

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KAS HASARI OLUŞTURULMUŞ RATLARDA KEMİK İLİĞİ MEZANKİMAL
KÖK HÜCRE UYGULAMASININ APOPTOZİS VE ANTİOKSİDAN ENZİMLER
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Rukiye DEMİR

DOKTORA TEZİ

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KAS HASARI OLUŞTURULMUŞ RATLARDA KEMİK İLİĞİ MEZANKİMAL
KÖK HÜCRE UYGULAMASININ APOPTOZİS VE ANTiOKSİDAN ENZİMLER
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

RUKİYE DEMİR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SAMSUN
2016

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Rukiye Demir Tarafından Hazırlanan “Kas Hasarı Oluşturulmuş Ratlarda Kemik İliği Mezankimal Kök Hücre Uygulamasının Apoptozis ve Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisinin Araştırılması” adlı tez çalışması 19/12/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Emine DIRAMAN .
Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri

Başkan Prof. Dr. Zafer EREN .
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Erdal KARAÖZ
İstinye Üniversitesi
Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Nurten KARA
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye Doç. Dr. Ayşegül ÇEBİ
Giresun Üniversitesi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım. .../.../2016

.....

Prof. Dr.
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

01 / 12 / 2016

Rukiye Demir

ÖZET

Doktora Tezi

KAS HASARI OLUŞTURULMUŞ RATLARDA KEMİK İLİĞİ MEZANKİMAL KÖK HÜCRE UYGULAMASININ APOPTOZİS VE ANTIOKSİDAN ENZİMLER ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Rukiye Demir

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emine Dıraman

Bu çalışmada, ezilme tarzı kas hasarı oluşturulmuş ratlarda, kemik iliği mezankimal kök hücre (MKH) uygulamasının apoptozis ve antioksidan enzimler üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada, toplam 56 tane *Wistar albino* dişi rat kullanılmıştır. Çalışma grupları, Kontrol grubu (K), Kas Hasarı grubu (KH) ve Kas Hasarı + Mezankimal Kök Hücre grubu (KH+MKH) olarak oluşturulmuştur. KH ve KH+MKH deney gruplarında 7.gün, 14.gün ve 21. gün olarak alt gruplar oluşturulmuştur (n:8). K grubunda ratlar sakrifiye edilerek sağ soleus kası, hasar oluşturulmadan çıkarılmıştır. KH ve KH+MKH gruplarında ise genel anestezi altında sağ soleus kasında 10'ar saniyelik 2 klemp tıki şeklinde künt ezilme ile kas hasarı oluşturulmuştur. KH+MKH grubunda, kas hasarı oluşturulan bölgeye 24 saat sonra lokal olarak, erkek ratlardan elde edilen Y kromozomu pozitif olan yeşil flouresan proteinli (GFP+) MKH'ler verilmiştir. KH ve KH+MKH gruplarında ratlar, kas hasarı oluşturduktan sonraki 7. 14. ve 21. günlerde sakrifiye edilerek sağ soleus kasları incelenmek üzere çıkarılmıştır. Ratlardan alınan kas dokusu örneklerinde, antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve apoptozis belirteci olarak kaspaz-3 enzimlerinin aktiviteleri ölçülmüştür. KH+MKH grubunda, immünohistokimyasal incelemede görülen GFP+ MKH'lerin varlığı ve SRY geninin belirlenmesi ile MKH'lerin hasarlı bölgeye nakil işleminin gerçekleştiği gösterilmiştir.

K grubuna göre, KH+14 ve KH+MKH+14 gruplarında CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. K grubuna göre KH+MKH+21 grubunda SOD enzim aktivitesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin ise K grubu değerlerine yakın olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar MKH uygulamasının 21. günde antioksidan özellik gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

K grubuna göre KH+MKH+14 ve KH+MKH+21 gruplarında kaspaz-3 aktivite değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur. KH+21. grubuna göre KH+MKH+21 grubunda kaspaz-3 değerlerindeki artış da istatistiksel olarak anlamlıdır. İmmünohistokimyasal incelemede GFP+ MKH'ler kas hücresi şeklinde görülmüştür. Bu sonuçlar bölgedeki hasarlı hücrelerin apoptozise yöneldiği ve GFP+ MKH'lerin kas hücrelerine dönüşerek bu hasarlı hücrelerin yerini aldığı şeklinde yorumlanmıştır.

Aralık 2016, 96 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kemik İliği Mezankimal Kök Hücre, Kas Hasarı, SOD, CAT, GSH-Px, Kaspaz-3, GFP, SRY.

ABSTRACT

Doctoral Dissertation

AN INVESTIGATION ON THE EFFECT OF THE APPLICATION OF BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELL ON APOPTOSIS AND ANTIOXIDANT ENZYMES IN MUSCLE DAMAGED RATS

Rukiye Demir

Ondokuz Mayıs University
Graduate School of Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emine Diraman

In this study, the effect of the application of bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) on apoptosis and antioxidant enzymes in rats with crushed muscle damage was researched. In the study, totally 56 *Wistar albino* female rats were used. The study groups were formed as the Control Group (C), the Muscle Damage Group (MD) and the Muscle Damage + Mesenchymal Stem Cell Group (MD+MSC). In the MD and MD+MSC groups, the 7th day, 14th day and 21st day subgroups were formed (n:8). The rats in the C group were sacrificed and their right soleus muscles were removed without causing any damage. And in the MD and MD+MSC groups, blunt crush muscle damage was created by means of two ten-second clamp ticks on their right soleus muscles under general anesthesia. On the sections with muscle damage in the MD+MSC group, MSCs with green fluorescent protein (GFP+) whose Y chromosomes obtained from male rats were positive were administered locally after 24 hours. The rats in the MD and MD+MSC groups were sacrificed on the 7th, 14th and 21st days after creating muscle damage, and their right soleus muscles were removed so as to examine them. In the muscle tissue samples obtained from the rats, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px), which are antioxidant enzymes, and of Caspase-3 as an apoptosis indicator were measured. In the MD+MSC group, it was revealed that the transplant process to the damaged section took place by means of the determination of the existence of the MSCs with GFP+ seen in the immunohistochemical examination and the identification of the SRY gene.

Compared to group C, the increase in the CAT and GSH-Px enzyme activities in groups MD+14 and MD+MSC+14 were found statistically significant. Compared to group C, the decrease in the SOD enzyme activity in group MD + MSC+21 was found statistically significant, and it was seen that the CAT and GSH-Px enzyme activities were close to values of group K. These results were interpreted that the application of MSC revealed an antioxidant characteristic on the 21st day.

Compared to group C, a statistically significant increase in the Caspase-3 activity values in groups MD+MSC+14 and MD+MSC+21 was found. Compared to group MD+21, the increase in the Caspase-3 activity values in group MD+MSC+21 is also statistically significant. In the immunohistochemical examination, the MSCs with GFP+ were seen in the form of muscle cells. These results were interpreted that the damaged cells inclined for apoptosis, and that the MSCs with GFP+ transformed into muscle cells and replaced those damaged cells.

December 2016, 96 page

Keywords: Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell, Muscle Damage, SOD, CAT, GSH-Px, Caspase-3, GFP, SRY.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca bilgisini, desteğini ve güvenini esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Emine Dıraman'a, bilimsel katkı ve deneyimleri ile destek olan değerli hocam Prof. Dr. Erdal Karaöz'e teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Zafer Eren'e, Prof. Dr. Nurten Kara'ya, Yrd. Doç. Dr. Leman Tomak'a, Prof. Dr. Zafer Yazıcı'ya, Yrd. Doç. Dr. Gökhan Duruksu'ya, Yrd. Doç. Dr. Banu Eren'e, Dr. Musa Keleş'e, Dr. Burcu Yılmaz'a, Ayşegül Türkdönmez'e, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü hocalarıma, çalışanlarına, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Bölümü hocalarına ve çalışanlarına, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde görev yapan personele teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında bana destek olan, çok sevdiğim annem ve babama,

Sevgili eşim Prof. Dr. Ahmet Demir'e ve canlarım kızım Berceste, oğlum Bartu'ya sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu Doktora Tez Çalışması, PYO.FEN.1904.12.011' nolu Bilimsel Araştırma Projesi olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

Aralık 2016, Samsun

Rukiye Demir

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kök Hücre.....	4
2.1.1. Farklılaşmalarına Göre Kök Hücre Çeşitleri.....	6
2.1.1.1. Totipotent Kök Hücre.....	6
2.1.1.2. Pluripotent Kök Hücre.....	7
2.1.1.3. Multipotent Kök Hücre.....	9
2.1.2. Kök Hücrelerin Özellikleri.....	10
2.1.2.1. Farklılaşma.....	10
2.1.2.2. Kendini Yenileme	12
2.1.2.3. Niş	13
2.1.3. Embriyonik Kök Hücreler.....	14
2.1.4. Erişkin Kök Hücreleri.....	15
2.1.5. Hematopoetik Kök Hücre.....	16
2.1.6. Mezankimal Kök Hücre.....	18
2.1.7. Kök Hücre Çalışmalarında Başlıca Gelişmeler.....	20
2.2. Serbest Radikaller.....	21
2.2.1. Serbest Radikallerin Vücutta Üretim Yerleri.....	24
2.2.2. Süperoksit radikali	26
2.2.3. Hidrojen Peroksit.....	27
2.2.4. Hidroksil Radikali.....	29
2.2.5. Singlet Oksijen.....	29
2.2.6. Nitrik Oksit.....	30
2.2.7. Oksidatif Stres ve Oksidatif hasar.....	31
2.3. Antioksidan Enzimler.....	35
2.3.1. Süperoksit Dismutaz (E.C.1.15.1.1.).....	39
2.3.2. Glutasyon Peroksidaz (E.C.1.11.1.9.).....	40
2.3.3. Katalaz (E.C. 1.11.1.6.).....	41
2.4. Apoptozis.....	43
2.4.1. Kaspazlar.....	48
2.4.2. Kaspaz 3.....	50
2.5. SRY Geni ve Sox2.....	51
2.6. Kas Hasarı.....	52
2.6.1. Deney Hayvanı Soleus Kası.....	54

3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	55
3.1. Deneysel Hayvanlarının Sağlanması.....	55
3.2. Araştırma Gruplarının Oluşturulması.....	55
3.3. Cerrahi Hazırlık ve Kas Hasarı Oluşturma.....	56
3.4. Kemik İliği Mezankimal Kök Hücre Uygulaması.....	56
3.4.1. Kemik İliği Mezankimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültüre Hazırlanması.....	57
3.4.2. Akım Sitometrik Analiz.....	57
3.4.3. Plazmid DNA İzolasyonu.....	58
3.4.4. GFP Gen Transformasyonu.....	58
3.4.5. Kemik iliği mezankimal kök hücreleri çözme işlemi ve uygulanması.....	59
3.5. Dokuların Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması.....	61
3.6. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini	62
3.7. Katalaz Aktivite Tayini.....	63
3.8. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini.....	64
3.9. Kaspaz-3 Aktivite Tayini.....	65
3.10. Dokuların Histolojik İnceleme İçin Hazırlanması.....	66
3.11. SRY Geni.....	67
3.11.1. Dokudan DNA izolasyonu.....	67
3.11.2. Gerçek Zamanlı PCR.....	68
3.11. İstatistiksel Analiz.....	68
4. BULGULAR	69
4.1. Süperoksit Dismutaz Enzimi Aktivite Değişimi.....	69
4.2. Katalaz Enzimi Aktivite Değişimi.....	71
4.3. Glutasyon Peroksidaz Enzimi Aktivite Değişimi.....	73
4.4. Kaspaz-3 Enzimi Aktivite Değişimi.....	75
4.5. İmmünohistokimyasal inceleme.....	77
4.6. Akım sitometrik analiz sonuçları.....	79
4.7. Y-Kromozomu Taşıyan Hücrelerin Tespiti.....	79
5. TARTIŞMA.....	81
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	87
7. KAYNAKLAR.....	88
8. ÖZGEÇMİŞ.....	97

SİMGELER VE KISALTMALAR

İHK	: İç hücre kitlesi
MKH	: Mezankimal Kök Hücre
İPKH	: İndüklenmiş pluripotent kök hücre
MEPH	: Multipotent Erişkin Progenitor Hücre
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
TGF- β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü -Beta
Dex	: Dekstroz
5-AZA	: 5- Azasitidin
KH	: Kas hasarı
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
MKH	: Mezankimal Kök Hücre
HKH	: Hematopoetik Kök Hücreler
HB	: Hemanjioblast
CFU-F	: Koloni oluşturucu birim fibroblast
ISCT	: Uluslararası Hücresel Tedavi Birliği
O ₂	: Oksijen
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
DNA	: Deoksiribonükleik asit
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
Ör	: Örnek
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
HOCl:	: Hipokloröz asit
PUFA	: Poliansatüre yağ asitleri
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali
NAD ⁺	: okside Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADH	: redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid
SOD	: Süperoksit Dismutaz
EC-SOD	: Ekstraselüler SOD
Mn-SOD	: Mangan SOD
CuZn-SOD	: Bakır çinko SOD
Fe-SOD	: Demir SOD
Ni-SOD	: Nikel SOD
CAT	: Katalaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSSG	: Okside glutasyon
GSH	: Redükte glutasyon
ROO.	: Peroksi radikali
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksid Sentaz
nNOS	: nöronal Nitrik Oksid Sentaz
eNOS	: endotelyal Nitrik Oksid Sentaz
iNOS	: indüklenbilir Nitrik Oksid Sentaz
ONOOH	: peroksinitrit
APO-1	: Apoptotic Protease Activating Factor1
CD	: Farklanma kümeleri

TNF	: Tumor nekroz faktörü
TNF-a	: Tumor nekroz faktör a
ATP	: Adenozin trifosfat
ADP	: Adenozin difosfat
FasL	: Fas ligant
Asp	: Asparajin
kDa	: Kilodalton
ER	: Endoplazmik retikulum
CAD	: Kaspaz aktif DNaz
ICAD	: Kaspaz aktif DNaz inhibitörü
PDK2	: p-21 aktive kinaz 2
mg	: miligram
kg	: kilogram
cm	: santimetre
L-DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose
FBS	: Fetal Bovine Serum
PBS	: Phosphate Buffered Saline
FITC	: fluoresan izotiyosiyonat
PE	: fikoeritrin
ml	: millilitre
μ l	: mikro litre
μ mol	: mikromol
LB	: Luria Bertani
M	: Molar
$^{\circ}$ C	: Santigrat derece
sn	: saniye
rpm	: dakikadaki devir sayısı
pNA	: p-nitroaniline
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksid
OH \cdot	: Hidroksil radikali
vd	: ve diğerleri
İVF-ET	: <i>İn vitro</i> fertilizasyon embriyon transferi
HLA-DR	: Human Leukocyte Antigen - antigen D Related
U	: Birim zamanda substratı ürüne dönüştüren enzim

