucu (+4°C, -20°C, -80°C) Ç.Ü. Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi hücre kültür laboratuvarında kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Malzemeler

Çalışmamızda 3 adet 5-6 aylık (dişi-erkek) sıçan, %70'lik alkol, kavanoz, laminar akış kabini, pens, bistürü, parafin kabı, iğneler, PBS (kalsiyum ve magnezyum içermeyen), (Life Technologies, Gibco®, katalog numarası: 10010), santrifüj tüpü, α -MEM (Hyclone SH30265.01), Trizol (Sigma T9424TRI reagent), %15 FBS (Atlanta Biologicals, katalog numarası: S11550), %0,1 P/S (Gibco-15.070), 15 adet 25 cm² yüzeyli kültür kabı (SPL-Lifescience 063), Tripsin (Life Technologies, Gibco®, katalog numarası: 25200), CD90 (557266 BD), CD45 (554878 BD), CD29 (555005 BD), DNAaz I kiti, Kiss1R (Rn0057690_m1), Kiss1 (Rn00710914_m1), Tac2 (Rn00569758_m1), Tacr2 (Rn00436896_m1), ACTB (Rn00667869_m1)

3.2. Metod**3.2.1. Sıçan Adipoz Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu**

3 adet sıçan tek tek eterli bir kavonoz içinde bayıltıldı sonrasında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Dış yüzey sterilizasyonunun sağlanması için sıçan, %70'lik alkol içerisine batırıldı. Bu aşamadan sonra çalışmalara laminar akışlı kabin içerisinde devam edildi. Sıçan, bir pens yardımıyla kuyruğundan tutularak gazlı bezle silinip fazla alkolden arındırıldı.

Sırt üstü parafin kabı içerisine yatırıldı. Sıçan elleri ve ayaklarından iğne ile tutturularak sabitlendi. Karın bölgesinden bir pens ile tutularak deri makas ile kesildi. Enine kesikler atılarak deri vücuttan uzaklaştırıldı. Peritoneum makas ile açıldı. Böbrek arkasından yağ doku makas ile kesilerek izole edildi. Yağ dokusu izole edildikten sonra 1XPBS içerisinde yıkandı ve pens ile tutarak dokunun tamamı başka petriye aktarıldı. Petride yağ doku makas ile kesilerek küçük parçalara ayrıldı. Yağ dokunun iyice parçalanması için yaklaşık %0,075 Tip I kollajenaz / 10 ml Ca^{+2} içermeyen PBS solüsyonu içinde 37°C'de 60-90 dakika bir orbital çalkalayıcı (shaker) cihaza sabitlenerek inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonunda tüpler dokunun iyice parçalanması için çalkalandı ve üzerine eşit miktarda PBS eklendi ve homojenize edildikten sonra 1800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant (yağ hücreleri ve yıkama sıvısı) atıldı ve üzerine 10 ml hücre kültür ortamı eklenerek 1800 rpm'de 10 dakika tekrar santrifüj yapıldı. Bu işlem iki kez daha tekrarlandı. Santrifügasyon sonrası süpernatant döküldü ve elde edilen hücreler 70 µm'lik steril süzgeçten geçirildi.

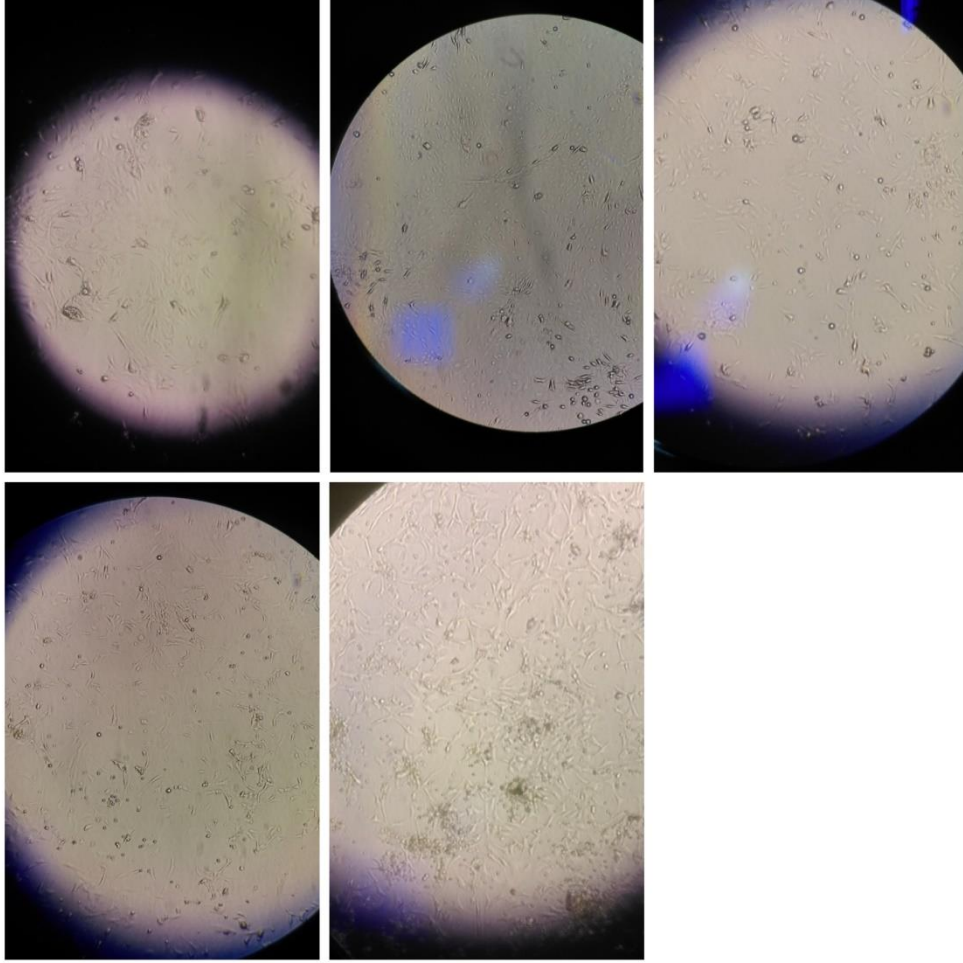
Süzgeçten geçen hücreler ve doku parçaları; α-MEM, %15 FBS, %0.1 P/S içeren hücre kültür ortamında, 25 cm² yüzeyli kültür kabına aktarıldı. 72 saat sonra kullanılmış ortam değiştirildi. Hücrelerin üremesine göre kültür kabının %75'i kaplandıktan sonra pasaj yapıldı.



Şekil 3.1. Sıçandan adipoz dokunun elde edilmesi

3.2.2. Hücre Kültürü

Hücreler %10 fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Grand Island NY, USA) ve %1 penisilin–streptomisin içeren MEM (Fenol red içermeyen) (Gibco) besiyerinde 37°C ve %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Kisspeptin ve nörokinin inhibitörleri ile ayrı ayrı veya kombinasyonları ile muamele edilecek bu hücreler petri kabında %70'lik yayılma gösterdikten sonra 24 saat boyunca serumdan mahrum besiyerinde tutularak akabinde muameleleri gerçekleştirildi.



Şekil 3.2. Hücre kültürü pasaj aşamaları

3.2.3. Akım Sitometrisi İle MKH Analizi

Öncelikle hücre ortamı atıldı ve PBS ile hücreler yıkandı. Hücre yoğunluğu %85'e ulaşınca tripsin ile kaldırıldı. Hücre ortamı eklenerek tripsin inaktive edildi. Hücreler süspansiyon şeklinde santrifüj tüpünde toplandı ve 5 dakika 300-400 g'de santrifüj edildi. Santrifüjlemeden sonra hücre pelleti PBS ile durulandı ve yeniden pellet haline getirildi. Süpernatant atıldı ve pellet PBS solüsyonunda tekrar süspanse edildi. Hücre sayımı yapıldı ve ardından hücreler soğuk PBS içinde 10^6 -

10^7 hücre olacak şekilde seyreltilti. Seyreltmeden sonra 100 µl hacimde 10^5 - 10^7 hücre olacak şekilde FACS (Floresan Aktive Hücre Ayırma) tüpüne alındı. Antikor eklendi ve karanlıkta 30-60 dakika 4°C’de inkübe edildi. Hücreler santrifüjlendi ve soğuk PBS ile yıkandı. Hücreleri 100-200 µl FACS Buffer ile yeniden süspanse haline getirildi. Karanlıkta 4°C’de saklandı ve 24 saat içinde analizi yapıldı. Örnekler 5. ve 6. Pasajda akım sitometrisi cihazı ile MKH hücre yüzey belirteçleri açısından analiz edildi. Gruplardan alınan örnekler ile pozitif marker olarak CD90, CD29 ve negatif marker olarak CD45 seçildi.

3.2.4. RNA İzolasyonu

- 1) Örnekler vortekslendi. Her 5 dakikada bir buz üzerinde inkübe edilecek şekilde 15 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
- 2) 14000 rpm’de 10’ +4°C’de santrifüj edildi.
- 3) Süpernatant başka bir ependorfa alındı ve üzerine 200 µl kloroform eklendi. 10-20 saniye vortekslendi (pembe renk alana kadar). +4°C’de 10’ buz üzerinde inkübe edildi.
- 4) 15’ 14000 rpm’de santrifüjlendi.
- 5) Santrifüj sonunda 3 faz oluştu. En üst fazda RNA, ortada protein, en alt fazda ise DNA toplandı. RNA pipet yardımıyla başka tüpe aktarıldı.
- 6) Tüpe RNA miktarı kadar izopropanol eklendi ve vortekslendi. +4°C’de 10’ buz üzerinde inkübe edildi. 10’ 14000 rpm’de santrifüjlendi.
- 7) Dipteki pelleti gördükten sonra süpernatant atıldı. 1 ml %75’lik etil alkol eklendi ve vortekslendi.
- 8) 5’ 14000 rpm’de santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Kalan süpernatantı uzaklaştırmak için short-spin yapıldı ve süpernatant atıldı.
- 9) 6’ buz üzerinde kapakları açık bir şekilde inkübe edildi. (kontaminasyon riskini azaltmak için üzeri kurutma kağıdı ile kapatıldı.)

- 10) Tüpe DEPC'li sudan 20 µl eklendi. Örnek buz üzerinde 15' ağzı açık bir şekilde inkübe edildi. (kontaminasyon riskini azaltmak için üzeri kurutma kağıdı ile kapatıldı.)
- 11) Örnek pipetaj yapıp -20 °C'de saklandı.

3.2.5. RNA'yı cDNA'ya Dönüştürme

10XRT Buffer (2 µl), dNTP (0.8 µl), Randon Primer (2 µl), Enzim (1 µl), Deiyonize su (4,2 µl), RNA (10 µl) olmak üzere RNA hariç diğer malzemeler eklenip bir mix hazırlanıp vortexlendi en son tüplere RNA eklendi ve sort spin yapıldı. Daha sonra örnekler termal cyler cihazına yüklendi.

3.2.6. RT-PCR

Total RNA izolasyonu TRIzol reaktifi kullanılarak izole edilmiştir. İki µl cDNA kullanılarak ve Taqman master mix kullanılarak Real-time PCR ABI 7500 PCR sisteminde (AppliedBiosystems) gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu Taqman master mix kullanılarak Real-time PCR ABI 7500 PCR sisteminde (AppliedBiosystems) gerçekleştirilmiştir. 25 µl reaksiyon hacminde üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. Reaksiyon 50°C'de 2' ve 95 °C'de 10', takiben 40 döngü olarak gerçekleşti. 95 °C'de 15 saniye ve 60 °C 1' olarak inkübe edildi. Çalışmalardaki eşik siklüs değeri (CT); reaksiyon ortamındaki floresan miktarının sabitlenmiş eşik değerini geçtiği siklusun kesirli ifadesi olarak kullanıldı. Sonrasında CT değerleri mutlak kopya sayılarına dönüştürüldü. B-Actin kontrolü kullanılarak bütün cDNA örnekleri normalize edildi. "Kalıp içermeyen" ve "enzim içermeyen" kontroller kullanılarak genomik DNA varlığı ve reaksiyon özgüllüğü kontrol edildi. Tekrarlanabilirliği göstermek içinse üç bağımsız deney gerçekleştirildi.

$$\Delta Ct = Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ referans gen}$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ muamele edilen} - Ct \text{ kontrol}$$

$$\text{Ekspresyon oranı} = 2^{\Delta \Delta Ct}$$

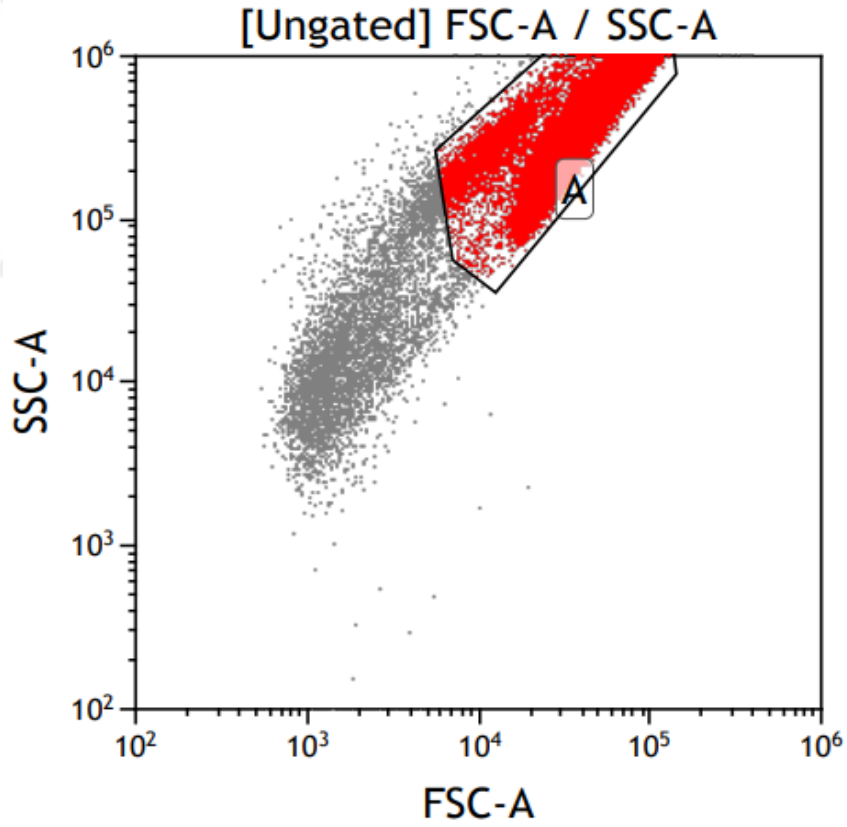
Real time sonuçları bu formül ile hesaplanarak grafikler elde edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

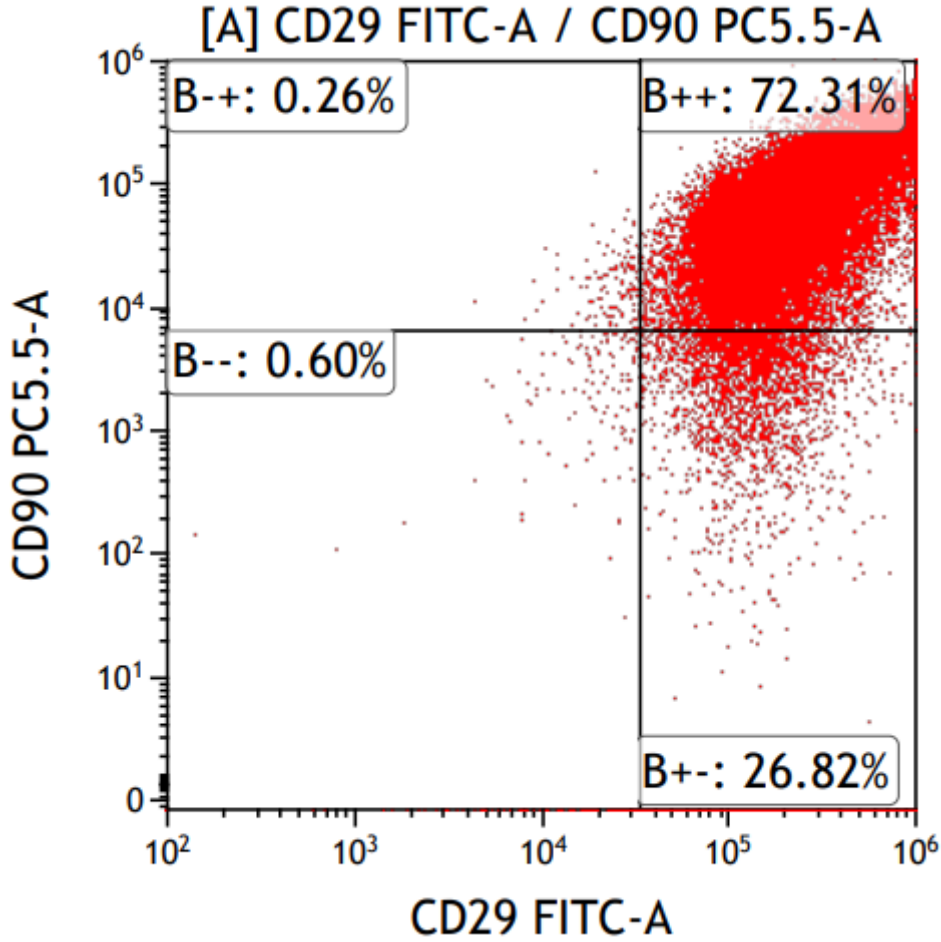
4.1.1 Akım Sitometri Sonuçları

Kültürü yapılan adipoz dokuya ait hücreler akım sitometri analizleri ile kök hücre yönünden değerlendirilmesi yapılarak mezenkimal kök hücre olduğu tespit edilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin morfolojik analizleri SSC/FSC (side scatter/forward scatter) analizleri ile belirlenerek bulunan özelliklerin mezenkimal kök hücreye ait olduğu bulunmuştur.