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Kök hücreler dört ana kaynaktan köken alırlar.....	5
Şekil 2.2.	Kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşma ürünleri	5
Şekil 2.3.	Zigot totipotent kök hücredir	6
Şekil 2.4.	Blastosist ve iç hücre kitlesi	7
Şekil 2.5.	Somatik hücrelerin yeniden programlanarak pluripotent özellik kazanmaları.....	8
Şekil 2.6.	İPKH'lerin kullanım alanları	8
Şekil 2.7.	Multipotent erişkin öncül hücrelerin farklı sinyal moleküllerine yanıt olarak gösterdikleri değişik yöndeki farklılaşmaları	9
Şekil 2.8.	Baksh ve ark (2004)'nin önerdiği modele göre mezankimal kök hücrelerin farklılaşması.....	11
Şekil 2.9.	Kök hücrelerin, kendini yenileme, çoğalma ve farklılaşma özellikleri	12
Şekil 2.10.	Kök hücre ve nişi	13
Şekil 2.11.	İç hücre kitlesi ve gastrula evresi	15
Şekil 2.12.	Kök hücre ve hematopoez	17
Şekil 2.13.	Serbest radikal.....	21
Şekil 2.14.	Serbest radikallerin hücreye etkisi	22
Şekil 2.15.	Moleküler oksijenin indirgenmiş formları	23
Şekil 2.16.	Reaktif oksijen türlerine bağlı oluşan lipit peroksidasyon ürünleri	26
Şekil 2.17.	Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu	28
Şekil 2.18.	Oksidatif dengenin bozulması	32
Şekil 2.19.	Serbest radikaller ve oksidatif DNA hasar	33
Şekil 2.20.	Oksidatif mtDNA hasarı.....	34
Şekil 2.21.	Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu	38
Şekil 2.22.	Klasik apoptozis yolu	46
Şekil 2.23.	Apoptozisde görülen morfolojik değişimler.....	47
Şekil 2.24.	Ölüm reseptörleri ve mitokondriyal yollarla kaspaz-3 aktivasyonunun başlamasıyla nukleusta oluşan DNA fragmentasyonu	49
Şekil 2.25.	İskelet kasının yapısı	52
Şekil 2.26.	Kas dokusu iyileşmesinin şematik gösterimi	54
Şekil 2.27.	Rat soleus kası	54
Şekil 3.1.	Kas hasarı oluşturma	56
Şekil 3.2.	Deney hayvanlarına uygulanacak kök hücre solüsyonu.....	60
Şekil 3.3.	Deney hayvanlarının hasarlı soleus kasına lokal GFP+ MKH uygulaması.....	60
Şekil 3.4.	Alınan doku örnekleri.....	61
Şekil 4.1.	SOD enzimi aktivitelerinin zamana göre değişimi	70
Şekil 4.2.	SOD enzimi aktivite değerleri grafiği	70
Şekil 4.3.	SOD enzimi aktivitesi	71
Şekil 4.4.	CAT enzimi aktivitelerinin zamana göre değişimi.....	72
Şekil 4.5.	CAT enzimi aktivite değerleri grafiği.....	72
Şekil 4.6.	CAT enzimi aktivitesi.....	73
Şekil 4.7.	GSH-Px enzimi aktivitelerinin zamana göre değişimi.....	74
Şekil 4.8.	GSH-Px enzimi aktivite değerleri grafiği.....	74
Şekil 4.9.	GSH-Px enzimi aktivitesi	75

Şekil 4.10. Kaspaz-3 enzimi aktivitelerinin zamana göre değişimi.....	76
Şekil 4.11. Kaspaz-3 enzimi aktivite değerleri grafiği.....	76
Şekil 4.12. Kaspaz-3 enzimi aktivitesi	77
Şekil 4.13. K, KH+MKH gruplarına ait kas doku kesitlerinde GFP için immün boyama sonuçları. Kas hasarı oluşturulduktan 24 saat sonra GFP+ MKH uygulaması yapılmış olup KH+MKH grubunda GFP+ MKH'lerin (oklar) hasarlı kas dokusunda yerleştiği görülmektedir.....	78
Şekil 4.14. KH+MKH grubunda GFP+ MKH'lerin (oklar) hasarlı kas dokusunda yerleştiği görülmektedir.....	78
Şekil 4.15. Akım sitometrik analiz sonuçları.....	79
Şekil 4.16. Hücre nakli sonrasında dokularda Y-kromozomu taşıyan hücrelerin tespiti.....	80



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kökenlerine, farklılıklerine ve farklılık yönlerine göre kök hücre türleri	10
Çizelge 2.2. MKH'lerin köken aldıkları dokular ve farklılaştırılmış hücre örnekleri	19
Çizelge 2.3. Hücresel koşullarda oluşabilen önemli oksijen radikalleri.....	23
Çizelge 2.4. Hücrelerde serbest radikal kaynakları	24
Çizelge 2.5. Membran antioksidanları ve etkileri	35
Çizelge 2.6. Hücresel antioksidan enzimler ve reaksiyonları	36
Çizelge 2.7. Ekstraselüler antioksidanlar ve etkileri	36
Çizelge 2.8. Antioksidan enzimlerin reaksiyonları	42
Çizelge 2.9. İnsanlarda apoptozisin izlendiği durumlar	44
Çizelge 2.10. Apoptozis ve nekrozun farklıları	44
Çizelge 3.1. Plate kuyucuğuna konulan maddeler ve miktarları	66
Çizelge 4.1. SOD enzimi aktivite ve p değerleri	69
Çizelge 4.2. CAT enzimi aktivite ve p değerleri.....	71
Çizelge 4.3. GSH-Px enzimi aktivite ve p değerleri.....	73
Çizelge 4.4. Kaspaz-3 enzimi aktivite ve p değerleri.....	75

1.GİRİŞ

Kök hücreler, asimetrik bölünebilen, kendini yenileyebilen ve olgun hücreye farklılaşabilen hücreler olarak tanımlanmıştır (Shifman vd, 2014). Kök hücreler, asimetrik bölünme ile kendi yedeğini ve yenilenecek dokunun öncü hücrelerini meydana getirirler (Can, 2014). Bu öncü hücreler farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşürler (İnan & Özbilgin, 2009; Weisman, 2000).

Caplan (1991), MKH'leri, embriyoda kemik ve kartilaj oluşumu, erişkinde kemik ve kartilaj onarımı ile yenilenmesinde görevli az sayıdaki progenitör hücre olarak tanımlamıştır. MKH'ler, çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri olan çok yönelimli öncü hücrelerdir. Kemik iliğinden kolayca elde edilebilir ve *in vitro* olarak çoğaltılabilirler (Kozanoğlu, 2010). MKH'nin en belirgin özelliklerinden birisi, alıcıda inflamasyonu ve immünolojik yanıtları oluşturmamasıdır (Can & Karahüseyinoğlu, 2009). Kolay elde edilmeleri, güçlü çoğalma ve farklılaşma kapasitelerinin olması ve akraba dışı kullanılabilmeleri nedeniyle doku tamiri ve hücre tedavilerde diğer kök hücrelere tercih edilmektedirler (Kozanoğlu, 2010). MKH'ler, yetişkin omurgalı türlerinin iskelet dokusuna, kemik, kırıkta, ilik stroması ve yağ hücrelerine farklılaşırlar (Malgieri vd, 2010; Pittenger vd, 1999; Alhadlaq & Mao 2003).

Hücrelerde gerek enerji üretimi sırasındaki reaksiyonlarda gerekse metabolik reaksiyonlardaki oksijen tüketimi sırasında serbest radikaller meydana gelmektedir (Çakatay & Kayalı, 2006; Elmaksoud vd, 2015). Eşlenmemiş elektron içeren, çok kararsız ve kararlı hale gelebilmek için elektron almaya ihtiyaç duyan serbest radikaller, diğer moleküllerle çok hızlı reaksiyona girerler (Gökpınar vd, 2006). Serbest radikaller bir moleküle saldırdığında o molekülün elektronunu alarak okside eder ve oluşan yeni molekül serbest radikal haline dönüşür (Gökpınar vd, 2006).

Oksidatif denge, serbest radikallerin oluşum hızı ile ortadan kaldırılma hızındaki denge olarak tanımlanmaktadır. Organizma, oksidatif denge sağlandığı sürece serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşumunda artma veya ortadan kaldırılma hızında azalma olduğunda oksidan-antioksidan denge bozulur. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum, serbest radikal oluşumu ile antiokasidan savunma arasındaki ciddi dengesizliği gösterir ve doku hasarına yol açar (Altan vd, 2006). İnsan vücudunda bütün hücrelere kolaylıkla girebilen ve kullanılabilen moleküler oksijen (O₂), yapısı nedeniyle radikal olmaya çok müsaittir

(Akyol, 2004). O₂, başta mitokondri olmak üzere hücre kompartmanlarında gerçekleşen metabolik olaylarda indirgenerek reaktif oksijen türlerine (ROT) dönüşür (Özcan vd, 2015).

Serbest radikallere karşı vücutta bulunan doğal savunma mekanizmasını oluşturan bileşiklere antioksidanlar denir (Gökpınar ve ark., 2006). Antioksidanlar serbest radikalleri hücrelere saldırmadan stabilize ve deaktive etme yeteneğinde olan moleküllerdir (Derviş, 2011). Katalaz (CAT), Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Glutasyon Peroksidaz'ın (GSH-Px) rol aldığı antioksidan aktiviteleri enzimatik antioksidan savunma olarak adlandırılır (Dündar & Aslan, 2000). Farklı metabolik reaksiyonlarda oksijen tüketimi nedeniyle oluşan (Elmaksoud vd, 2015) serbest radikaller, hücrede metabolik faaliyetlerde oluşabileceği gibi, farklı dış etkenlerle de meydana gelebilir (Çakatay & Kayalı, 2006). SOD, oksijenden ilk reaktif ürün olarak oluşan süperoksit anyonunun daha az reaktif bir ürün olan hidrojen perokside (H₂O₂) ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (Derviş, 2011). Biyolojik sistemlerde oluşan H₂O₂'in, oksitleyici özelliği nedeniyle ortamdan uzaklaştırılması gerekir (Kılınç & Kılınç, 2002). H₂O₂' in uzaklaştırılması CAT ve GSH-Px enzimleri tarafından gerçekleştirilir (Davies, 2000).

Apoptozis, programlanmış hücre ölümüdür. Hücrenin, genlerindeki programlamaya göre veya dış uyaranlarla kendi makromoleküllerini sistematik olarak parçalayarak kendi ölümüne ve yok olmasına neden olmasıdır (Nelson vd, 2005). Apoptozis, canlının kendi otonom mekanizması ile istenmeyen, yaşlanmış ve zararlı hücrelerinin, bakterilerin, otoreaktif virüslerle enfekte olmuş hücrelerin enerji kullanarak, zamana endekli olarak iz bırakmadan öldürülmesi olayıdır (Gültekin vd, 2008). Apoptoziste ROT'lerinin etkisi olduğu belirtilmiştir (Martin ve Barret, 2002). Antioksidan enzim düzeyinde azalma, ROT oluşumunda artma ve DNA onarım mekanizmasında defekt olması oksidatif DNA hasarına yol açar. DNA'daki oksidatif hasar yüksek düzeylere ulaştığında apoptozis gerçekleşir (Burçak & Andican, 2004). DNA yapısının bozulması ve hücrenin hasarlanması ölüm ya da yaşam kararının verilmesinde etkileyici rol oynar (Koçyiğit & Çevik, 2011). DNA hasarı ve oksidatif stres apoptozisi indükleyen önemli faktörlerdir (Parlakpınar vd, 2004). Hücre içi veya hücre dışı mekanizmayla başlayan apoptotik süreç kaspaz adlı proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir. Kaspazlar, aspartik asitten sonraki peptid bağımlı kırıncı sistein proteazlarıdır. Hücrede inaktif olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler (Koçyiğit & Çevik, 2011). Cellat kaspaz olarak bilinen

kaspaz-3, başlatıcı kaspazlar olarak bilinen kaspaz-8, kaspaz-9 veya kaspaz-10 'dan biri ile aktifleşir (Eröz vd, 2012).

Kas hücreleri, iğ şeklinde veya ince uzun yapıdadır. Kas lifleri halinde bulunan kas hücreleri, kas dokuyu oluşturur (Başaran, 1999). Büyük çoğunluğu ekstremitelerde bulunduğu için çizgili kaslar travmaya çok açıktır (Sever, 2009).

Bu çalışmada ezilme tarzı kas hasarı oluşturulmuş ratlarda, hasar oluşturulduktan 24 saat sonra lokal olarak yapılan kemik iliği MKH uygulamasının, apoptosis belirteci olarak kaspaz-3 ve antioksidan enzimler olan SOD, CAT ve GSH-Px enzimlerinin üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmadan elde edilecek sonuçların, insanlarda deprem, trafik kazaları, iş kazaları, göçük gibi nedenlerle oluşabilecek kas hasarlarının kök hücre ile tedavi edilebilmesi noktasında da katkısı olabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

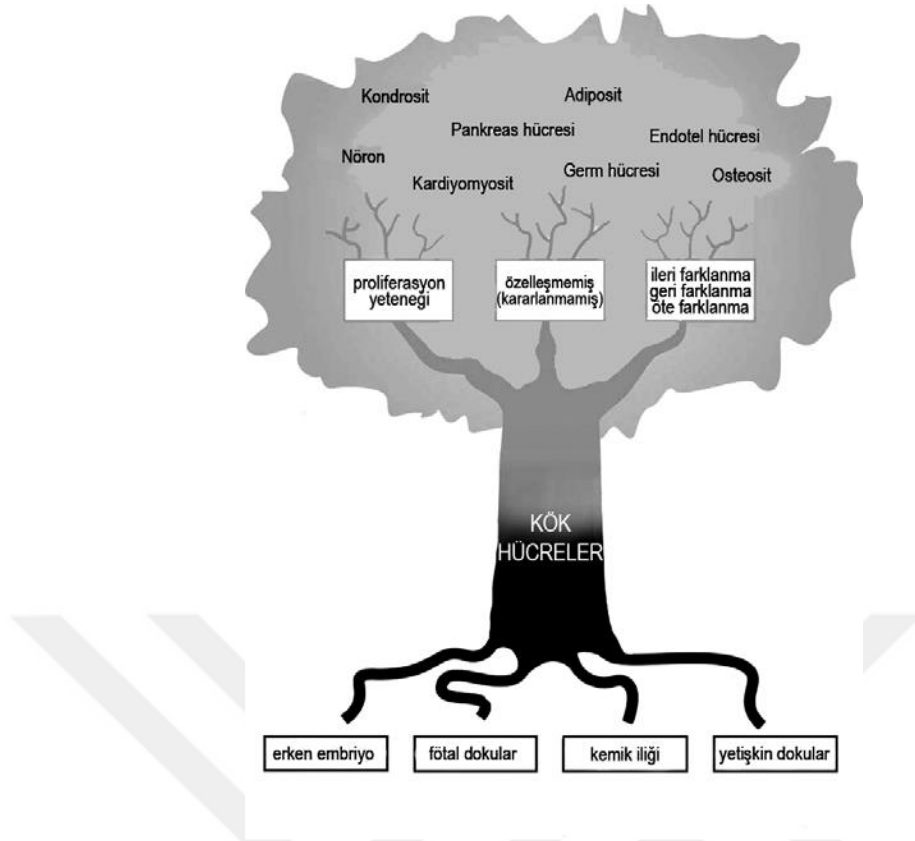
Kök hücre; işlevsel olarak henüz farklılaşmamış, çoğalma yeteneği olan, kendisini yenileyebilen, uygun büyüme ortamına yerleşerek farklı hücre tiplerine dönüşebilen, zedelenmeyi izleyen işlevsel doku tamiri yapabilen hücreler olarak tanımlanmıştır (Beksaç, 2010; Şahin vd, 2005).

Vücudumuzda bulunan hücrelerin belirli fonksiyonları vardır. Bu hücreler, bölündüklerinde kendilerine benzer hücreler oluştururlar. Kök hücrelerin ise bu hücreler gibi fonksiyonları yoktur. Genler ve dış uyaranlar gibi etkenlerle farklı hücre tiplerine dönüşebilirler. Vücudumuzdaki bir hücre grubunda hasar veya ölüm meydana geldiğinde, kök hücreler ihtiyaç olan hücrelere dönüşürler (Şahin vd, 2005).

Tuna (2009), kök hücreleri belirli dokuya veya organa özel karakteristikleri olan, olgun hücreye farklılaşan ve kendi-kendilerini yenileyebilen hücreler olarak tanımlamıştır. Karaşahin (2012) ise kök hücrelerin, farklılaşmamış, vücut veya laboratuvar ortamında uygun sinyallerle özelleşmiş hücre tiplerine dönüşebilen kendini yenileme özelliğine sahip olan hücreler olduğunu belirtmiştir. Kök hücreler, sayılarını devamlı sabit tutan ve farklılaşma yeteneğinde olan primitif nitelikte hücrelerdir (Kansu, 2005). Bir dokunun işlevsel olarak yeniden yapılandırılması özelliğine de sahiptirler (İnan &Özbilgin, 2009; Weisman, 2000).

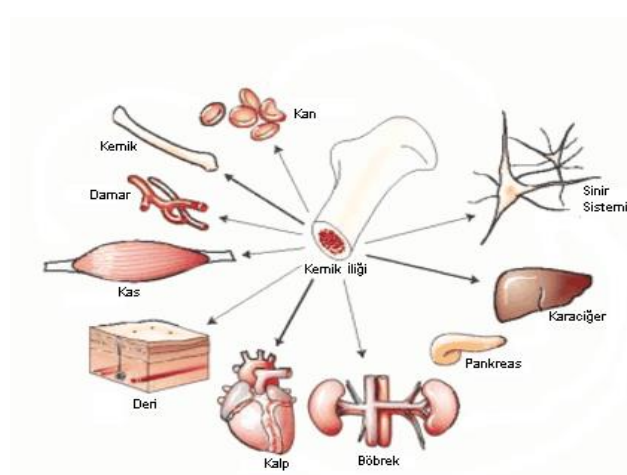
Kök hücrelerin birçok hücre tipine farklılaşabilmesine örnek olarak döllenen yumurta hücresi olan zigot verilebilir. Hematopoetik kök hücrelerin (HKH) kalp hücrelerine, kas hücrelerine, kemik hücrelerine dönüşebilmesi de farklılaşmaya örnek olarak verilebilir (Ural, 2006).

Can & Karahüseyinoğlu (2009), kök hücrelerin dört ana kaynaktan köken aldığını belirtmişlerdir. Bu kaynaklar erken embriyon dönemindeki blastosist, embriyonel yapraklar ve fetal dokular, kemik iliği ve diğer yetişkin dokulardır. Bu kaynaklardan köken alan kök hücrelerin buldukları zaman ve mekân koşulları içinde dakikalar, günler, aylar veya yıllar içinde çoğalarak bir başka hücreye farklılaşmak üzere değişim sinyallerine yanıt verdiklerini ve çeşitli düzenleyici mekanizmaların etkisi altında doku homeostazına yardımcı olduklarını belirtmişlerdir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Kök hücreler dört ana kaynaktan köken alırlar (Can & Karahüseyinoğlu, 2009)

Karaöz (2009), kemik iliği kök hücrelerinin *in vivo* ve *in vitro* koşullarda sadece kaynaklandıkları doku ve organların hücrelerine değil, diğer işlevsel vücut hücrelerine de dönüşebildiklerini belirtmiştir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşma ürünleri (Karaöz, 2009)

2.1.1. Farklılaşmalarına Göre Kök Hücre Çeşitleri

2.1.1.1. Totipotent kök hücre

Totus-Tam, bölünmemiş; *Potentia*-Güç anlamındadır. Yumurtanın spermle döllenmesi ile oluşan zigot, vücudun tüm hücrelerine dönüşebilme potansiyelinde olan ilk embriyonik hücredir. Zigot, amniyon kesesi ve plasenta gibi embriyo dışı dokulara da farklılaşma yeteneğine sahiptir. Totipotent hücreler, gelişme sırasında pluripotent hücrelere dönüşebilirler (İnan & Özbilgin, 2009). Şekil 2.3. de bir canlıyı oluşturabilecek ve bir çok hücre tipine farklılaşabilme yeteneğinde olan zigot gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Zigot totipotent kök hücredir (Anonymous, 2016a)

Totipotent kök hücreler, farklı yönlere gidebilme ve sınırsız farklılaşma özelliğine sahip hücrelerdir (Kansu, 2005). Her yönde farklılaşma yetkinliğinde olan bu hücreler embriyo, embriyo dışı zarlar ve organların kaynağı ile embriyo sonrası tüm doku ve organları oluşturan hücrelerdir (Anonim, 2004). Morula hücreleri, bir embriyonun oluşumunu sağlayamazlar ancak bir embriyonun her bölümünü teşkil edebildiklerinden totipotent olarak kabul edilirler (Elçin, 2009).

2.1.1.2. Pluripotent kök hücre

Pluripotent kök hücreler, işlev gören bir organizmayı oluşturamazlar ancak uygun ortam sağlandığında birçok hücre türüne dönüşebilme potansiyeline sahiptirler. Fertilizasyondan sonra, blastosist evresindeki embriyoda bulunan hücrelerdir (İnan & Özbilgin, 2009). Fertilizasyondan yaklaşık 5 gün sonra oluşan hücre kitlesine blastosist denir (Şahin vd, 2005). Blastosist; blastosöl, iç hücre kitlesi (İHK) ve trofoblastik hücreler olmak üzere 3 yapıdan oluşmuştur (İnan & Özbilgin, 2009). Şekil 2.4. de blastosistin üç bölgesi gösterilmiştir.

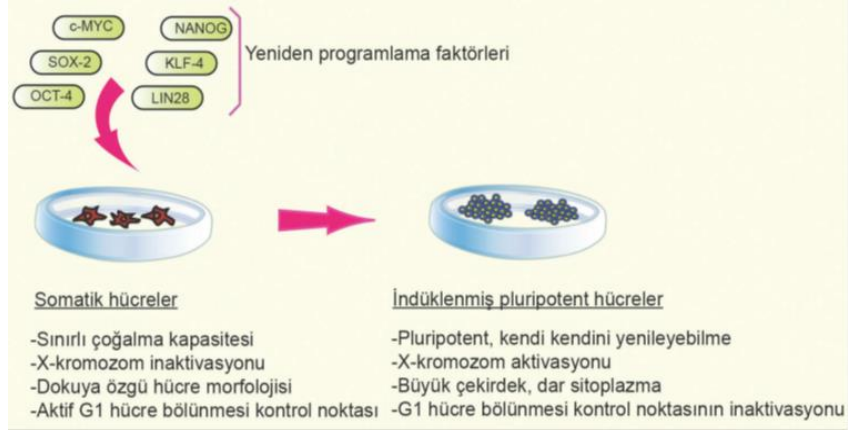


Şekil 2.4. Blastosist ve iç hücre kitlesi (Lonergan vd, 2007)

İHK' de bulunan hücreler tek başlarına bir organizmayı oluşturamazlar fakat vücuttaki tüm hücelere dönüşebilme yeteneğine sahiptirler. Bu hücreler pluripotent hücre olarak tanımlanır (Şahin vd, 2005). İHK 'de bulunan pluripotent hücreler tüm somatik hücrelerin ve dokuların kaynağıdır. Ancak plasenta, koryon gibi embriyo dışı zarları oluşturamazlar. Gelişmenin ikinci haftasında oluşan primordiyal germ hücreleri de pluripotenttir ve uygun şartlarda çeşitli hücre ve doku tiplerine farklılaşabilirler (Beksaç, 2010).

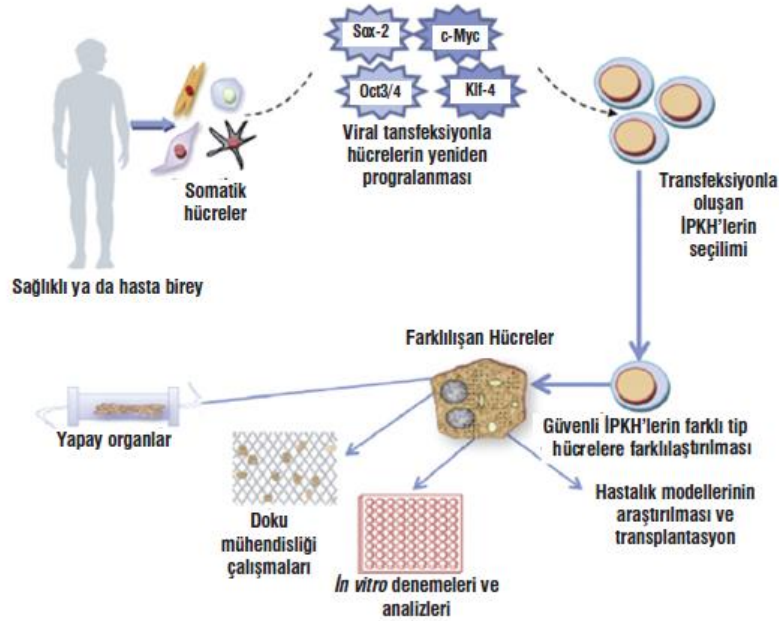
İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (İPKH), pluripotent özellik kazanmış somatik hücrelerdir (Sevim & Gürpınar, 2012).

Takahashi & Yamanaka (2006), fetal ve erişkin fare fibroblastlarına embriyonik özellik kazandırarak, pluripotent özellik faktörlerinin farklılaşmış hücre tiplerinin yeniden programlanmasında kullanılabileceğini göstermişlerdir.



Şekil 2.5. Somatik hücrelerin yeniden programlanarak pluripotent özellik kazanmaları (İskender & Canatan, 2013)

Hücrelerin yeniden programlanması; somatik hücre çekirdek aktarımı, hücre füzyonu, gen aktarımı gibi çeşitli yollarla somatik hücreye, pluripotent özellik sağlayan genlerin aktarılması ile olmaktadır (Sevim & Gürpınar, 2012). Sox-2, Oct-4, Klf-4, c-Myc, Lin 28 ve Nanog transkripsiyon faktörleri, somatik hücrelerin yeniden programlanmasında kullanılmaktadır (Şekil 2.5., Şekil 2.6.). Histon modifikasyonlarını değiştiren kimyasal maddeler ve hücrelerin bulunduğu kültür koşulları da pluripotent özelliğin kazanılması ve korunmasında önemlidir (İskender & Canatan, 2013).



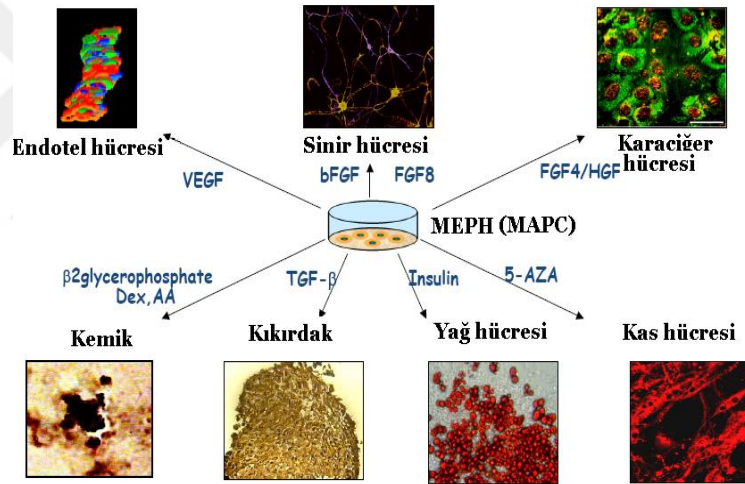
Şekil 2.6. İPKH'lerin kullanım alanları (Sevim & Gürpınar, 2012; Asgari vd, 2010)

2.1.1.3. Multipotent kök hücre

Multipotent hücreler, tek bir yönde farklılaşmak üzere programlanmış hücrelerdir. Sınırlı sayıda hücre tipine dönüşebilir ve özgün doku hücrelerini oluşturabilirler (Beksaç, 2010).

Multipotent hücreler, embriyonik gelişimin ileri evresine ait hücrelerdir. Kordon kanında ve erişkinlerde özellikle kemik iliği ve yağ dokusunda bulunan bu hücreler, özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler. Erişkin kök hücrelerinin, buldukları dokunun hücre tipini üretmesine örnek olarak multipotent bir kan hücresinin, özelleşmiş kan hücrelerine dönüşebilmesi verilebilir (İnan & Özbilgin, 2009).