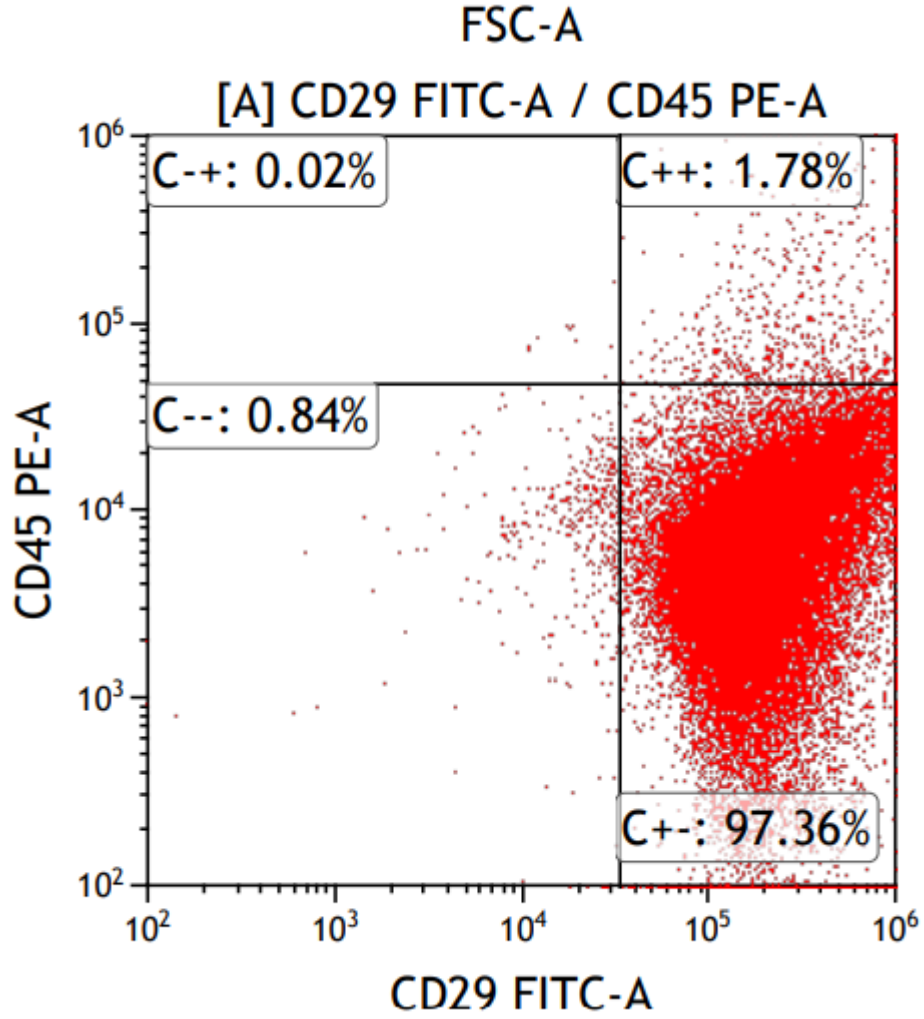


Şekil 4.1. Granülötesi side scatter (SSC) ve büyüklüğü forward scatter (FSC) olarak P_5 de hücrenin genel popülasyonu akım sitometrisinde değerlendirildi.

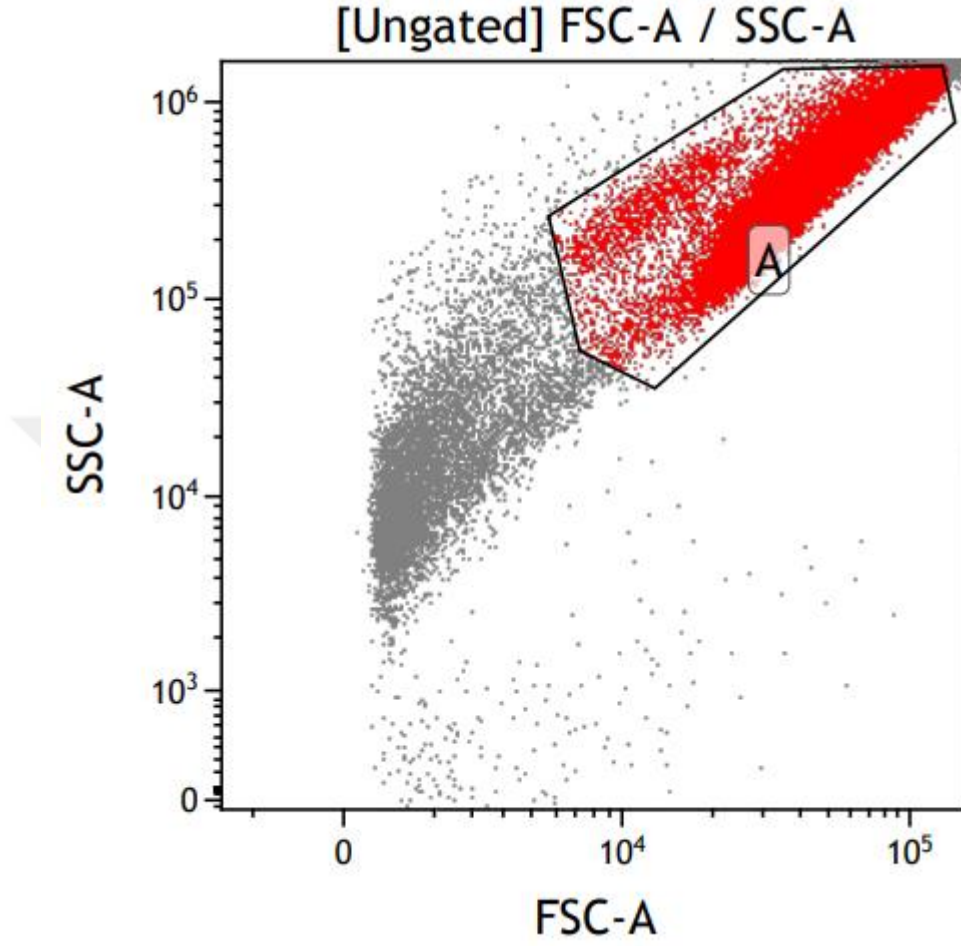
Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreleri belirlenmesinde pozitif yüzey belirteçleri olarak CD90, CD29 kullanılmıştır. Hücrelerin 5.pasajından elde ettiğimiz veriler doğrultusunda kullandığımız pozitif belirteçlerin ekspresyon düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.2. Pasaj 5'te Akım sitometrisinde kullandığımız pozitif yüzey belirteçlerinin (CD90, CD29) mezenkimal kök hücrede olduğu saptanmıştır.

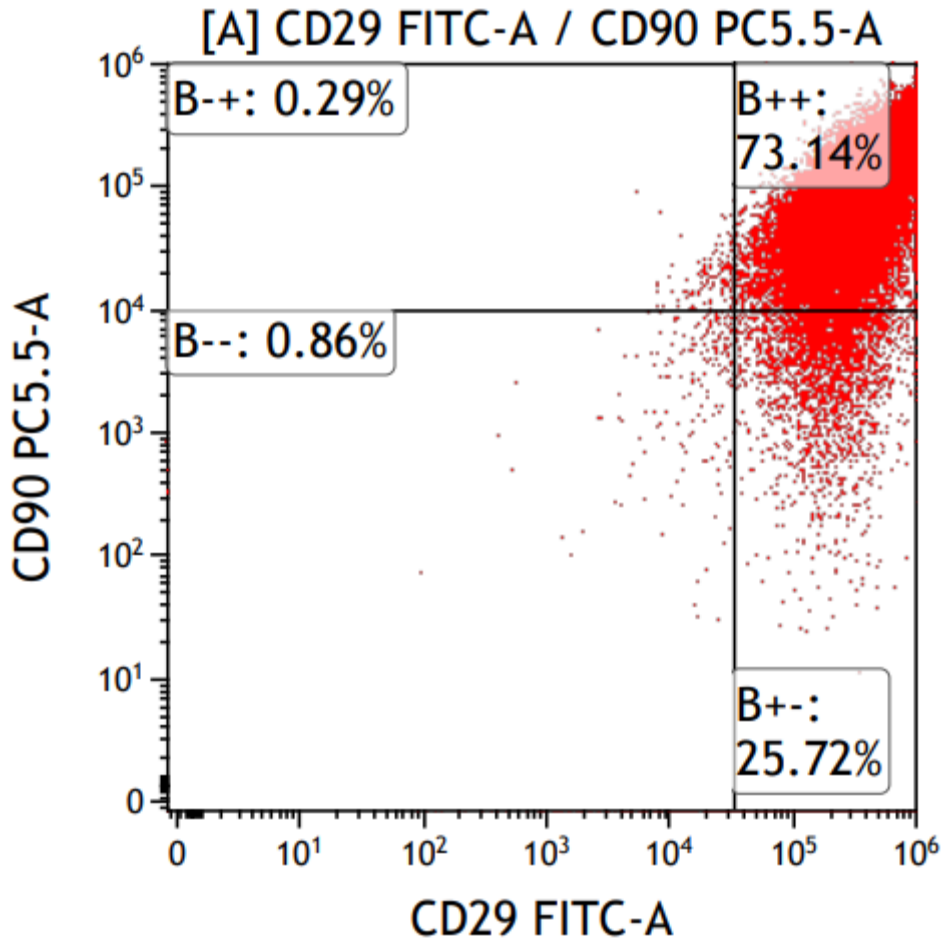


Şekil 4.3. Pasaj 5'te akım sitometrisinde kullanılan CD45 ve CD29 yüzey markerlerinin hücre popülasyonu yönünden yoğun olduğu tespit edilmiştir.

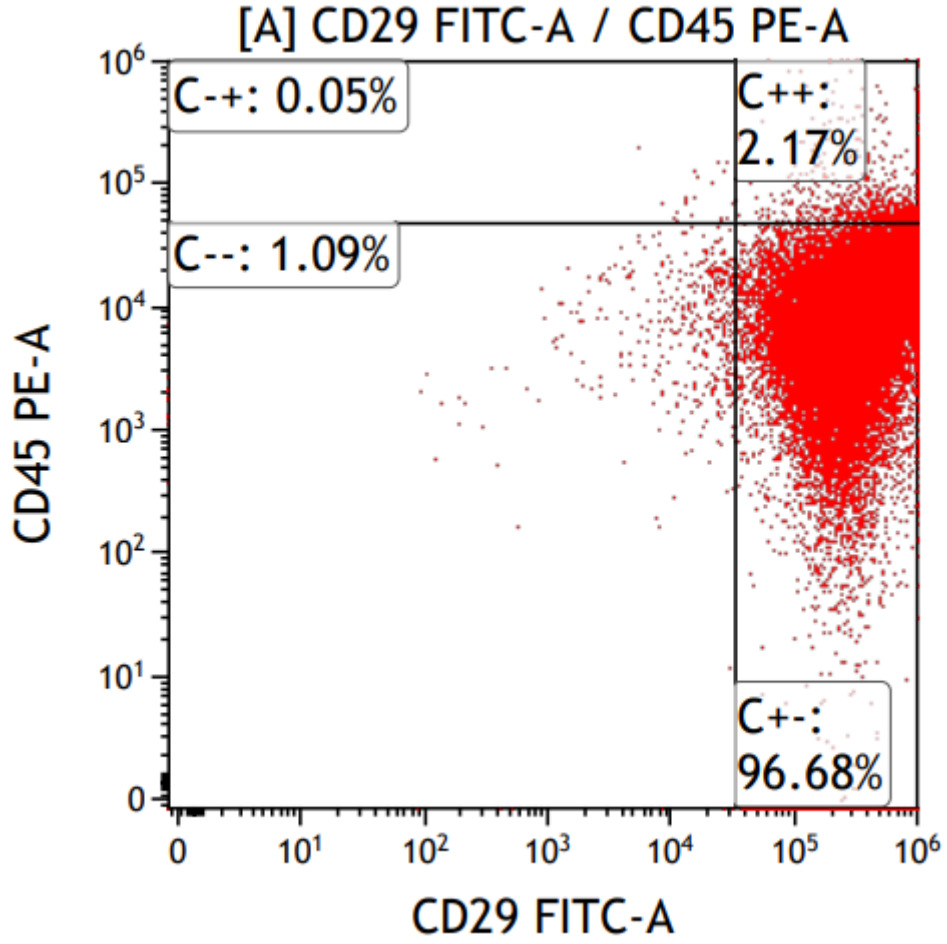


Şekil 4.4 Pasaj 6'da granülite side scatter ve büyüklüğü forward scatter olarak P₆'da hücrenin genel popülasyonu akım sitometrisinde değerlendirildi.

Adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücreleri belirlenmesinde pozitif yüzey belirteçleri olarak CD90, CD29 kullanılmıştır. Hücrelerin 6.pasajından elde ettiğimiz veriler doğrultusunda kullandığımız pozitif belirteçlerin ekspresyon düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır.

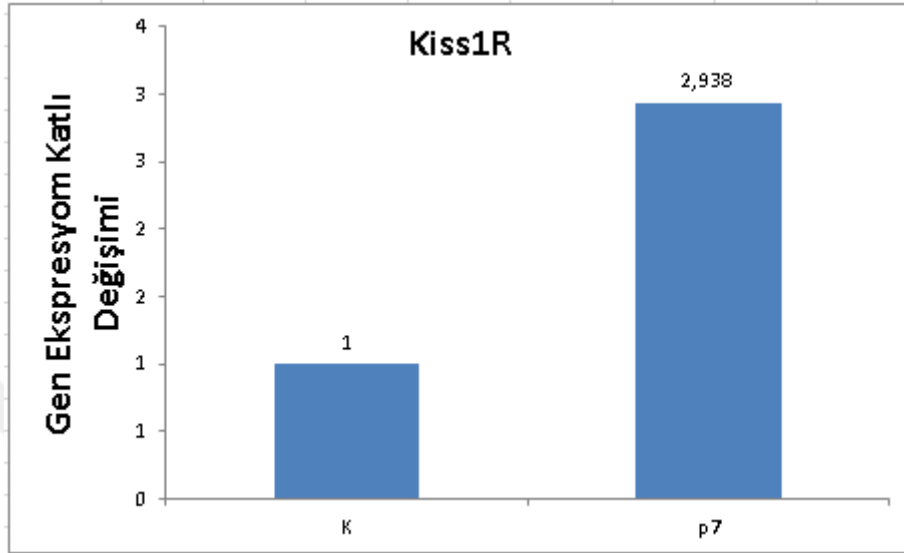


Şekil 4.5 Pasaj 6'da akım sitometrisinde kullandığımız pozitif yüzey belirteçlerinin (CD90, CD29) mezenkimal kök hücrede olduğu saptanmıştır.

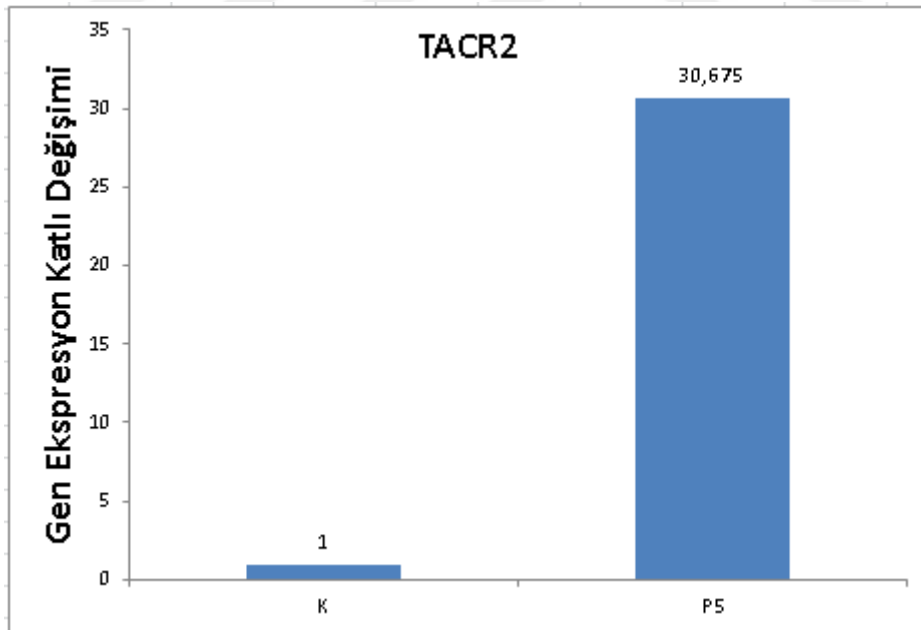


Şekil 4.6 Pasaj 6'da akım sitometrisinde kullanılan CD45 ve CD29 yüzey markerlerinin hücre popülasyonu yönünden yoğun olduğu tespit edilmiştir.

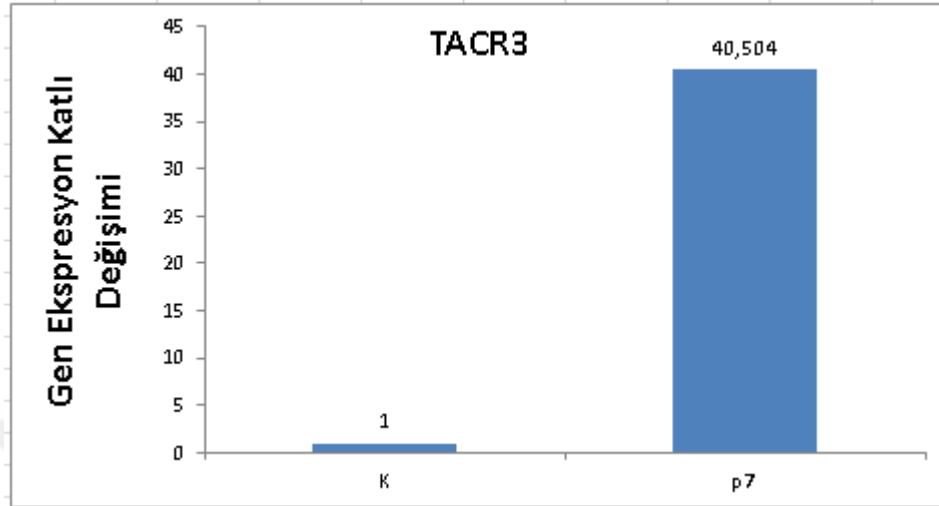
4.1.2. RT-PCR Sonuçları



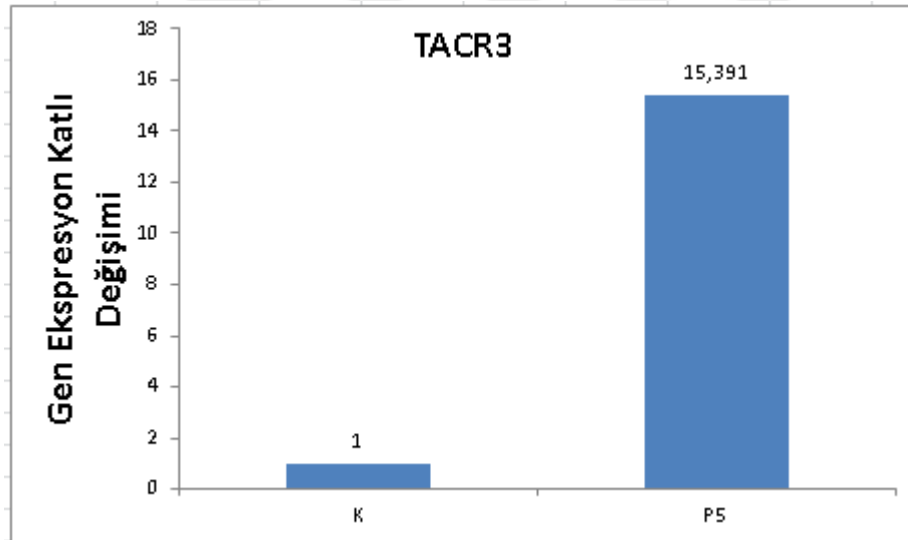
Şekil 4.7. Kisspeptin reseptör geni için P₄ grubu referans alındığında P₇ örneğinin katlı değişimi



Şekil 4.8 Taşikinin reseptör geninde P₄ grubu referans alındığında P₅ örneğinin katlı değişimi



Şekil 4.9. Taşikinin reseptör geninde P₅ grubu referans alındığında P₇ örneklerinin katlı değişimi



Şekil 4.10. Taşikinin reseptör geninde P₄ grubu referans alındığında P₅ örneklerinin katlı değişimi

4.2. Tartışma

Ahmad Ghorbani ve arkadaşları yaptıkları çalışmada enzimatik yöntem kullanmadan adipoz dokudan mezenkimal kök hücre izole etmişlerdir. MKH'lerin

pluripotente ve adiposite ve osteoblasta farklılaşma potansiyeli sergilediğini göstermişlerdir. Enzimatik yöntemin maliyetli, zaman alıcı olması ve heterojen bir hücre popülasyonu ile sonuçlanması nedeniyle bu yöntem tercih edilmemiştir. Ayrıca, hücre dışı matriksinin sindirimi hücre hasarına neden olacağını, hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını tehlikeye atacağını düşünmüşlerdir. Ayrıca, numunelerin fazla işlenmesi nedeniyle de kontaminasyona meyilli olabileceğini söylemişlerdir. Biz enzimatik yöntem kullanarak adipoz dokudan MKH elde ettik ve hücre hasarı ya da kontaminasyon yaşanmadı. Ahmad Ghorbani ve arkadaşları çalışmada sıçan deri altı yağ dokusu elde etmişlerdir, küçük parçalara bölmüşlerdir, PBS ile yıkamışlardır ve MKH izolasyonu için kullanmışlardır. Kozmetik abdominal liposuction uygulanan hastalardan atık madde olarak insan örneklerini almışlardır. Sonrasında yağ dokusunu çıkarmışlardır ve numuneler PBS ile yıkanmıştır. Biz sadece sıçan böbrek arkasında elde ettiğimiz adipoz dokuyu kullandık.