Karaöz (2009), erişkin kök hücrelerinin, farklı kültür koşullarında multipotent farklılaşma potansiyelleri olduğunu belirtmiştir (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Multipotent erişkin öncül hücrelerinin farklı sinyal molekülleri ile gösterdikleri değişik yöndeki farklılaşmaları (MEPH; Multipotent Erişkin Progenitor Hücre) (Karaöz, 2009)

Blastomerler ve blastosist hücreleri birkaç embriyonik hücre tipini oluşturabilirler. Bu tip hücelere oligopotent hücre denir (Elçin, 2009). Sadece bir seriye ait hücreleri oluşturabilen kök hücelere de unipotent kök hücre denir (Beksaç, 2010). Çizelge 2.1' de kökenlerine farklılaşma etkinliklerine ve farklılaşma yönlerine göre kök hücre türleri gösterilmiştir (EKH: Embriyonik kök hücre, YKH: Yetişkin kök hücre).

Çizelge 2.1. Kökenlerine, farklılaşma etkinliklerine ve farklılaşma yönlerine göre kök hücre türleri (Can, 2009)

İsim	Hücre Tipi (Yerleşim)	Farklılaşma Etkinliği	Farklılaşma Yönü
EKH	Morula aşamasındaki hücreler	Totipotent	Embriyon ve embriyon dışı tabakalar
EKH	Blastosit aşamasındaki iç hücre kitlesi hücreleri	Pluripotent	Embriyon gövdesi (Tüm somatik ve germ hücreleri)
EKH	Gastrula aşamasındaki epiblast hücreleri	Pluripotent	Endoderm, mezoderm ve ekdoderm hücreleri
EKH	Endoderm, mezoderm ve ekdoderm hücreleri	Pluripotent	Tüm somatik hücreler
YKH	Özgün doku hücreleri	Multipotent	Bir veya daha fazla türde hücre (Ör. HKH)
YKH	Bir dokudaki yerleşik hücreler	Unipotent	Bir hücre tipi (Ör. Kas dokusundaki uydu hücreler)

2.1.2. Kök hücrelerin özellikleri

2.1.2.1. Farklılaşma

Farklılaşma, işlevsel olarak olgun bir hücre olma yolunda geçirilen bir dizi biyokimyasal ve fenotipik olaylar bütünüdür. Hücrelerin yenilenmesi veya doku onarımı, kök ve öncü hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasıyla başarılmaktadır (Can, 2014).

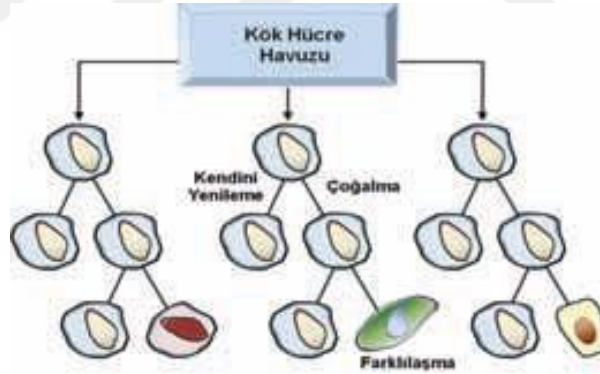
Kansu (2005), farklılaşmayı, kök hücrelerin gelişim süreçlerinde farklı işlevler ve görevler üstlenerek farklı yapı ve görüntüdeki hücrelerin ortaya çıkışı olarak tanımlamıştır. Farklılaşmanın, bir hücrenin bir başka hücreye dönüşümünü tanımlarken aslında bir gen ifadesi modelinden bir başka gen ifadesi modeline geçiş olduğu da belirtilmiştir (Can, 2014).

Farklılaşma aşamasındaki bir hücre, bir taraftan bölünmeyi durdururken bir taraftan da çevreden gelen sinyallere cevap vermeye hazırlanır. Bunun için enzim bağımlı yüzey ve hücre içi reseptörleri ve aktivasyon yollarıyla hücrede bazı olayların başlaması tetiklenir. Genellikle, farklılaşma süreci o hücrenin çoğalma süreci bittiğinde başlar. Bu nedenle her iki süreç aynı zamanda meydana gelmez. Hücre yeterli sayıya ulaştığında çoğalma ile ilgili hücre yüzeyi ve hücre içi yollar genellikle kapatıldıktan sonra farklılaşma ile ilgili mekanizmalar devreye girer (Can, 2009).

hücreleri ile kıyaslanacak seviyede olgunlaşır. *In vitro* farklanmanın diğer bir yolu, çeşitli vektörler kullanılarak genetik olarak yeniden programlamadır. Buna örnek olarak İPKH'ler verilebilir. Somatik hücrelerin çeşitli viral veya nonviral vektörler kullanarak, Oct /4, Sox2, klf4, c-Myc ve benzeri embriyon kök hücrelerine özgü genleri aktif hale getirerek geriye farklılaşma sağlanmaktadır (Can, 2009). Bir hücrenin köken aldıkları dokuların dışındaki dokulara ait hücelere dönüşebilme kapasitesi kök hücre plastisitesi olarak tanımlanmaktadır. Örnek olarak kemik iliği kökenli hücreler ve hematopoietik kök hücrelerin endotele, kas hücrelerine, kalp kasına ve hepatositlere dönüşmesi verilebilir (Şahin vd, 2005).

2.1.2.2. Kendini yenileme

Kendini yenileme özelliği, organizmanın yaşamı boyunca bir hücrenin kendi kopyasını alacak şekilde çoğalması ve gerektiğinde organ ve dokuya özgü öncü hücelere dönüşebilmesi anlamına gelir (Şekil 2.9). Kök hücreler asimetric hücre bölünmesi ile bir yandan öncü hücreye dönüşecek hücreyi üretirken bir yandan da kendi yedeğini oluştururlar (Can, 2009).



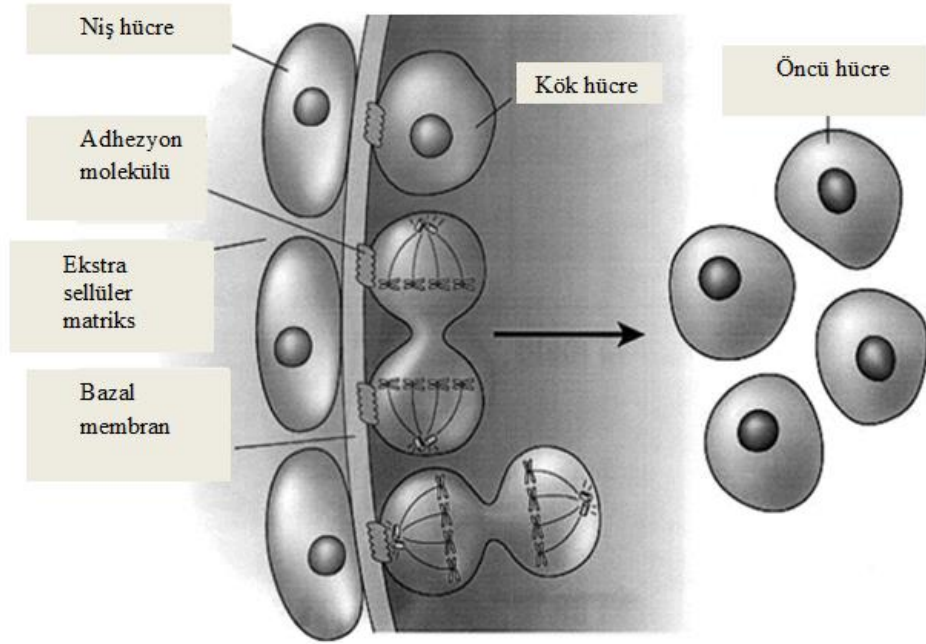
Şekil 2.9. Kök hücrelerin, kendini yenileme, çoğalma ve farklılaşma özellikleri (Elçin, 2009)

Kök hücre, kendi kopyasını üretebilme özelliğiyle de tanımlanır. Bu özellik çoğalma yeteneğinden farklıdır ve çoğalma farklılaşmayla beraber yürüyebilmektedir. Tamamen farklılaşmış hücreler kendini yenileyememekte ve normal şartlarda çoğalamamakta ancak belirli olgunlaşma aşamalarında kendini yenileme gerçekleştirebilmektedir (Elçin, 2009).

2.1.2.3. Niş

Karaöz (2009), hücrelerin farklılaşıp yaşamlarını devam ettirdikleri mikroçevreyi niş olarak tanımlamıştır. Kök hücrelerin doku hasarında harekete geçerek onarımda yer almasını ve sayılarının korunmasını doğrudan ya da dolaylı olarak kontrol eden mekanizmaların yer aldığı doku bölgesi kök hücre nişi olarak ifade edilmiştir (Can, 2014).

Kök hücrelerin, hücre dışı asimetrisi, hücrenin dışındaki niş tarafından yerine getirilir. Nişi oluşturan hücre dışı matriks bileşenleri, salgı proteinleri ve komşu hücrelerle kök hücre sayısını ve hücrenin bulunduğu durumu kontrol altında tutar. Örneğin; *Drosophila* ovaryumunda, kök hücrelerin bölünme eksenini niş tarafından belirlenir. Mitoz mekiği nişe dik olacak şekilde konumlanır (Şekil 2.10). Hücre bölündükten sonra hücrelerden birisi nişe yakın kalıp kök hücre özelliğini korurken diğeri ise niş ile olan ilişkisini kaybettiği için farklılaşmaya başlar (Can, 2009).



Şekil 2.10. Kök hücre ve nişi (Mollura vd, 2003)

Doğumun gerçekleşmesiyle HKH'ler kemik iliğinde yerleşik olarak görevlerini yaşam boyu sürdürürler. Hematopoetik kök hücrelerin kendilerini yenilemesi, hücre siklusunun G₀ evresinde sessiz olarak kalmaları, çoğalmaları, adezyonları, olgunlaşmaları, farklılaşmaya gitmeleri, kemik iliğinden ayrılıp dolaşıma girmeleri

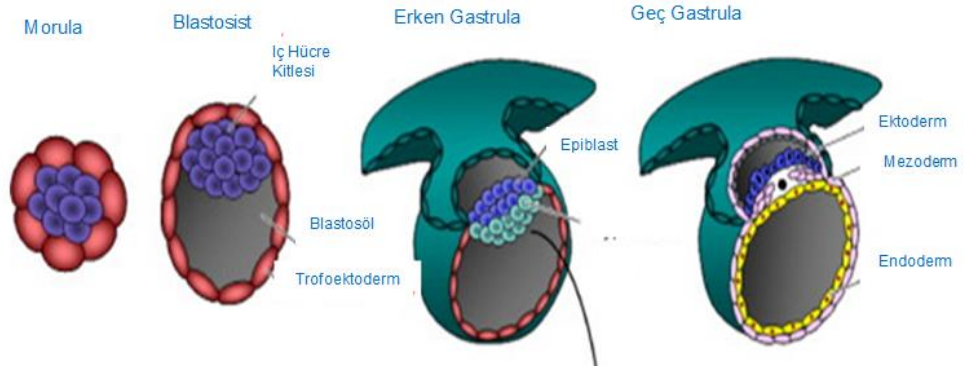
ile yerleşim gibi birçok karmaşık süreçler kemik iliğinde özel mikroçevrelerde sağlanır. Bu özelleşmiş mikroçevrelerde kemik iliğine özgül hücreler, stromal hücreler ve hücre dışı matris bileşenleri ile HKH arasında bazı faktörler, moleküller ve sinyaller aracılığıyla gerçekleşen etkileşimler vardır. Bu etkileşimler ile HKH'lerin fonksiyonlarını ve karakteristiklerini düzenleyen ve yetişkin hematopoezinin stabil düzeyde kalmasını sağlayan özelleşmiş mikro çevreler niş olarak adlandırılır (Çamurdanoğlu & Kansu, 2009).

Kök hücreler dokularda, kendilerine özgü, onların canlılığını ve gerektiğinde bölünmelerini destekleyen özel mikroçevreler olan yuvalarda beklerler (Beksaç, 2010). Nişin, farklılaşma mekanizmaları üzerine etkilerinin anlaşılmasından sonra, arzu edilen hücre çeşidinin mikroçevresini taklit etmeye yönelik girişimler artmıştır. Bu amaçla, kök ya da öncül hücreler çeşitli kimyasal kültür koşullarında arzulanan hücre çeşidinin mikroçevresinin özgün hücreleri, doku parçacıkları ya da hücre dışı matris elemanları ile ko-kültüre edilmiştir (Karaöz, 2009).

Köklülük terimi, kök hücreleri diğer hücrelerden ayırt eden hücresel ve moleküler özellikleri tanımlamak için kullanılır ve kök hücrelerin moleküler imzası olarak da bilinmektedir (Can, 2009).

2.1.3. Embriyonik kök hücreler

Sperm ile ovumun birleşmesi ile ortaya çıkan zigot tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir (Şahin vd, 2005). Embriyoda erken evrede bulunan totipotent kök hücreler embriyonik kök hücreler (EKH) olarak tanımlanır (Kansu, 2005). EKH'lerin diğer vücut hücrelerine göre yüksek bir çekirdek/sitoplazma hacim oranı bulunur. Çok belirgin bir pronükleus yapısı vardır (Karaşahin, 2012). EKH'ler, tüm fetal dokulara, erişkin kök hücrelerine ve bunların daha farklılaşmış öncülerine farklılaşabilirler. Bu hücreler, sınırsız kendi kendilerini yenileme kapasitesine sahiptirler (Ural, 2006). Blastosistin iç kısımdaki İHK'den elde edilen bu hücrelerin özel immünolojik ve mekanik yöntemler kullanılarak ayrıştırılması sonrasında özel besi yeri ve büyüme faktörü içeren ortamlarda inkübasyonu ile EKH'ler elde edilmektedirler (Karaşahin, 2012). İHK, vücuttaki bütün dokuların yanı sıra embriyon dışı endoderm, ektoderm, mezoderm ve amniyon gibi (Şekil 2.11.) dokulara da kaynaklık eder (Ural, 2006).



Şekil 2.11. İç hücre kitlesi ve gastrula evresi (Docherty vd, 2007)

EKH'ler, preimplantasyon embriyoda bulunan ve her üç germ tabakasını oluşturabilen kök hücrelerdir (Beksaç, 2010). EKH'lerin önemli bir özelliği de kanser hücrelerine benzer sürekli bölünebilmesi ve bu hücrelerden farklı olarak normal bir karyotip yapısına sahip olmalarıdır (Karaşahin, 2012).

2.1.4. Erişkin kök hücreleri

Erişkin kök hücreler, doğumdan sonra doku ve organların içinde kalan, yaşam boyunca kendini yenileyebilme kapasitesine sahip, farklılaşmış, multipotent hücrelerdir (Beksaç, 2010). Bu hücreler ihtiyaç halinde farklılaşma göstererek doku ve organların tamirini, yenilenmelerini ve yaşamlarını devam ettirmelerini sağlamaktadırlar (Çamurdanoğlu & Kansu, 2009).

Erişkin bireylerden elde edilen kök hücreler, embriyonal kök hücreler gibi birçok hücre tipine dönüşebilir (Kansu, 2005). Erişkin kök hücrelerin fizyolojik işlevi doku homeostasisini sağlamakla birlikte doku hasarından sonra rejenerasyonu da sağlamaktır. Bu hücreler fenotipik yüzey belirteçleri ile ayırt edilebilir (İnan & Özbilgin, 2009). Yetişkin bir insanın vücudunda az sayıda bulunurlar ve normal şartlar altında bölünmezler. Erişkinde kemik iliği, kalp, beyin, deri, böbrek, göz, gastrointestinal sistem, karaciğer, akciğer, pankreas, over, meme, prostat ve testis gibi organlarda tespit edilmiştir. Kendilerine ait bir mikroçevre içinde kısa veya uzun bir süre dinlenmede kalabilirler (Ural, 2006; Fuchs vd, 2004).

Erişkin kök hücreler, hastadan toplanabilmeleri ve bu nedenle istenmeyen immun yanıtlara yol açmamaları nedeniyle avantajlıdırlar (Şahin vd, 2005). Kişinin immun sistemine uyum gösterirler ancak tüm hücre tiplerine dönüşemedikleri için kullanımları sınırlıdır ve teratokarsinom oluşturmazlar (İnan & Özbilgin, 2009).

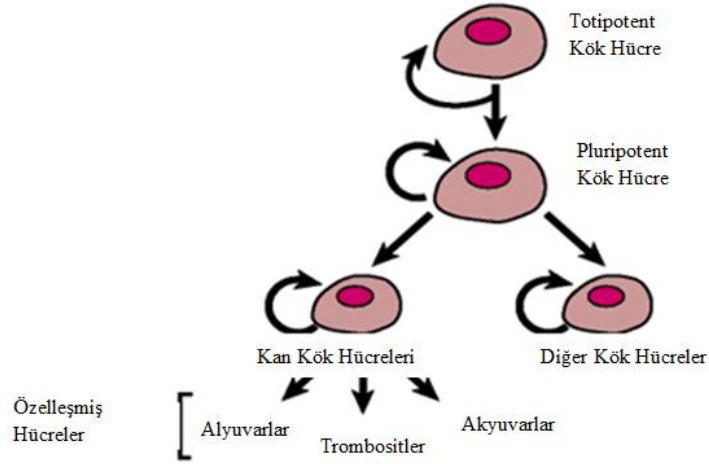
Organizmanın yaşamı boyunca sınırlı olmakla birlikte kendilerini yenileyebilme özelliğini korurlar. Erişkin dokulardaki öncü ve özelleşmiş hücrelere farklılaşma yeteneğindedirler ve elde edildikleri dokuya dönüşme potansiyelleri fazladır. Bu hücrelerin, vücut dışında embriyonik kök hücreler kadar uzun süre özelliklerini koruyarak çoğalma yetenekleri yoktur. Organizmada belirli birkaç hücre türüne dönüşebilen erişkin kök hücreler, laboratuvar koşullarında gerekli ortam ve sinyallerle birçok farklı hücre türüne dönüşebilmektedirler (İnan & Özbilgin, 2009).

2.1.5. Hematopoetik kök hücre

Hematopoetik sistem, özel fonksiyonları olan birçok hücreden oluşmaktadır. Bu hücrelerin bazıları doku ve kemiklerin yeniden şekillendirilmesinde ve ölü hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılmasında görev almaktadır. Kan hücrelerinin çoğunun yaşam süreleri kısadır ve devamlı olarak yenilenmeleri gerekmektedir. Bu üretimin devamlılığı HKH'ler ile sağlanmaktadır (Gülen, 2009). Erişkin kök hücrelerin en fazla bilineni ve kullanılanı, HKH'dir. Gelişmenin üçüncü haftasında, vitellus kesesi etrafında gelişen ilkel kan damarları içinde belirirler. Gelişimin çeşitli evrelerinde, fetal karaciğer, kemik iliği ve dalak ile timus da kan yapımına katılırlar. Erginde kemik iliğinde bulunurlar ve kan hücrelerinin bütün tiplerini, myeloid ve lenfoid hücreleri oluşturabilirler (Beksaç, 2010).

Periferik kan, kemik iliği, kordon kanı ve fetal karaciğerden elde edilebilirler. Yüzey belirteçleri başlıca, CD14, CD34, CD45 ve CD133'dür. Osteoblastik ve damarsal mikroçevre, HKH'nin çoğalma, farklılaşma, homing ve mobilizasyon gibi davranışlarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Dolaşımda bulunan kök hücreler, kemik iliği mikroçevresi ile temasa geçerek, endotel ve adezyon molekülleri aracılığı ile buraya yerleşirler. Sessiz dönemlerinden çıktıklarında, kök hücreler iç ve dış uyarıcı sinyallerin etkisi ile kendini yeniler ya da progenitör hücreye farklılaşırlar (İnan & Özbilgin, 2009).

HKH'ler kemik iliği, kordon kanı ve mobilize edilmiş periferik kan gibi hematopoetik dokularda bulunurlar. Kemik iliğindeki HKH'ler multipotent özelliktedir.



Şekil 2.12. Kök hücre ve hematopoez (Kansu, 2005; Anonim, 2004)

Eritrosit, monosit, makrofaj, nötrofil, eozinofil, bazofil, trombosit, dendritik hücreler, mast hücreleri, B ve T lenfosit gibi hücre tiplerini oluşturabilirler (Şekil 2.12.). Hematopoetik organlardan elde edilen kök hücrelerin, hematopoetik hücrelerden farklı olarak kıkırdak, kemik, kas, nöral hücreler, epitel hücreleri, pnömositler, deri, endotel, hepatositler gibi hücreleri oluşturma kapasiteleri vardır. Hematopoetik hücreleri oluşturan dokularda en az üç tane primitif progenitor kök hücre tipi tanımlanmıştır:

i) Hemanjioblast (HB): Hematopoetik ve kan damar endotel hücrelerinin öncülüdür.

ii) Mezankimal kök hücre (MKH): Mezodermal kökenli kas, kıkırdak, kemik, nöral hücreler adipositi oluşturur ve hematopoetik stromayı destekler.

iii) Multipotent erişkin progenitor hücreler (MEPH): Endodermal, mezodermal, ekdodermal kökenli hücrelerin çoğunu oluşturur (Ural, 2006).

Kemik iliğinde HKH'lerin farklı fonksiyonlarını düzenleyen, endotel niş ve vasküler niş olmak üzere birbirleriyle bağlantılı iki ayrı türde niş bulunur. Vasküler nişteki HKH sayısı endotel niştekinden daha fazladır. HKH'ler farklı koşullarda iki nişten birini kullanırlar. Vasküler nişteki HKH'ler ve hematopoetik progenitor hücreler daha olgun, çoğalabilen ve farklılaşmaya yatkın hücrelerdir. Endotel nişteki HKH'ler siklusun G₀ evresinde kendini yenileme yeteneğinde olan uykudaki primitif kök hücrelerdir (Çamurdanoğlu & Kansu, 2009).

2.1.6. Mezankimal kök hücre

Mezenkim terimi, epiblastın farklılaşmasından itibaren embriyonun gelişmesinde ve fetüsün yaşamasında önemli yer tutan, gevşek bağ dokusu yapısındaki dokuları ifade etmektedir. Birden fazla hücre serisine farklılaşabilen ve *in vitro* olarak çoğalabilen hücreler mezankimal kök hücre olarak tanımlanmıştır (Can, 2014). MKH, tüm dokularda destek hücreleri olan stromal hücrelerin kökenini oluşturur. Bu hücreler ilk kez, fetal buzağı serumu kullanılarak yapılan kemik iliği kültürlerinde gösterilmiştir (Fridenstein, 1976). Adhezyon yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğu ve bunların kemik ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip oldukları gösterilmiştir. Sonraki çalışmalarla, bu hücrelerin hematopoetik özellikte olmayan multipotent kök hücreler olduğu ortaya konmuştur. Önce CFU-F (Colony forming unit fibroblast) ve Kemik iliği stromal fibroblastları olarak adlandırılan bu hücreler daha sonra mezenkimal kök/ stromal hücre olarak tanımlanmışlardır (Çetinkaya, 2009).

Caplan (1991), MKH'yi, embriyoda kemik ve kartilaj oluşumu, erişkinde kemik ve kartilaj onarımı ile yenilenmesinde görevli az sayıdaki progenitör hücre olarak tanımlamıştır. MKH'ler, çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri olan çok yönelimli öncü hücrelerdir. Kemik iliğinden kolayca elde edilebilir ve *in vitro* olarak çoğaltılabilirler (Kozanoğlu, 2010). MKH, fetal ve yetişkin dokuların birçoğunda depo hücreler olarak bulunurlar (Can, 2010).

MKH'nin en belirgin özelliklerinden birisi, alıcıda inflamasyonu ve immünolojik yanıtları baskılamasıdır (Can & Karahüseyinoğlu, 2009). Kemik iliği dışında birçok dokudan MKH izole edilebilmektedir. Kemik dokusu, kas dokusu, diş pulpası ve maksillofasial dokular, karaciğer, lipoaspirasyon materyalleri, kordon kanı, kordon stroması, plasenta, amniyon sıvısı, sinovial sıvı, hatta periferik kandan da adhezyon özellikleri nedeniyle enzimatik yöntemlerle ayrıştırılarak çoğaltılabilmeleri mümkündür (Çetinkaya, 2009). MKH'ler, yetişkin omurgalı türlerinin iskelet dokusuna, kemik, kırıkta, ilik stroması ve yağ hücrelerine farklılaşır (Malgieri vd, 2010; Alhadlaq & Mao, 2003; Pittenger vd, 1999). MKH'lerin, mezoderm dışında endotel, nöroektoderm ve endoderm de dahil çeşitli hücrelerin karakterlerini de kazanabilecekleri bildirilmiştir (Şahin vd, 2005). Çizelge 2.2.'de MKH'lerin köken aldıkları dokular ve farklılaştırılmış hücre örnekleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. MKH'lerin köken aldıkları dokular ve farklılaştırılmış hücre örnekleri (Can & Karahüseyinoğlu, 2009)

Kaynak Doku	Farklandırılmış Hücre
Kemik İliği	Adiposit, Astrosit, Nöron, Kondrosit, Kardiyomyosit, Hepatosit, Mezangial hücre, Kas hücresi, Osteoblast, Çeşitli embriyon doku tipleri
Kas Dokusu	Adiposit, Miyofibril, Osteosit Endotel hücresi, Nöron Kondrosit, Osteosit
Spongiyoz Kemik	Adiposit, Kondrosit, Osteoblast
Dermis	Adiposit, Kondrosit, Kas hücresi, Osteoblast
Adipose	Kondrosit, Kas hücresi, Osteoblast
Periost	Kondrosit, Osteoblast
Perisit	Kondrosit, Osteoblast
Kan	Adiposit, Fibroblast, Osteoblast, Osteoklast
Sinovium	Adiposit, Kondrosit, Kas hücresi, Osteoblast
Amnion Sıvısı	Adiposit, Kondrosit
Göbek Kordonu Stroması	Adiposit, Kondrosit, Osteoblast, Kardiyomyosit, Nöron

MKH tanımlanması için, Uluslararası Hücresel Tedavi Birliği (ISCT) 3 kriter önermiştir.

1. Plastik hücre kültür ortamına yapışabilme özelliği,
2. *In vitro* koşullarda osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşabilme yeteneği,
3. CD73, CD90 ve CD 105 belirteçlerini %95'in üzerinde ve CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR belirteçlerini %2 den az oranda eksprese etmeleri gerekmektedir (Karaöz, 2010)

MKH'ler, kemik iliğinin stroması içinde yer alan uzantılı fibroblast benzeri multipotent hücrelerdir. Fibroblast, iskelet kası hücreleri gibi mezodermal hücreler ile mezodermal kökenli olmayan çeşitli hücre tiplerine farklılaştıkları gösterilmiştir (İnan & Özbilgin, 2009). Bölünen hücreler, özel ayırıcı fenotipik yollardan giderek sonuçta özel tip hücreleri oluştururlar. İç faktörler ve dış faktörler gelişmekte olan dokunun karakteristik fenotipini ve oranını kontrol eden her bir yolakla etkileşir (Caplan, 1991).

Vücutta MKH'lerin kökenine ilişkin üç farklı görüş ileri sürülmüştür.

1. MKH'lerin belli doku ve organlarda bulunabileceği ve gerektiğinde buradan dolaşıma katılarak farklı hücre gruplarına köken vermekte olduğu görüşüdür.
2. MKH'lerin benzer immünofenotipik, morfolojik ve işlevsel özelliklere sahip olduğu ve *in vitro* olarak karakterize edildiklerinde de benzer biçimde davrandığı görüşüdür.
3. MKH'lerin perivasküler hücreler ile gelişimsel ilişkisi olduğu görüşüdür (Can, 2010).

2.1.7. Kök hücre çalışmalarında başlıca gelişmeler

1950-1960'lı yıllarda Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün hayvanlarda fetal greftler ve kordon kanı greftleri ile çeşitli hastalıkların tedavisinde araştırmalar yapmıştır (Şahin vd, 2005).

Gurdon (1962), yaptığı çalışmada erişkin hücrelerin yeniden programlanarak pluripotent hücrelere dönüştürülebileceğini belirtmiştir.

1969 yılında Edwards vd (1969), tarafından insan ovumunun *in vitro* fertilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

1978 yılında, İngiltere'de İVF-ET yöntemi uygulanarak doğan ilk bebek Louise Brown olmuştur (İnan & Özbilgin, 2009).

1981 yılında Evans & Kaufman (1981), fare embriyonik kök hücrelerini elde etmişlerdir.

1997 yılında Wilmot & Campbell (1997), somatik çekirdek transferi ile ilk memeli türünün (Dolly) klonlanmasını gerçekleştirmişlerdir.