Enzimatik olmayan yöntemle MKH izolasyonunda her numuneden dört küçük parça (~5 mg) FBS ile iyice yıkanmıştır. Yıkamadan sonra doku parçaları iki ayrı doku kültürü şişesinin köşesine eksplante edilmiştir. Her numunenin yüzeyi daha sonra önceden ısıtılmış FBS ile kaplanmıştır. Eksplantlar, standart koşul altında 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. (37 °C ve %5 CO₂) Kültür aşamasında ise FBS, antibiyotik ve DMEM ile kültür ortamı değiştirilmiştir. Hücreler, doku parçalarının etrafında fibroblast benzeri hücreler görünene kadar günlük olarak mikroskopik inceleme ile izlenmiştir. (genellikle ekimden 3-5 gün sonra)

Biz hücre kültüründe DMEM yerine α -MEM tercih ettik ve enzim olarak tripsin kullandık. Ayrıca hücrelerimizi 10. pasaja kadar çoğalttık. MKH'lerin akım sitometrisi ile karakterizasyonunda CD44+, CD105+, CD34-, CD45- yüzey belirteçlerine bakılırken biz çalışmada CD90+, CD29+ ve CD45- yüzey belirteçlerine baktık (Ghorbani ve ark, 2014).

Samih Mohamed-Ahmed ve arkadaşları, donör varyasyonunun mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) üzerindeki proliferasyon, farklılaşma

potansiyeli ve olası etkilerini araştırmak için donör uyumlu ASC'leri ve BMKH'leri karakterize etmeyi çalışmışlardır. Çünkü adipoz türevli kök hücreler, hücre bazlı tedavi için kemik iliği mezenkimal kök hücrelerine bir alternatif olarak tanıtılmıştır. Ancak, ASC'leri ve BMKH'leri karşılaştıran farklı çalışmalar çelişkili sonuçlar göstermiştir. Aslında, farklı bireylerden ASC'lerin ve BMKH'lerin toplanması sonuçları etkileyerek karşılaştırmayı zorlaştırabilir. Bu nedenle, aynı donörlerden alınan örnekler kullanmışlardır. 8-14 yaşları arasındaki dokuz donörden insan kemik iliği ve yağ dokusu örnekleri almışlardır. ASC'ler ve BMKH'ler, akış sitometrisi kullanılarak yüzey belirteçlerinin ekspresyonuna dayalı olarak izole edip karakterize etmişlerdir. Hücre çoğalmasını 21. güne kadar devam ettirmişlerdir. Biz çalışmamızda sadece şıçan adipoz dokusu kullandık ve hücrelerimizi 30. güne kadar çoğalttık.

Aspirasyon şırıngasına, kemik iliği örneğinin pıhtılaşmasını önlemek için 3000–5000 ünite heparin yüklenmiştir. Aspirat bir hücre süzgeci ile süzölmüştür, kültür ortamı DMEM, %10 oranında cenin sığır serumu ve %1 antibiyotik (penisilin/streptomisin) ile seyreltilmiştir. Oda sıcaklığında 1800 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti kültür ortamında süspanse edilmiştir ve 75 cm²'lik bir flaska ekim yapılmıştır. %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde 37°C'de inkübe edilmiştir. 24 saat sonra hücreler, yapışmayan hücreleri çıkarmak için PBS ile yıkanmıştır. Kültür ortamı daha sonra haftada iki kez değiştirilmiştir. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında Trypsin/EDTA solüsyonu kullanılarak kaldırılmıştır. BMKH'lerin hücre sayısı ve canlılığı, %0.4 Tripan mavisi ile değerlendirilmiştir. İnsan ASC'lerinin izolasyonu ve genişlemesi ASC'ler daha önce tarif edildiği gibi deri altı yağ dokusundan izole edilmiştir. Kısaca yağ dokusu, %5 antibiyotik içeren PBS ile kapsamlı bir şekilde yıkanmıştır. Yağ dokusu parçalanıp 37 °C'de 60 dakika boyunca %2 antibiyotik içeren PBS içinde %0.1 kolajenaz tip I ile muamele edilmiştir. Kollajenaz daha sonra eşit miktarda kültür ortamı ile nötralize edilip 2000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme tekrarlanıp, öncesinde pelleti bozmak için

çalkalamıştır, ardından süpernatant sıvı aspire edilmiştir. Kalan pellet kültür ortamında süspanse edilmiştir, 75 cm²'lik flask kaplandı ve %5 CO₂ içinde 37°C'de inkübe edilmiştir. Bizim çalışmamızda da adipoz dokuyu izole etmek için benzer bir protokol kullanıldı. Antibiyotik oranı %1'di ve kolajenaz tip I %0.075 oranında kullanıldı.

ASC'ler ve BMKH'lerin akış sitometrisi ile karakterizasyonu, spesifik yüzey antijenlerine dayalı olarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler toplanıp floresan antikorlar, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD49d, HLA-DR ve Stro-1 çözümleri ile inkübe edilmiştir. Her pellete floresan monoklonal antikorlar eklenip karanlıkta 30 dakika 4°C'de inkübe edilmiştir. Hücreler daha sonra PBS içinde süspanse edilip, 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenip ve iki kez PBS ile yıkanmıştır. Ardından PBS içinde yeniden süspanse edilmiştir. İşaretli örnekler analiz edilmiş ve karşılık gelen boyanmamış örneklerle karşılaştırılmıştır. Bizim çalışmada antikor eklendikten sonra 15 dakika karanlıkta inkübe edildi ve PBS ile süspanse hale getirirken PBS 500 µl kullanıldı. Yüzey belirteçlerinden CD90+, CD29+ ve CD45- incelendi.

Tüm donörlerden izole edilen ASC'ler ve BMKH'ler, MKH belirteçlerinin ekspresyonu ve hematopoietik belirteçlerin negatif ekspresyonu ile MKH'lerin morfolojik ve immünofenotipik özelliklerini göstermiştir. BMKH'lerin aksine, ASC'ler yüksek CD49d ifadesi ve düşük Stro-1 ifadesi göstermiştir. Genel olarak, ASC'ler, BMKH'lerden daha fazla lipid vezikül oluşumu ve adipogenez ile ilgili genlerin ekspresyonu ile önemli ölçüde daha yüksek proliferasyon ve adipojenik kapasite göstermiştir. Buna karşılık, BMKH'ler, ASC'lere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek osteojenik ve kondrojenik kapasite göstermiştir. ASC'lerin ve BMKH'lerin çoğalma ve farklılaşma kapasitesi, bağışçılar arasında önemli ölçüde farklılık göstermiştir. ASC'ler ve BMKH'ler dokuya özgü farklılaşma yetenekleri gösterdi, ancak donörler arasında önemli farklılıklar vardı. Kök hücre temelli tedavi planlanırken ASC'lerin ve BMKH'lerin özelliklerindeki benzerlikler ve farklılıklar dikkate alınmalıdır. Sonuç olarak biz de ASC'lerin pasajlarda MKH

morfolojisinde olduğunu gözlemledik ve akım sitometrisi analizi ile kanıtladık (Mohamed-Ahmed ve ark, 2018).

M. J. Crop ve arkadaşları bu çalışmasında adipoz dokudan türetilen mezenkimal kök hücreler, proinflatuar sitokinler ile alloaktive edilmiş periferik kan mononükleer hücrelerinin genom ifadesi ve işlevi incelemişlerdir. Sonuç olarak, ASC, farklılaşma kapasiteleri korunurken, enflatuar koşullar altında gelişmiş immünosupresif kapasite göstermiştir. ASC, dört canlı sağlıklı böbrek donörünün perirenal yağ dokusundan izole etmişlerdir. Bu donörler (üç erkek, bir kadın) rutin taramadan sonra böbreklerini bağışlamak için onaylanmıştır. Kısaca, perirenal yağ parçalanıp 0,5 mg/ml kolajenaz tip IV ile 37°C'de 30 dakika muamele edilmiştir. Hücreler daha sonra yıkanıp, flasklara aktarılmıştır. 3 gün sonra, yapışmayan hücreler çıkarılmıştır ve yapışık hücreler kültürde devam edilmiştir. Kùltürler, haftada iki kez ASC kùltür ortamı ile yenilenmiştir. %90 birleşmede, yapışkan hücreler, 37°C'de %0.05 tripsin-etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içinde inkübasyon yoluyla kùltür şişelerinden çıkarılıp hücreler deneyler için kullanılmıştır. 2. ve 5. pasaj arasındaki ASC hücreleri deneyler için kullanılmıştır. Biz ise çalışmamızda 3 adet sıçanın böbrek arkası adipoz dokusundan MKH izole ettik. İzolasyonda Tip I kollajenaz kullandık. Hücre kùltürü de benzer protokolle yürütüldü. Hücreler kullanıma kadar -80°C'de saklandı.

ASC'nin akış sitometrisi ile karakterizasyonunda, yapışkan hücreler, 37°C'de %0.05 tripsin-EDTA içinde inkübasyon yoluyla kùltür şişelerinden çıkarılmıştır ve daha sonra iki kez floresanla aktive edilmiştir. İşaretlemede PE, FITC, APC kullanılmış FACS FLOW ile iki yıkamadan sonra akış sitometrisi analizi yapılmıştır. Hücrelerimizi analiz ederken yıkama işlemini FBS ile yaptık. İşaretlemede PE, FITC ve PerCP kullanıldı. Yüzey antijenlerinden CD29, CD45, CD90 incelendi.

RNA izolasyonu ve gen ekspresyon analizinde dört sağlıklı donörün 4. Pasajdaki ASC hücreleri (10000 hücre/cm²'de) toplanmıştır. Hücreler, kontrol koşulları altında ve proinflatuar sitokin varlığında 7 gün boyunca kùltürlenmiştir.

ASC daha sonra tripsinizasyon yoluyla toplanıp RNA izole edilmiştir. Kısaca, 7. günde tripsinize edilen ASC hücrelerinden toplam RNA izole edilmiştir ve cDNA sentezlenmiştir (Crop ve ark, 2010). Kendi çalışmamızda 10. Pasaja kadar hücreleri sakladığımız için 10 farklı pasajında RNA'ları izole edildi. Gen ekspresyonunda ise 4. 5. Ve 7. Pasajlara bakıldı. Bu nedenle 4. 5. 7. Pasajların RNA'ları cDNA' ya çevrildi ve kisspeptin ve nörokinin genlerinin ekspresyonları PCR ile analiz edildi.

Renata I. Dmitrieva ve arkadaşları çalışmasında 43 yetişkin donörden alınan BM-MKH ve ASC kültürleri ardışık pasajlarda immünofenotip için değerlendirmişlerdir. Erken pasajlarda (P2-P3 veya 14-15 gün), BM ve AD türetilen MKH kültürlerinin çoğalma hızı gibi önemli özelliklerde karşılaştırılabilir olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca BM-MKH'nin P3-4'ten sonra yaşlanmaya girdiğini, çoğu ASC'nin ise P6-8'e kadar yaşlanma özellikleri göstermediği bulgusuna ulaşmışlardır. Kemik iliği ve deri altı yağ dokusu, terapötik uygulamalar için olası MKH kaynakları olarak kabul edilir. Bununla birlikte, aynı hastanın farklı dokularından elde edilen MKH'nin fonksiyonel özellikleri ve terapötik etkinliği hala yeterince araştırılmamıştır. Bu veriler, her belirli klinik uygulama için MKH çoğaltma ve değerlendirme için özel protokoller geliştirilirken ve optimize edilirken farklı kaynaklardan gelen MKH'nin belirli özelliklerinin her zaman dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

Toplam 10 sağlıklı yetişkin donör ve kronik kalp yetmezliği olan 33 hasta kaydedilmiştir. Her bir donörden/hastadan kemik iliği numunesi ve deri altı yağ dokusu numunesi toplanmıştır. Hücreler, genişleme ve kültür için yaklaşık 300.000 hücre/cm² yüzey alanı yoğunluğunda kültür ortamındaki T75 flasklarında süspanse edilmiştir. HKH ve yapışmayan hücreler, ortam değişiklikleriyle çıkarılmıştır. Kısaca, dokular PBS ile üç dört kez yıkanıp önceden 37°C'ye ısıtılmış %0.1 kolajenaz tip III ile muamele etmişlerdir. Eşit hacimde PBS içinde süspanse edilmiştir. Doku, 30 dakika boyunca 37°C'de çalkalanan bir su banyosuna yerleştirilip ardından oda sıcaklığında 300 g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Hücreler, çoğalma ve kültür için yaklaşık 200.000/cm² yüzey alanı yoğunluğunda

kültür ortamında T75 flasklarında süspanse edilmiştir. Biz ise çalışmamızda 3 adet sıçanın böbrek altı yağ dokusundan yararlandık. Adipoz doku izolasyonunda %0,075 Tip I kollajenaz kullandık. Akış sitometrisi: Hücreler, hematopoietik soy hücre belirteçleri CD34, CD19, CD14 ve CD45 için ve stromal hücre ile ilişkili belirteçler CD105, CD90, CD73, CD166 ve CD146 için doğrudan konjuge PE, FITC veya APC kullanılarak analiz edilmiştir. CELLQuest edinim yazılımı kullanmışlardır (Dmitrieva ve ark, 2012). Biz de çalışmamızda CELLQuest edinim yazılımı kullanarak PE, PerCP, FITC kullanarak analizi yaptık. CD29, CD45, CD90 yüzey antijenlerini inceledik

Katharina Timper ve arkadaşları çalışmasında insan yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin insülin, somatostatin ve glukagon eksprese eden hücrelere farklılaşmasını incelemişlerdir. Fare kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin, *in vitro* bir pankreas endokrin fenotipini benimsediği ve bir hayvan modelinde diyabeti tersine çevirdiği göstermişlerdir. İnsan kemik iliği ve yağ dokusundan elde edilen MKH, karşılaştırılabilir fenotiplere sahip çok benzer hücre popülasyonlarını temsil eder. Adipoz doku bol ve kolay erişilebilirdir ve bu nedenle insülin üreten hücrelerde farklılaşma potansiyeli olan hücreleri de barındırabilir.

Dört sağlıklı donörden insan yağ dokusu kaynaklı MKH izole etmişlerdir. Proliferasyon periyodu sırasında hücreler, nestin, ABCG2, SCF, Thy-1 kök hücre belirteçlerini ve ayrıca pankreas endokrin transkripsiyon faktörü Isl-1'i eksprese etmişlerdir. Hücrelerin 3 gün içinde tanımlanmış kültür koşulları ile bir pankreas endokrin fenotipine farklılaşması gözlemlenmiştir.. Kantitatif PCR kullanılarak, insülin, glukagon ve somatostatin adacık hormonlarının indüksiyonu ile birlikte pankreas gelişimsel transkripsiyon faktörleri Isl-1, Ip1 ve Ngn3'ün regülasyonu gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda sıçan adipoz dokusundan MKH izole edildi ve CD90,CD29,CD45 yüzey belirteçlerine bakıldı. PCR kullanılarak kisspeptin ve nörokinin genlerinin ekspresyonu inceledik.

Plastik cerrahi uygulanan hastalardan insan yağ dokusunu almışlardır. Yağ dokusundan türetilen MKH izole edilip genişletilmiştir. MKH, 175 cm²'lik flasklarda kültürlenmiştir. Ortam haftada iki kez değiştirilmiştir. %95'lik bir birleşmede, hücreler tripsin kullanılarak toplanmış ve iki kez yıkanmıştır. Dört donörden gelen MKH, 4. ve 7. pasajlarda analiz etmişlerdir. Biz hücre kültüründe %15 fetal bovine serum (FBS) ,%1 penisilin–streptomisin ve α -MEM kullandık. MKH analizi ise 5., 6. pasajlarda yapıldı.

RNA izolasyonu ve ters transkripsiyonda, toplam RNA, üreticinin protokolüne göre TRIzol reaktifi kullanılarak ekstre etmişlerdir. RNA örnekleri, olası kontamine edici genomik DNA'yı çıkarmak için DNaz ile işlenmiştir. RNA, 260 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kalite, etidyum bromür içeren agaroz jel üzerinde jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. Bir mikrogram toplam RNA, ters transkripsiyona tabi tutmuşlardır. Polimeraz zincir reaksiyonu, PCR Taq çekirdek kiti kullanılarak geleneksel bir termal döngüleyici üzerinde gerçekleştirmişlerdir. Gerçek zamanlı PCR için kullanılan Ip1-1 için primer ve insülin haricinde insana özgü, intron kapsayan primerler kullanmışlardır (Timper ve ark, 2006).

Tarek Khamis ve arkadaşları bu çalışmada anne sütü mezenkimal kök hücrelerinin hipotalamik yoluyla diyabetik kaynaklı testis disfonksiyonu gelişimini ve erkek sıçanlarda Kisspeptin/Kiss1r-GnRH/GnIH sistemini incelemişlerdir. Diyabetik erkek kısırlığı üremeyi kontrol eden mekanizma olmasıyla birlikte hem merkezi hem de periferik yolları etkileyebilen majör komplikasyondur. Bu çalışma, anne sütü mezenkimal kök hücrelerinin diyabetik kaynaklı üreme işlev bozukluğu için moleküler düzeyde terapötik bir araç olarak potansiyel etkisini araştırma girişimidir. Kırk beş yetişkin erkek Sprague Dawely sıçanı 3 gruba ayrılmıştır; kontrol grubu, diyabetik grup ve Br-MKH'lerle tedavi edilen diyabetik grup.

Anne sütü mezenkimal kök hücrelerinin hazırlanması ve kültürü; anne sütü, penisilin-streptomisin-Amfoterisin B karışımı içeren yüksek glukozlu DMEM ile 1:2 oranında seyreltilmiştir. 285 g'de 10 dakika santrifüjlemişlerdir. Hücre

pelleti iki kez steril fosfat tamponlu salin ile yıkamışlardır. Hücre pelleti, %10 FBS içeren DMEM ortamı kullanılarak ve penisilin-streptomisin-Amfoterisin B kullanılarak 25 cm²'lik doku kültürü ile muamele edilip flaska ekimi gerçekleştirilmiştir. Flasklar daha sonra 37°C'de %5 CO₂ ve %95 bağıl nem altında CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Ortam 14 gün boyunca her 48 saatte bir değiştirmişlerdir. %0.02 EDTA içeren %0.25 tripsin ile 37°C'de 5 dakika tripsinize edildi ve 2400 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi, daha sonra hücreler pasajlanmış ve deney için kullanmışlardır. 3. pasajda hücreler %0.02 EDTA içeren tripsin EDTA %0.25 tripsin ile toplanmış, iki kez fosfat tamponlu salin ile yıkamışlardır. Hücre canlılığı, canlı hücrelerin boyanmamış ve ölü hücrelerin koyu mavi işaretli görüldüğü tripan mavisi canlılık testi ile gerçekleştirilmiştir. Bizde hücre kültürünü benzer bir şekilde gerçekleştirdik ve DMEM yerine α MEM kullandıldı. Ayrıca Amfoterisin B kullanılmadı. 3. pasajdaki kültürlenmiş hücrelerin CD45, CD34, CD90 ve CD105 yüzey antijenleri taşıyıp taşımadıkları akım sitometrisi ile incelemişlerdir ve sonucunda izole edilen hücrelerin MKH yüzey belirteci (CD105, CD90) için pozitif ve hematopoietik belirteçlere (CD34, CD45) negatif olduğunu göstermişlerdir (Khamis ve ark, 2020). Bizim çalışmamızda 5. Ve 6. Pasajlar akış sitometrisinde analiz edildi. MKH yüzey belirteci CD29, CD90 için pozitif ve hematopoietik belirteç CD45 negatif olduğunu gösterildi.