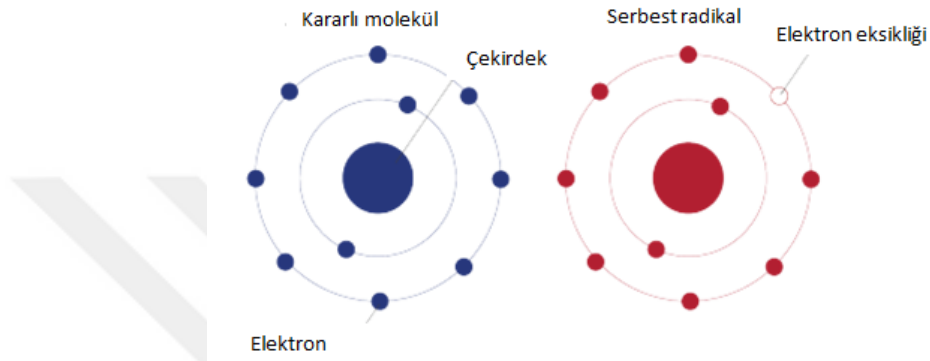
1998 yılında Thomson vd (1998), tarafından insan blastosistlerinden embriyonik kök hücre dizilerinin elde edilmiştir.

2006 yılında (Klimanskaya vd (2006), tek blastomerden insan embriyonik kök hücre dizilerinin elde etmişlerdir.

2006 yılında, Takahashi & Yamanaka (2006), yaptıkları araştırmada pluripotent özellik faktörlerinin farklılaşmış hücre tiplerinin yeniden programlanmasında kullanılabileceğini fetal ve erişkin fare fibroblastlarına embriyonik özellik kazandırarak göstermişlerdir.

2.2. Serbest Radikaller

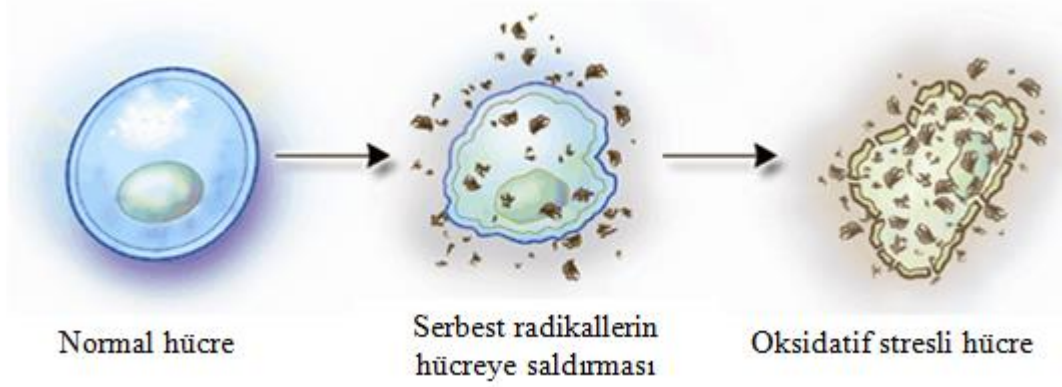
Serbest radikaller, dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğilimi olan kararsız atom veya moleküllerdir (Şekil 2.13.). Kimyasal olarak kararlı hale gelebilmek için de elektron almaya gereksinim duyarlar. Bu nedenlerle radikaller, reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir (Akyol, 2004; Gökpınar vd, 2006; Kılınç & Kılınç, 2002).



Şekil 2.13. Serbest radikal (Anonymus, 2015a)

Hücrelerde gerek enerji üretimi sırasındaki reaksiyonlarda gerekse metabolik reaksiyonlardaki oksijen tüketimi sırasında serbest radikaller meydana gelmektedir (Çakatay & Kayalı, 2006; Elmaksoud vd, 2015).

Serbest radikaller, bir moleküle saldırdığında o molekülün elektronunu alarak okside olur serbest radikal haline dönüşür. Bu radikaller hücre zarlarından elektron alarak eşlenir ve hücre zarına büyük hasar verirler (Gökpınar vd, 2006) (Şekil 2.14.). Hücre zar yapısını oluşturan fosfolipitler, glikolipitler, membran proteinleri serbest radikaller için çekici makromoleküllerdir (Akdoğan vd, 2000). Bu şekilde başlayan zincirleme reaksiyonlar dizisi, hücre zarını ve hücre yapısını bozarak canlı hücrenin zarar görmesine neden olur (Gökpınar vd, 2006).

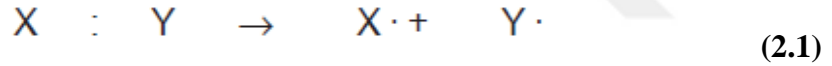


Şekil 2.14. Serbest radikallerin hücreye etkisi (Anonymus, 2015b)

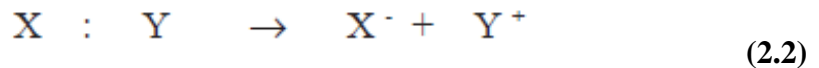
İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel ve kimyasal olaylar nedeniyle sürekli bir radikal yapımı gerçekleştiğinden hücresel koşullarda da ciddi miktarda ve çeşitlilikte radikaller üretilmektedir (Kılınç & Kılınç, 2002). Serbest radikaller, biyolojik sistemlerde elektron transferi ile oluştuklarından pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötr olabilirler (Altan vd, 2006).

Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir :

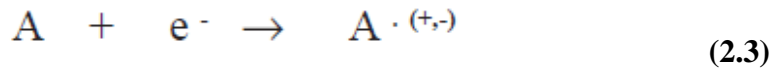
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı ile oluşur. Bölünmeden sonra her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır (2.1).



2. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar (2.2).



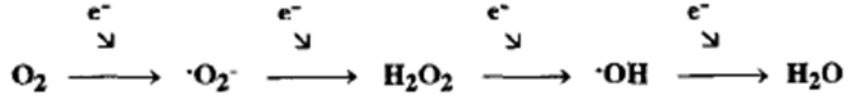
3. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar (2.3). Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır (Altan vd, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2001)



Serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden makrofaj, nötrofil gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da fazla üretimi hücre ölümü ve doku hasarı ile sonuçlanmaktadır (Altan vd, 2006; Halliwell & Gutteridge, 1992).

Bütün canlılar için vazgeçilmez bir element olan atmosferik oksijen, moleküler oksijen veya dioksijen olarak adlandırılır (Özcan vd, 2015). Hidrojen, karbon, nitrojen ve kükürt ile birlikte organik moleküllerin de temel yapısal atomunu

oluşturur. İnsan vücudunda bütün hücelere kolaylıkla girebilen ve kullanılabilme özelliğine sahip olan O₂, yapısı itibariyle radikal olmaya çok uygundur (Akyol, 2004). Oksijen, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle hayati bir öneme sahiptir (Kılınç & Kılınç, 2002) (Şekil 2.15.).



Şekil 2.15. Moleküler oksijenin indirgenmiş formları (Dreher & Junod, 1996)

Normal oksijenin az bir kısmı başta mitokondri olmak üzere hücrel kompartımanlardaki metabolizma sırasında indirgenerek ROT'lerine dönüşür (Özcan vd, 2015) (Çizelge 2.3.).

Çizelge 2.3. Hücrel koşullarda oluşabilen önemli oksijen radikalleri (Kılınç & Kılınç, 2002).

Tür	Adı
¹ O ₂	Singlet oksijen
O ₂ ^{-•}	Süperoksit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
•OH	Hidroksil radikali
ROO•	Peroksi radikali
ROOOH	Hidroperoksit
RO•	Alkoksi radikali
ROOR•	Endoperoksit
HO ₂ •	Hidroperoksi radikali

Hücre içi ROT'nin % 90'dan fazlası aerobik solunum reaksiyonları zincirinde mitokondrinin iç membranında üretilir (Wei & Pang, 2005). Ayrıca, iskemi-reperfüzyon, inflamasyon, radyasyon, yaşlanma, yüksek oksijen basıncı ve kimyasal ajanlara maruz kalma gibi nedenlere bağlı olarak da üretilirler (Özcan vd, 2015). ROT, düşük dozlarda çeşitli stres tepkilerinde arabulucu gibi rol oynarken, yüksek dozlarda hücrel zararlara da yol açar (Martin & Barret, 2002) (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2.4. Hücrelerde serbest radikal kaynakları (Aksoy, 2002)

<u>Endojen Kaynaklar</u>	<u>Ekzojen Kaynaklar</u>
Mitokondriyal elektron transport zinciri	Redoks siklus bileşikleri
Mikrozomal elektron transport zinciri	(ör, doksorubisin)
Oksidan enzimler	İlaç oksidasyonları
Ksantin oksidaz	(ör, parasetamol)
İndolamin dioksijenaz	Sigara
Galaktoz oksidaz	Güneş ışığı
Siklooksijenaz	Isı şoku
Lipoksijenaz	Okside glutatyon
Monoamin oksidaz	
Fagositik hücreler	
Nötrofiller	
Monositler ve makrofajlar	
Eozinofiller	
Endotelial hücreler	
Otooksidasyon reaksiyonları (ör, Fe ⁺²)	

Yaşla birlikte, kalp kası, çizgili kas, diyafram ve beyin hücrelerinde ki mitokondriyal DNA'da serbest oksijen radikali hasarı gelişir. Bu tip mitokondriyal solunum hasarları sadece normal dokularda değil Parkinson, Alzheimer, Huntington Chorea ve diğer yaşla artan hareket bozukluklarında da artmaktadır (Nalbant, 2006). Bir canlı türünün aerobik bir ortamda yaşayabilmesi için, oksijeni hiç metabolize etmese bile, oksijenden kaynaklanabilecek reaktif türleri inaktive edecek korunma mekanizmalarına sahip olması gerekir (Kılınç & Kılınç, 2002).

2.2.1. Serbest radikallerin vücutta üretim yerleri

1) Mitokondriyal elektron transport zinciri: Normal elektron akışı esnasında en son oluşan ürün sudur (2.4) (Akyol, 2004).



Mitokondriyal solunum zincirinde akan elektronların yaklaşık olarak %1-2'si toksik bir ürünü oluşturmak üzere sızıntıya uğrar. Elektronların elektron transport zincirinden kaçıp moleküler oksijenle direkt olarak reaksiyona girmesi süperoksit radikalini oluşturur (2.5) (Akyol, 2004).



Süperoksit radikallerinin üretimi ve salınımı, iç mitokondri membranından sitozolik tarafa doğru gerçekleşir. Mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) aktivitesinin oldukça yüksek olması ile mitokondrideki süperoksit düzeyi denge halinde tutulur. Sadece hidrojen peroksit, mitokondri membranından geçerek sitoplazmaya ulaşır.

2) Mikrozomal elektron transport zinciri: Endoplazmik retikulumda özellikle ksenobiyotikler ve diğer endojen maddelerin metabolizması esnasında yan ürün olarak serbest radikaller oluşur. Burada elektronların kaçak yaptığı en önemli yapı NADPH sitokrom P450 redüktaz enzimidir.

3) Karışık fonksiyonlu oksidazlar: Sitokrom oksidaz, amino asit oksidaz, ksantin oksidaz, monoamin oksidazlar en önemlileridir. Özellikle pürin katabolizmasının en son iki reaksiyonunu katalizleyen enzim olan ksantin oksidaz bazı özel durumlarda fazla miktarda O_2^- üretmektedir.

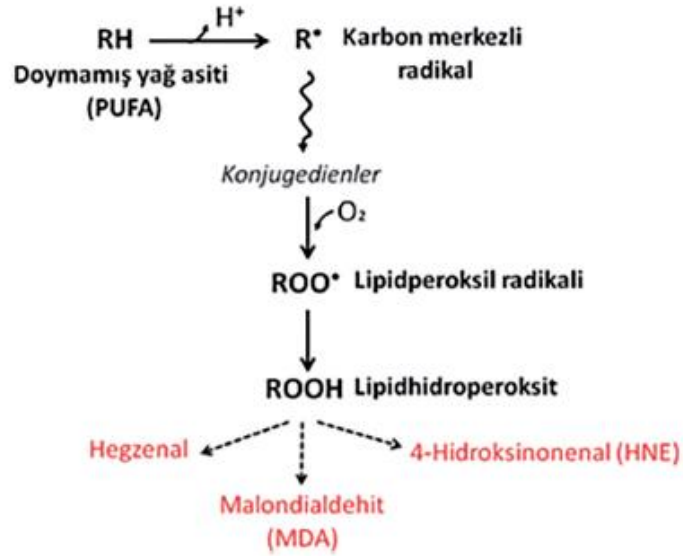
4) Solunum patlaması: Nötrofiller, fagositoz sırasında, zar ve sitoplazmalarında buldukları NADPH oksidaz ve myeloperoksidaz enzimleri ile serbest oksijen radikalleri ve aşırı okside edici HOCl gibi ajanları üreterek karşılaştıkları bakteri, virus, mantar gibi patojenleri yok ederler. Bu işlemler esnasında ana ürün ve ara ürün olarak çok fazla miktarda ROT oluşmaktadır.

5) Prostaglandinlerin sentezi: Prostaglandinlerin sentez edildiği lipooksijenaz ve siklooksijenaz ana metabolik yollarında farklı basamaklarda ROT üretilir.

6) Bazı küçük moleküllerin oto-oksidasyonu (hidrokinonlar, flavinler, antibiyotikler gibi) ROT oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

7) Kişilerin maruz kaldığı bazı eksojen ajanlar da vücutta ROT oluşumuna sebep olmaktadır. Stres, radyasyon, anti neoplastik ajanlar, bağışıklık yapan bazı maddeler, anestezik maddeler, pestisitler, aromatik hidrokarbonlar, sigara dumanı gibi serbest radikallerin eksojen kaynakları olarak da adlandırılır (Akyol, 2004).

ROT'leri, biyolojik zarlarda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinde (PUFA) oksidasyona yol açarak lipit peroksidasyonunu başlatırlar (Şekil 2.16.) (Özcan vd, 2015).



Şekil 2.16. Reaktif oksijen türlerine bağlı oluşan lipit peroksidasyon ürünleri (Özcan vd, 2015)

Vücutta serbest radikallerin oluşumu, katabolik reaksiyonlar, sağlıksız beslenme, yağlı diyetler, radyasyon, sigara, ilaç tedavileri, alkol tüketimi, böcek ilaçları ve çevre kirliliği gibi nedenlerle başlamakta ve artmaktadır. Serbest radikaller bağışıklık sistemini zayıflatarak çeşitli hastalıklara ve erken yaşlanmaya neden olurlar (Gökpınar vd, 2006).