Cornelia Voigt ve arkadaşları çalışmasında dişi Damaraland köstebek faresinde Kisspeptin ve RFamid gen ifadesini incelemişlerdir. Damaraland köstebek fareleri, yüksek üreme yeteneği sergileyen yeraltı memelileridir. RFamid peptidi kisspeptin ve RFamid ile ilgili peptid e-3 (RFRP -3) gonadotropin salınımının güçlü düzenleyicileri olarak kabul edilir. Bu nöropeptidlerin üreme bastırma mekanizmasına dahil olup olmadığını değerlendirmek için, farklı üreme statüsüne sahip vahşi yakalanmış dişi Damaraland köstebek farelerinde in situ hibridizasyon yoluyla Kiss1 ve Rfrp'nin dağılımını ve gen ekspresyonu araştırmışlardır. Her iki üreme fenotipinde, kavisli çekirdekte önemli Kiss1 ekspresyonu bulunmuş ve potansiyel olarak üreyen ve üremeyen dişilerde düşük

dolaşımdaki estradiol konsantrasyonları nedeniyle AVPV'de sadece birkaç Kiss1 eksprese eden hücre tespit etmişlerdir. Rfrp gen ekspresyonu, dorsomedial çekirdekte, paraventriküler çekirdekte ve periventriküler çekirdekte meydana gelmiştir. Dişi yetiştiricilerde ve yetiştirici olmayanlarda plazma östradiol seviyeleri düşükken ve önemli ölçüde farklı olmasa da, her iki gen için hibridizasyon sinyalinin incelenmesi üreme durumu ile ilgili olarak önemli farklılıklar ortaya çıkarmıştır. Üreme açısından aktif dişiler, üremeyen dişilere kıyasla kavisli çekirdekte daha fazla Kiss1 eksprese eden hücreye sahipti. Bu fark en çok çekirdeğin kaudal kısmında belirgindi. AVPV'de böyle bir fark bulmamışlardır. Ayrıca, üreme durumu, ön hipotalamusta azaltılmış sayıda Rfrp eksprese eden hücre ile ilişkilendirilmiştir. Kiss1 ve Rfrp'nin üreme durumuna bağlı bu ekspresyon modeli, her iki nöropeptidin Damaraland köstebek farelerinde üremenin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermişlerdir. Veriler, üreme yapan dokuz dişiden ve üremeyen dokuz dişiden elde edilmiştir. Kiss1 ve Rfrp geninin fragmanlarını büyütmek için PCR kullanılmıştır (Voigt ve Bennett, 2018). Biz kisspeptinin ifadesini incelerken 3 adet sıçandan elde edilen adipoz kökenli mezenkimal kök hücreleri kullandık. RT-PCR ile kisspeptinin ifadesini inceledik

Cornelia Voigt ve arkadaşarı diğer çalışmasında olduğu gibi Damaraland köstebek farelerinde üreme durumuna bağlı gen ifadelerini incelemişlerdir. Bu çalışmalarında dinorfin ve nörokinin B genlerinin ifadesine bakmışlardır. Üremeyi engelleyen hipotalamustan normal GnRH sekresyonunun bozulmasıyla ortaya çıkabilen hipofizden yetersiz luteinleştirici hormonun salgılanmasının neden olduğu yumurtlamanın inhibisyonundan kaynaklanır. Nöropeptitler dinorfin ve nörokinin B, kavisli çekirdekteki nöronların bir alt popülasyonunda kisspeptin ile birlikte eksprese edilir. Bu nöron popülasyonu KNDy nöronları olarak adlandırılır ve GnRH puls üreticini oluşturduğu kabul edilir. Dynorphin (Pdyn geni tarafından kodlanır) ve nörokinin B'nin (Tac3 geni tarafından kodlanır) üreme bastırma mekanizmasına dahil olup olmadığını değerlendirmek için, vahşi doğada in situ

hibridizasyon yoluyla Pdyn ve Tac3'ün dağılımını ve gen ekspresyonunu araştırmışlardır. ARC'deki gen ekspresyon seviyelerinin incelenmesi, üremeyen dişilere kıyasla üremede Pdyn'in azaldığını ve Tac3 ekspresyonunun arttığını ortaya çıkarmıştır. Bu, her iki nöropeptidin de Damaraland köstebek farelerinde üremenin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir. Üreme durumunun Pdyn ve Tac3 gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin, GnRH'nin pulsatil salınımının, ARC içindeki KNDy nöron ağından NKB'nin salınmasıyla başlatıldığı ve bunun da Kisspeptin salınımını uyardığını ve ardından GnRH sekresyonunda artış gerçekleştiği bilinmektedir KNDy nöron ağından dinorfin salınımı, sonunda GnRH darbesini sonlandıran bir durdurma sinyali görevi görür. Veriler, üremeyen dişilerde normal pulsatil GnRH salınımının bozulduğunu, bunun nabız genliğini, frekansını veya her ikisini birden etkileyebileceğini ve azalmış LH nabız genliği ve/veya frekansında yansıtılabileceğini göstermişlerdir. Üreme açısından aktif dişilere kıyasla üreme açısından baskılanmış durumdaki artan dinorfin gen ekspresyonunu bildiren mevcut veriler, endojen opioid peptitlerin gerçekten normal üreme fonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir. Üreme fenotipine göre ARC'de NKB ve dinorfin farklı bir gen ekspresyon modelini göstermektedir. Her iki nöropeptidin de Damaraland köstebek farelerinde normal üremenin düzenlenmesinde rol oynadığını doğrular (Voigt ve Bennett, 2019). Bizde çalışmamızda üreme düzenlemesinde ve puberte bozukluklarında öne çıkan genlerin mezenkimal kök hücrede ifadesini incelemek istedik ve bu genlerden nörokinin de kisspeptinin de ifadesini gözlemledik.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada şıçan adipoz dokusundan mezenkimal kök hücre elde ettik. Bu hücrelerdeki kisspeptin ve nörokinin gen ekspresyonunun pasaj sayısı ile değişimini inceledik.

Kisspeptin reseptör geni için P₄ referans alındığında P₇ pasajının gen ifadesinin 2,93 kat arttığı sonucuna ulaştık. Taşikinin geninde ise P₄ grubu referans alındığında P₅ grubunun gen ifadesinin 30,67 kat arttığı sonucuna ulaştık. Taşikinin reseptör geninde P₄ grubu referans alındığında P₅ grubu gen ifadesinin 15,39 kat; P₅ grubu referans alındığında P₇ grubu gen ifadesinin 40,50 kat indüklendiğini gözlemledik. Kisspeptin geninin ise çalıştığımız gruplarda eksprese olmadığı gözlemlendi. Bu sonuçlar bize kisspeptin reseptör geni, taşikinin ve taşikinin reseptör genlerinin ilerleyen pasajlardaki ifadelerinin korele bir şekilde arttığını göstermektedir.

Sonuç olarak adipoz doku gibi, bulunma ve elde edilmesi kolay olan bir dokudan mezenkimal kök hücre elde edebilmenin ileri ki dönemler için tıp dünyasına bir ışık tutacağını düşünmekteyiz. Ayrıca puberte dönemine geçişte çok önemli göreve sahip olan kisspeptin ve nörokininin genlerinin ifadelerini incelerken pasaj sayılarına dikkat edilmesi, kullanılacak pasajdaki gen ifadeleri göz önünde bulundurularak pasaj sayısının seçilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

- Atalayın, Ç., Ergücü, Z., & Tezel, H. (2012). Diş hekimliğinde kök hücre ve dental pulpa kök hücreleri. Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 29(2), 115-120.
- Akkaya, H. (2018). Geçici Serebral İskemi Fare Modelinde Kisspeptin-10'un Böbrekteki Oksidan ve Antioksidan Aktiviteye Etkisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi, 32(2), 71-75.
- Akkoç, A. N., & Toplu, N. Kanser Kök Hücreleri. Animal Health Production and Hygiene, 5(1), 416-422.
- Ateş, U. (2016). Kök hücreyi tanıyalım.
- Avcılar, H., Saraymen, B., Özturan, O. Ö., & Köker, M. Y. (2018). Embriyonik Kök Hücreler ve İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler. Asthma Allergy Immunology/Astım Allerji Immunoloji, 16(1).
- Baker, N., Boyette, L. B., & Tuan, R. S. (2015). Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. Bone, 70, 37-47.
- Barbieri, R. L. (2014). The endocrinology of the menstrual cycle. In Human Fertility (pp. 145-169). Humana Press, New York, NY.
- Bayart, E., & Cohen-Haguenauer, O. (2013). Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells. Current gene therapy, 13(2), 73-92.
- Birbrair, A. (2017). Stem cell microenvironments and beyond. In Stem Cell Microenvironments and Beyond (pp. 1-3). Springer, Cham.
- Campos, M. M., & Calixto, J. B. (2000). Neurokinin mediation of edema and inflammation. Neuropeptides, 34(5), 314-322.
- Can, a., 2013. Kök hücre. Akademisyen Yayınevi, Ankara, 720s.

- Crop, M. J., Baan, C. C., Korevaar, S. S., Ijzermans, J. N. M., Pescatori, M. S. A. P., Stubbs, A. P., ... & Hoogduijn, M. J. (2010). Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 162(3), 474-486.
- Czelejewska, W., Zmijewska, A., Dziekonski, M., & Okrasa, S. (2020). The role of neurokinin A and its receptor in the regulation of prolactin secretion by the anterior pituitary of cyclic pigs. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(5), 604-612.
- Çapkın Yurtsever ve Deliloğlu İsmet (2010) Sıçan Kemik İliğinden ve Yağ Dokusundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL PCL Kollajen Nanofibröz Yüzeylerde Nöronal Hücre Dizilerine Farklılaştırılması.
- Çoban, Z. D. (2010) Kök Hücrede Gen Transferi İle İstenen Bir Genin Aktivasyonu Veya Susturulması Uygulamalarının Rejeneratif Tıpta Kullanımı Using A Desired Gen Activation Or Silencing Methodology With Gen Transferring To Stem Cell İn Regenerative Medicine.
- d'Anglemon de Tassigny, X., & Colledge, W. H. (2010). The role of kisspeptin signaling in reproduction. *Physiology*, 25(4), 207-217.
- Das, N., & Kumar, T. R. (2018). Molecular regulation of follicle-stimulating hormone synthesis, secretion and action. *Journal of molecular endocrinology*, 60(3), R131-R155.
- Ding, D. C., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*, 20(1), 5-14.
- Dmitrieva, R. I., Minullina, I. R., Bilibina, A. A., Tarasova, O. V., Anisimov, S. V., & Zaritskey, A. Y. (2012). Bone marrow-and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell cycle*, 11(2), 377-383.
- Durmaz, A., & Dikmen, N. (2007). Kimyasal Öpücük: Kisspeptin. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 16(3), 172-184.

- Ghorbani, A., Jalali, S. A., & Varedi, M. (2014). Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method. *Tissue and Cell*, 46(1), 54-58.
- Gündeşlioğlu, Ö. A., Karaçor, Z., Bilsev, İ. N. C. E., DADACI, M., Aktan, M., & Duman, S. (2013). Yağ Doku Kökenli Kök Hücreler ve Plastik Cerrahide Uygulama Alanları. *Türk Plastik Rekonstrüktif Ve Estetik Cerrahi Dergisi*, 21(3), 1-10.
- Hellier, V., Brock, O., & Bakker, J. (2019). The role of Kisspeptin in sexual behavior. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 37, No. 02, pp. 084-092). Thieme Medical Publishers.
- İskender, B., & Canatan, H. (2013). İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ve hücre tedavisi. *Journal of Clinical & Experimental Investigations*, 4(4).
- İskit, A. B. (2005). Sepsiste deneysel modeller. *Yoğun Bakım Dergisi*, 5(2), 133-136.
- Jeon, Y. J., Kim, J., Cho, J. H., Chung, H. M., & Chae, J. I. (2016). Comparative analysis of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, placenta, and adipose tissue as sources of cell therapy. *Journal of cellular biochemistry*, 117(5), 1112-1125.
- Kafa, İ. M., & Eyigör, Ö. (2011). Kisspeptinler ve kisspeptin nöronları: Üreme sistemi üzerine etkileri ve hipotalamik yerleşimleri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 37(1), 53-60
- Karashahin, T. (2012). Embriyonik kök hücreler. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9(1), 65-71.
- Kaya M, & Çevik, A. (2011). Hayvan deneylerinde planlanma ve model seçimi. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1(2), 36-39.

- Khamis, T., Abdelalim, A. F., Abdallah, S. H., Saeed, A. A., Edress, N. M., & Arisha, A. H. (2020). Early intervention with breast milk mesenchymal stem cells attenuates the development of diabetic-induced testicular dysfunction via hypothalamic Kisspeptin/Kiss1r-GnRH/GnIH system in male rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1866(1), 165577.
- Khazali, H., & Mahmoudi, F. (2019). Morphine and kisspeptin influences on 5- α reductase and aromatase gene expression in adult male rats. *Iranian journal of basic medical sciences*, 22(12), 1462.
- Koca, R. Ö. (2019). Nörokinin 3 reseptörünün sıçan deneysel alzheimer modelinde kognitif davranışlar üzerine etkisi.
- Longmore, J., Hill, R. G., & Hargreaves, R. J. (1997). Neurokinin-receptor antagonists: pharmacological tools and therapeutic drugs. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 75(6),
- Mohamed-Ahmed, S., Fristad, I., Lie, S. A., Suliman, S., Mustafa, K., Vindenes, H., & Idris, S. B. (2018). Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 1-15.612-621.
- Mortada, I., & Mortada, R. (2018). Epigenetic changes in mesenchymal stem cells differentiation. *European Journal of Medical Genetics*, 61(2), 114-118.
- Müller, S., Kulenkampff, E., & Wolfrum, C. (2015). Adipose tissue stem cells. *Metabolic Control*, 251-263.
- Nazlı, M., & Morris, R. (2000). Evidence that the Neurokinin 1 Receptor is Expressed in spinal Neurones Which Do Not Synthesize Nitric Oxide in the Rat. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 24(5), 453-458.
- Perera-Marin, G., Murcia, C., & Gonzalez-Padilla, E. (2007). Luteinizing hormone (LH) isoforms in ruminants: characterization and physiological relevance. *Animal reproduction science*, 101(3-4), 187-207.

- Rahman, N. A., & Rao, C. V. (2009). Recent progress in luteinizing hormone/human chorionic gonadotrophin hormone research. *Molecular human reproduction*, 15(11), 703-711.
- Rajabzadeh, N., Fathi, E., & Farahzadi, R. (2019). Stem cell-based regenerative medicine. *Stem cell investigation*, 6.
- Regoli, D., Rhaleb, N. E., Tousignant, C., Rouissi, N., Jukic, D., & Drapeau, G. (1990). Neurokinin A. A pharmacological study. *Pharmacological research*, 22(1), 1-14.
- Sağsöz, H., & Ketani, M. A. (2008). Kök hücreler. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2), 29-33.
- Sarıbay, M. K., Köse, A. M., & Yılmaz, M. A. (2018). Repeat breeder ineklerin tedavisinde GnRH ve gonadotropinlerin (LH, hCG, PMSG) kullanımı. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 58(1), 34-41.
- Sarıyıldız, B., Kasap, B., Türkcü, Ü. Ö., Akın, M. N., Küçük, M., Turhan, N. Ö., & Akbaba, E. (2020). Gestasyonel Diyabetes Mellitus' lu Gebelerde Kisspeptin Düzeyi.
- Semih, B. O. L. U., & Abdulvahit, A. Ş. I. K. Erken puberte ayırıcı tanısında kullanılan gonadotropin salgılatıcı hormon uyarı test sonuçlarının değerlendirilmesi. *Adıyaman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 7(1), 26-31.
- Sharpe, R. M. (1989). Follicle-stimulating hormone and spermatogenesis in the adult male. *Journal of Endocrinology*, 121(3), 405-407.
- Sevim, H., & GÜRPINAR, Ö. (2012). İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ve uygulamaları. *Marmara Medical Journal*, 25(1), 5-9.
- Skorupskaitė, K., George, J. T., & Anderson, R. A. (2014). The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Human reproduction update*, 20(4), 485-500.

- Szade, K., Gulati, G. S., Chan, C. K., Kao, K. S., Miyanishi, M., Marjon, K. D., ... & Weissman, I. L. (2018). Where hematopoietic stem cells live: the bone marrow niche. *Antioxidants & redox signaling*, 29(2), 191-204.
- Şahin, F., Saydam, G., & Omay, S. B. (2005). Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi. Hematoloji AnaBilim Dalı, İzmir.
- Tanyeli, A., Aykut, G., Demirel, A. O., & Akçaoğlu, T. (2014). Hematopoetik kök hücre nakli ve tarihçesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 23(1), 1-7.
- Timper, K., Seboek, D., Eberhardt, M., Linscheid, P., Christ-Crain, M., Keller, U., & Zulewski, H. (2006). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 341(4), 1135-1140.
- Trevisan, C. M., Montagna, E., de Oliveira, R., Christofolini, D. M., Barbosa, C. P., Crandall, K. A., & Bianco, B. (2018). Kisspeptin/GPR54 system: what do we know about its role in human reproduction?. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(4), 1259-1276.
- Varoğlu, D.,& Erdoğan, L. O. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (Veteriner) Fırat University Journal of Health Sciences (Veterinary).
- Voigt, C.,& Bennett, N. (2019). Reproductive status-dependent dynorphin and neurokinin B gene expression in female Damaraland mole-rats. *Journal of chemical neuroanatomy*, 102, 101705.
- Voigt, C.,& Bennett, N. C. (2018). Reproductive status-dependent kisspeptin and RF amide-related peptide (Rfrp) gene expression in female Damaraland mole-rats. *Journal of neuroendocrinology*, 30(3), e12571.
- Yardımcı, I. A.,& Keleştimur, H. (2019). Puberte Nöroendokrinolojisi Ve Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Nöronları. *Nobel Medicus Journal*, 15(2).

- Yılmaz, F.,& Tekmen, İ. (2018) Blastosist gelişimi; hücre soylarının farklanma mekanizmaları. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 32(3), 243-250.
- Yurdakoş, D. E., Dalı, F. A., & Mengi, M. (2009) P Maddesi'nin Emosyonel Aktivite Üzerine Santral Ve Periferik Etkileri, Bu Etkilerde Wın-51708'in Rolü.
- Zülfiye & Büyükuysal, L. R. (2020) Kisspeptin'in Gelişimsel Döneme Bağlı Olarak Dişi Sıçanlarda Medial Preoptik Bölgede İn Vitro Noradrenalin Salıverilmesi Üzerine Etkisi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 46(2), 181-188.



ÖZGEÇMİŞ

Seda AKBOLAT, lise eğitimini Osmaniye’de tamamladı. Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nden 2018 yılında mezun oldu. 2019 yılının şubat ayında Adana Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı.