2.2.2. Süperoksit radikali

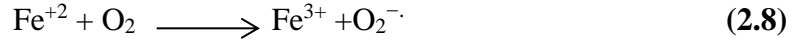
Süperoksit radikali (O_2^-), doğal oksijen molekülünün başka bir molekülden elektron almış halidir (Memişoğulları, 2005). Moleküler oksijen, birer elektronu eksik iki tane oksijen atomundan oluşur. Bu iki oksijen atomu denge halinde olduğundan bu haliyle oksijen reaktif değildir (Tamer vd, 2000). Moleküler oksijenin bir elektron transferi sonucu indirgenmesi ile kararsız bir yapı olan O_2^- radikali oluşur (2.6) (Çaylak, 2011).



Özellikle elektronca zengin bir ortam olan iç mitokondri zarında ve ksantin oksidaz gibi flavo enzimlerce endojen olarak oluşturulurlar (2.7) (Özcan vd, 2015)



İndirgenmiş geçiş metallere otoksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir (2.8) (Özcan vd, 2015; Valko vd, 2005).



Süperoksit radikali, mitokondriyal elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)'ın okside nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺)'e okside olmasıyla ve bir çok oksidaz tarafından üretilmektedir. Süperoksit radikalinin kendisi direkt olarak fazla zarar vermez fakat H₂O₂ kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olması önemlidir. Artmış süperoksit radikali düzeyleri, SOD enzimi ile hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürülerek azaltılır (Memişoğulları, 2005).

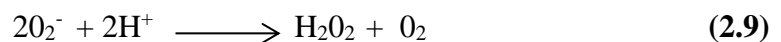
Süperoksit radikali enzimatik mekanizmalarla, devamlı olarak ve önemli derişimde üretilen radikal olduğu için temel radikallerden sayılabilir. Süperoksit radikali ve nitrik oksit, biyolojik sistemlerde diğer önemli radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler. Süperoksit radikali, özellikle hafif asidik koşullarda SOD olmadan kendiliğinden dismutasyonla da H₂O₂'e çevrilebilir (Kılınç & Kılınç, 2002).

Süperoksit radikali, başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir:

1. İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenir ve süperoksit radikali oluşur.
2. Birçok enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir.
3. Mitokondrideki tüketilen oksijenin %1-5 kadarı süperoksit radikali yapımı ile sonlanmaktadır.
4. Aktive edilen fagositik lökositler, bol miktarda süperoksit radikali üreterek fagozom içine ve buldukları ortama verirler (Kılınç & Kılınç, 2002).

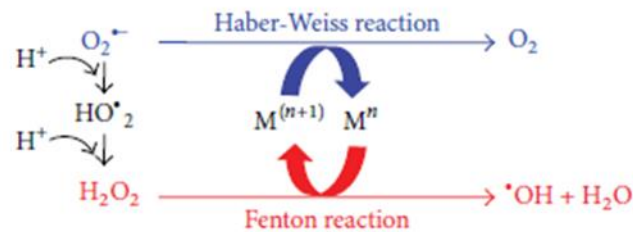
2.2.3. Hidrojen peroksit

Son derece etkili olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit radikali, bakırlı bir enzim olan SOD enzimi ile hidrojen peroksit (H₂O₂) ve oksijene çevrilir (Mercan, 2004) (2.9) (Valko vd, 2005).



Hidrojen peroksit, süperoksitlerin enzimatik/nonenzimatik dismutasyonu tepkimeleri ya da oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi sonucu oluşur (Kılınç & Kılınç, 2002). Hidrojen peroksit, serbest radikal olmadığı halde ROT kapsamına girer ve serbest radikal oluşumunda önemli rol oynar (Özcan vd, 2015). Çiftleşmemiş elektron içermediğinden radikal değildir (Halliwell & Gutteridge, 1984). Doğal oksijen molekülü, başka bir molekülden iki elektron almışsa peroksit oluşur. Peroksit molekülü, iki H molekülü ile birleştiğinde H₂O₂ oluşur. H₂O₂, ya süperoksit radikalinin SOD ile dismutasyonu sonucu ya da spontan olarak üretilmektedir (Memişoğulları, 2005). Ayrıca glikolat oksidaz ve D-amino asit oksidaz ile direkt olarak da meydana gelebilir (Çaylak, 2011; Valko vd, 2005).

H₂O₂, zarları geçen, sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidandır. Bu nedenlerle, süperoksit radikalinin ulaşamadığı zarla korunan yapılara rahatlıkla ulaşabilir. H₂O₂, serbest Fe⁺² ile reaksiyona girdiğinde demiri okside olurken hidroksil radikali oluşur. Bu da doku hipoksisi ve endotel hasarına yol açabilen vazodilatasyon kaybına sebep olur. H₂O₂, süperoksitle reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (Memişoğulları, 2005). Potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H₂O₂'in derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi, hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan CAT ve GSH-Px enzimleri yerine getirirler (Kılınç & Kılınç, 2002). Fe⁺² veya diğer geçiş metallerinin (Fenton reaksiyonu) ve süperoksit radikalinin varlığında (Haber-Weiss reaksiyonu) güçlü radikal olan hidroksil radikalini oluşturur (Özcan vd, 2015) (Şekil.2.17.).



Şekil 2.17. Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu (Ayala vd, 2014)

2.2.4. Hidroksil radikali

Hidroksil (OH \cdot), bilinen en reaktif radikaldır. Amino asitler, organik asitler, nükleik asitler, şeker ve fosfolipidler gibi biyokimyasal maddelerin bir çoğuyla reaksiyona girebilir. Bir elektronu eksik ve tek atom halinde olan oksijen ile H $^{+}$ 'in birleşmesi ile oluşur (Memişoğulları, 2005).

Hidroksil radikalının tepkimeleri başlıca:

- a) Elektron transfer tepkimeleri,
- b) Hidrojen çıkarma tepkimeleri,
- c) Katılma tepkimeleri

şeklinde gerçekleşir (Kılınç & Kılınç, 2002).

Hidroksil radikalının yarılanma ömrü 10 $^{-9}$ saniye olup oldukça kısadır ve ROT'ların en güçlüsüdür. Oluştığı yerde, tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton alarak yeni radikaller oluşturması sonucunda hücrede hasara neden olur (Özcan vd, 2015). Gamma radyasyona maruz kalan dokularda da hidroksil radikali oluşabilir. Alınan enerji hücre suyu tarafından absorbe edilerek sudaki oksijen-hidrojen kovalent bağının kırılmasına neden olur. Sonuçta hidrojen ve oksijenin dış orbitalinde tek elektron kalır ve iki radikal oluşur (2.10) (Memişoğulları, 2005).



Hidroksil, hücre bileşenleri ile de reaksiyona girer. Örneğin, aminoasit residülerini schiff bazı oluşturmak üzere okside eder. DNA molekülünün yapısındaki pürin ve pirimidin bazlarında kimyasal değişiklik ve kırılmalara neden olur. Hücre zarlarına etki ederek lipid peroksidasyonu denilen serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatır (Tamer vd, 2000).

2.2.5. Singlet oksijen

Singlet oksijen (O $2^{\cdot-}$), oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi ile oluşabilir. Süperoksit radikalının, nitrik oksit ile reaksiyonu ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir (Çaylak, 2011).

Süperoksit gruplarının hızlı bir şekilde oluşturduğu singlet oksijen, hücre zarlarının fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluşturur (Mercan, 2004).

Reaktivitesi çok yüksek olan singlet oksijen başlıca şu mekanizmalarla vücutta oluşabilir:

- a) Pigmentlerin oksijenli ortamda ışığı absorplamasıyla,
- b) Hidroperoksitlerin metaller varlığındaki yıkım tepkimelerinde,
- c) Kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında,
- d) Prostaglandin endoperoksit sentaz, bazı sitokrom p-450 tepkimelerinde, miyelo/ kloro/laktoperoksidaz enzimlerinin etkileri sırasında.

Singlet oksijen, diğer moleküllerle etkileşime girdiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları, singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini oluşturur ve hidroksil kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir (Kılınç & Kılınç, 2002).

2.2.6. Nitrik oksit

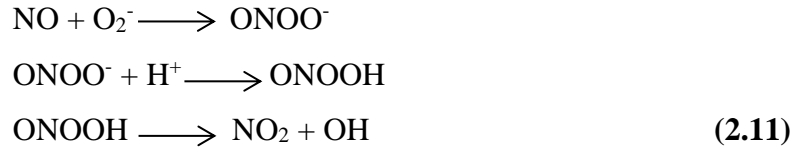
Bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır (Çaylak, 2011). Nitrik oksit (NO), yüksek yapılı canlılarda çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrojen merkezli bir radikaldir. Paylaşılmamış elektron, nitrojen atomuna ait olsa da, bu elektronun hem nitrojen hem de oksijen atomu üzerinde lokalize olmaması nedeniyle tam radikal özelliği taşımaz. Bu nedenle bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığından oldukça uzun ömürlüdür (Kılınç & Kılınç, 2002).

NO, nitrik oksid sentaz (NOS) olarak bilinen sitozolik bir enzimin aktivitesi ile oluşur. Oksijen bağlanan bölgeye kompetitif bağlanır ve direkt olarak sitokrom oksidazın inhibisyonu ile hücre sel solunumu düzenler. NO, bazı durumlarda bir antioksidan gibi davranır ve lipid peroksidasyonundan korur (Memişoğulları, 2005).

Vücuda giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sırasında oluşan NO dışında, endojen NO oluşturan tek kaynak NOS enzimleridir. Bu enzimin nöronal (nNOS), endotelial (eNOS) ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere üç formu bulunur.

Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksiti ortamdaki temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur (Kılınç & Kılınç, 2002).

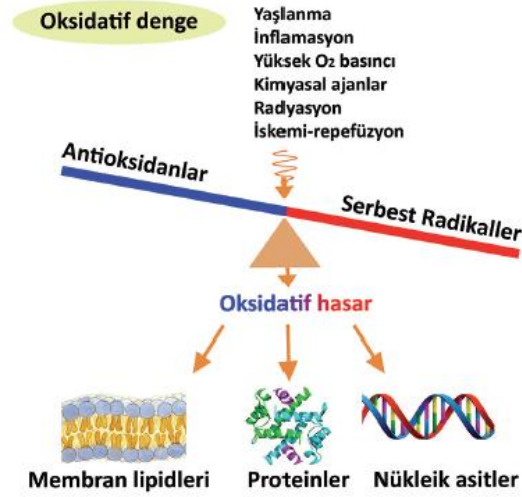
NO'nun vücuttaki ROT'leri ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) oluşturduğu ve dekompozisyonla da OH[•] radikali meydana getirdiği ifade edilmektedir (2.11) (Çaylak, 2011).



2.2.7. Oksidatif stres ve oksidatif hasar

Oksijenin metabolize edildiği canlılarda, önemli derişim ve çeşitlilikte radikal üretimi gerçekleşir (Kılınç & Kılınç, 2002). Serbest radikaller, küçük boyutları ve yüksek enerjileriyle hücrel makromolekülleri okside edebilirler. Çok sayıda hücrel komponentin kontrolsüz oksidasyonu oksidatif stres olarak adlandırıldığı gibi (Derviş, 2011) oksijen radikallerinin etkilerinin toplamı da oksidatif stres olarak tanımlanır (Kılınç & Kılınç, 2002). Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stres; normal fonksiyon gösteren hücrelerdeki moleküllerde enzimatik olmayan oksidatif hasarın birikimi ile oluşur (Çaylak, 2011). Oksidatif stres, hücrel metabolizma sırasında açığa çıkan ROT ile oluşan ve tüm aerobik hücrelerde görülebilen bir patolojik durumdur (Özcan vd, 2015).

Düşük derişimlerdeki reaktif türler, hücrelerin antioksidan sistemleri tarafından inaktive edildiklerinden önemli toksik etkilere neden olmazlar (Kılınç & Kılınç, 2002). Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içindedir ve bu duruma oksidatif denge denir. Oksidatif denge durumunda organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme olduğunda bu dengenin bozulmasına neden olur (Şekil 2.18.). Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği gösterir ve sonuçta doku hasarına yol açar (Altan vd, 2006).

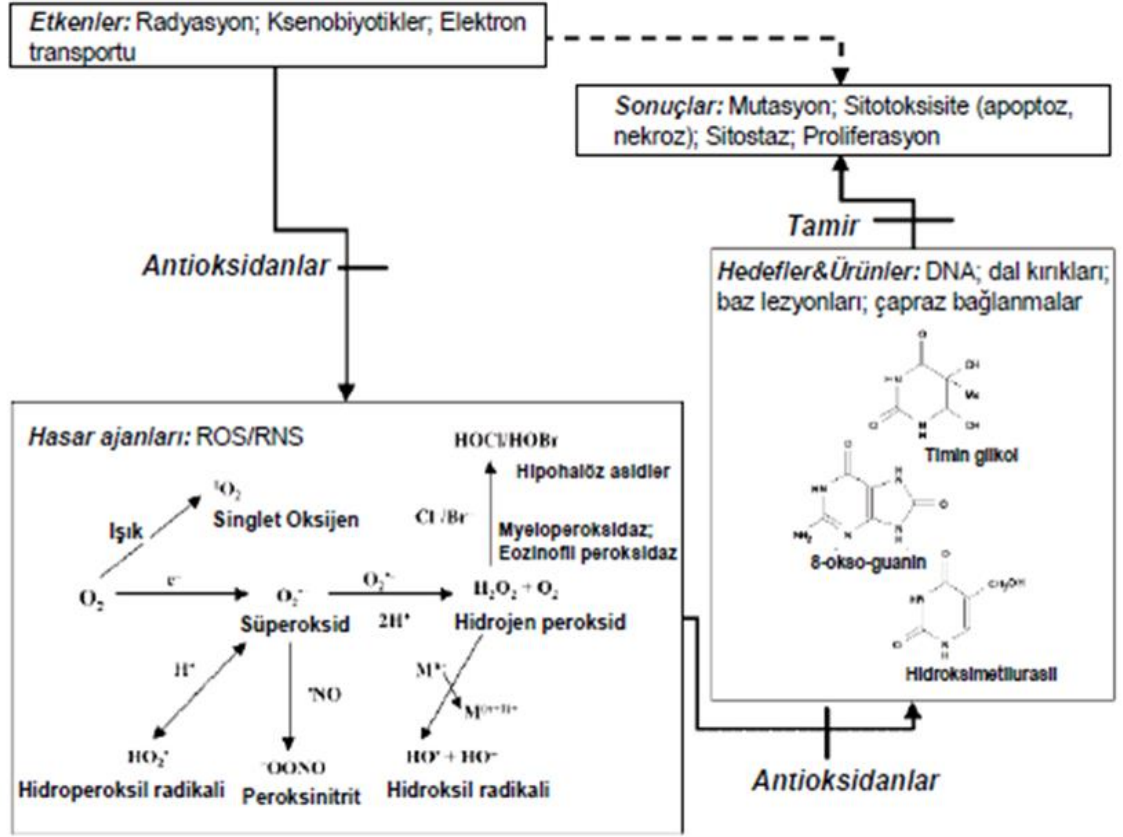


Şekil 2.18. Oksidatif dengenin bozulması (Özcan vd, 2015)

Oksidatif stresi, nitrik oksitin reaktif türlerinden kaynaklanan toksik etkilerden ayırmak mümkün olmadığından nitrozatif stresten de ayırmak mümkün değildir. Bu bakımdan, oksidatif hasar, süperoksitten kaynaklanan radikaller ile nitrik oksitin reaktif türlerinin neden olduğu hasarların bir toplamıdır (Kılınç & Kılınç, 2002).

Oksidatif stres; lipit peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna, DNA mutasyon ve kırıklarına, sitotoksik etkilere ve sinyal iletilerinde bozulmaya neden olabilir. Serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarının, yaşlanma süreci ve yaşlanmaya bağlı dejeneratif hastalıkların oluşumunda önemli rol oynadığına inanılmaktadır (Derviş, 2011).

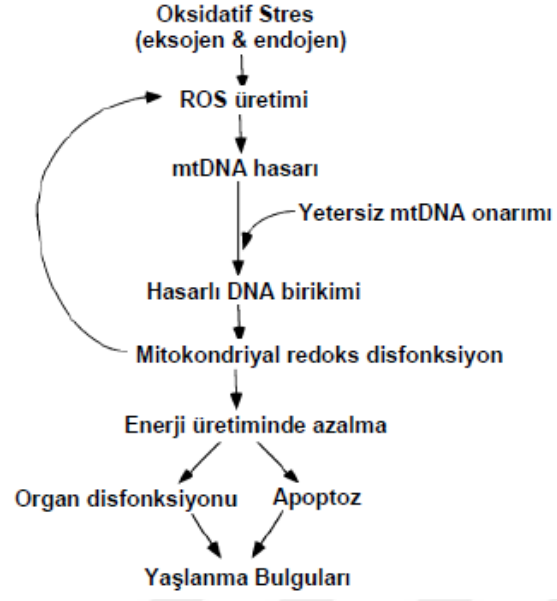
ROT oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açar (Şekil 2.19). Oksidatif hasara bağlı olarak DNA’da tek ve çift dal kırıkları, baz modifikasyonları veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir. Aerobik organizmaların mutasyonlardan korunması ve yaşamlarını devam ettirebilmeleri için DNA onarım enzimlerinin fonksiyonlarını doğru yapmaları gerekir. Düşük düzeylerdeki oksidatif DNA hasarı minimum hata ile onarılmaktadır. DNA onarım enzimleri ve DNA polimerazın oksidatif stres altında hasar görmesi replikasyon ve transkripsiyonun doğru yapılması olasılığını azaltır. Onarım tamamlanana kadar hücreler bölünmeyi durdurarak kendilerini korumaya alırlar. DNA’daki oksidatif hasar yüksek düzeylere ulaştığında apoptoz gerçekleşir (Burçak & Andican, 2004).



Şekil 2.19. Serbest radikaller ve oksidatif DNA hasarı (Burçak & Andican, 2004)

Oksidatif stres sonucu oluşan ROT, hücre içi proteinler üzerinde geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz oksidatif hasara yol açar. Hücre içi proteinler üzerine ROT etkisi ile protein karbonil türevleri oluşur. Bunlar, protein oksidasyonunun en yaygın kullanılan belirteçidir ve hastalıklar sonucunda oluşan oksidatif stresi değerlendirmede kullanılır. Sonuçta protein yapılı bileşiklerde yapı ve fonksiyon kaybı ortaya çıkar ve hücre hasarı oluşur. Protein karbonil gruplar lipid hasarı sonucunda oluşan aldehitlere göre daha uzun ömürlü olduklarından oksidatif hasarın hücrel göstergesi olarak tercih edilirler (Özcan vd, 2015).

Mitokondriyal DNA (mtDNA), koruyucu histonları olmadığı ve ROT'nin oluşum yeri olan iç membrana yakın olduğu için oksidasyona açıktır (Burçak & Andican, 2004) (Şekil 2.20.).



Şekil 2.20. Oksidatif mtDNA hasarı (Burçak & Andican, 2004).

2.3. Antioksidan Enzimler

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda okside edilebilen ve diğ er bir substratın oksidasyonunu azaltan, engelleyen, oksidasyona karşı mücadele eden maddelerdir (Çaylak, 2011). Derviş (2011), antioksidanları, serbest radikalleri hücrelere saldırmadan stabilize ve deaktive etme yeteneğ inde olan moleküller olarak tanımlamıştır.

ROT'nin oluşumunu ve bunların meydana getirdiğ i hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bu mekanizmalar antioksidan savunma sistemleri olarak adlandırılır (Altan vd, 2006). Antioksidanlar, hem direkt hem de dolaylı olarak ilaçların, ksenobiyotiklerin, karsinogenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir (Mercan, 2004). Sağlıklı hücreler, antioksidanları kullanarak serbest radikalleri ortadan kaldırırlar. Antioksidanların fonksiyonları, koruma, durdurma ve tamir olmak üzere üç kısımda toplanabilir (Aksoy, 2002).

Antioksidan savunma, komponentlerin enzimsel olup olmamasına göre;

- SOD, Katalaz, ve GSH-Px'in antioksidan aktivitelerini enzimatik antioksidan savunma,
- Glutasyon, tokoferol, ürik asit, askorbat, glikoz gibi maddelerle gerçekleştirilen deoksidasyon işlemlerini enzimatik olmayan savunma

olarak sınıflandırılmıştır (Dündar & Aslan, 2000) (Çizelge 2.5., Çizelge 2.6. ve Çizelge 2.7.).

Çizelge 2.5. Membran antioksidanları ve etkileri, (Dündar & Aslan, 2000)

Antioksidan	Etkileri
Vitamin E	Membran lipitlerinde çözünerek peroksidasyon zincirini kırar.
KoenzimQ	Mitokondriyel enerji metabolizmasında antioksidan olarak rol alır.
β -karoten	Radikal türleri toplar, singlet oksijen oluşumunu inhibe eder

Çizelge 2.6. Hücresel antioksidan enzimler ve reaksiyonları (Dündar & Aslan, 2000)

Antioksidan	Reaksiyonu
Süperoksit dismutaz	Süperoksidin giderilmesi reaksiyonlarında katalizör.
Glutasyon peroksidaz	H ₂ O ₂ 'nin düşük konsantrasyonlarının giderilmesinde katalizler.
Katalaz	H ₂ O ₂ 'nin yüksek konsantrasyonlarının giderilmesinde kullanılır.
Sitokrom oksidaz	Oksijen indirgenmesi sırasında reaktif tür oluşmasını önler.

Çizelge 2.7. Ekstraselüler antioksidanlar ve etkileri (Dündar & Aslan, 2000)

Antioksidan	Etkileri
Glikoz	Hidroksil radikali giderici antioksidan moleküldür.
Transferin	Serbest demir iyonlarını bağlayarak fenton reaksiyonunu inhibe eder.
Albumin	Hem proteini ve bakır metal iyonlarını bağlar.
Bilirubin	Önemli bir peroksil radikali toplayıcısıdır.
Askorbik asit	Hidroksil radikal giderici ve tokoferolü indirgeyici antioksidan vitamin
Hemopeksin	Ortamdaki serbest hem proteinlerini bağlayarak oksidasyonu inhibe eder.
Laktoferrin	Düşük pH'lı ortamlardaki demir iyonlarını bağlar
Serüloplazmin	Süperoksit radikalini nötralize eder, bakır iyonlarını bağlar.
Haptoglobinler	Hemoglobin bağlayarak hemin salınmasını önler.
Ürik asit	Genelde metal bağlayıcı olarak çalışırken değişik radikalleri de toplar

Antioksidanlar, oksidatif strese karşı etkilerini farklı şekilde gösterirler. α -tokoferol, zincirleme şekilde ilerleyen lipid peroksidasyonu gibi serbest radikal üreten basamaklara etki ederek reaksiyonları adeta kırar; glutasyon gibi antioksidan

moleküller direk olarak ROT konsantrasyonunu azaltırlar; süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimler serbest radikal üretimini başlatan ilk radikali etkisiz hale getirirler. Bazı maddeler de geçiş metalleri ile şelat oluşturarak etkilerini gösterirler. Tüm hayvansal ve bitkisel organizmalar, serbest radikallerin etkilerini önlemek için endojen antioksidan sistemlere sahiptirler (Çaylak, 2011).

Akyol (2004), insan vücudunda fizyolojik olarak veya anormal koşullara bağlı olarak patolojik şekilde üretilen serbest radikalleri her seviyede engelleyebilecek olan antioksidan sistemleri etki etme tiplerine göre;

- a- Baskılayıcı antioksidanlar (flavonoidler, vitaminler, trimetazidin, mannitol)
- b- Yok edici antioksidanlar (sitoplazma, mitokondri ve hücre dışı alanda görev yapan antioksidan enzimlerin hepsi)
- c- Zincir kırıcı antioksidanlar (aromatik aminler ve fenoller)
- d- Tamir etkisine sahip antioksidanlar olarak sınıflandırmıştır.

Özcan vd (2015), de antioksidanların etki mekanizmalarını;

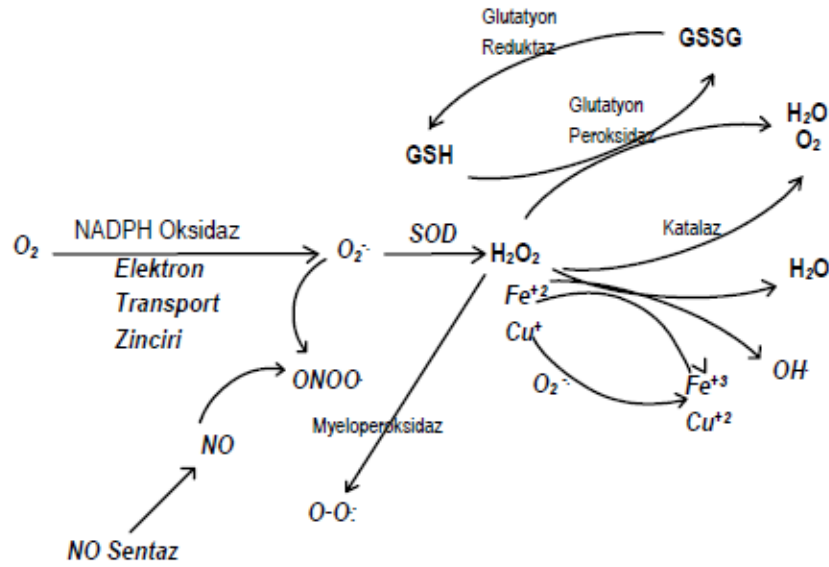
- a- Süperoksit veya hidrojen peroksit gibi anahtar role sahip reaktif oksijen türlerini daha zayıf moleküllere çevirmeleri veya ortamdan uzaklaştırmaları,
- b- Serbest radikallere bağlı oluşan hasarı onarıcı etkiler göstermeleri,
- c- Oksijeni ortamdan uzaklaştırmaları veya lokal olarak bulunduğu yerde konsantrasyonunu azaltmaları,
- d- Serbest radikal hasarına yol açan zincirleme reaksiyonların başlamasını engellemeleri,
- e- Katalitik metal iyonlarını ortamdan uzaklaştırmaları şeklinde belirtmişlerdir.

Antioksidanların oksidanları etkisiz hale getirme etkilerinin sınıflandırılmasını Gökpınar vd (2006) şu şekilde yapmışlardır:

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf olan bir moleküle dönüştürüp etkisizleştirilmesidir. Antioksidan enzimler bu yolla etki eder.
2. Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanlara bir hidrojen aktarılması ile inaktive edilmesidir. Vitaminler, flavanoidler bu şekilde etki eder.

3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, ağır mineraller ve serüloplazmin, oksidanları kendilerine bağlayarak inaktive eder.
4. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş olan biyomolekülü onarırlar.

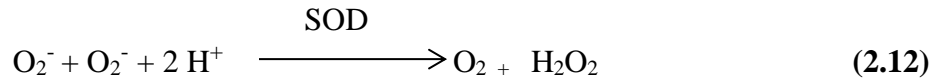
Antioksidan moleküller, endojen ve eksojen kaynaklı yapılardır. Oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı, hücre içi ve hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi savunma da ise serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı oluştururlar. Bu enzimler SOD, CAT, GSH-Px, glutatyon redüktaz, glutatyon- S-transferaz, sitokrom oksidazdır (Şekil 2.21). Çinko, bakır ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (Altan vd, 2006).



Şekil 2.21. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu (Memişoğulları, 2005; Wincent vd, 2004)

2.3.1. Süperoksit dismutaz (E.C.1.15.1.1.)

Mc Cord & Fridovich (1969), SOD'u yayımladıkları makalelerinde süperoksit radikallerinin dismutasyonunu katalizleyen enzim olarak tanımlamışlardır. Bu tepkime de dismutasyon tepkimesi olarak adlandırılmıştır (Kılınç & Kılınç, 2002). SOD, oksijenden oluşan ilk reaktif ürün olan süperoksit anyonunun moleküler oksijene ve daha az reaktif bir ürün olan hidrojen perokside dönüşümünü katalizler (Derviş, 2011). (2.12) (Finaud vd, 2006).



SOD bir süperoksit molekülünü O₂ molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksit molekülünü H₂O₂'e indirger (Memişoğulları, 2005). Bu dismutasyon reaksiyonu pH 4,8 de kendiliğinden de meydana gelirken fizyolojik şartlarda (pH 7,35- 7,45) çok daha yavaş oluşmaktadır. SOD enzimi varlığında ve pH en az 7,4 olduğu koşullarda bu reaksiyon 4 kat daha hızlı gerçekleşmektedir (Memişoğulları, 2005). Etkili hücre içi enzimatik antioksidanlardan olan (Derviş, 2011) SOD, endojen olarak üretilen ve organizmayı oluşturan her hücre için metal grubu taşıyan esansiyel bir enzimdir (Çaylak, 2011).

SOD, beş farklı formda bulunmaktadır.

- a- Mn- SOD, mitokondrilerde yer alır.
- b- CuZn-SOD, vücutta en fazla olup hücre de sitoplazmada bulunur.
- c- Fe-SOD, *E.Coli*, *Propionibacterium shermanii* ve *Bacteroides fragilis* bakterilerinde anaerobik ortamda Fe içeren, aerobik ortamda ise Mn içeren SOD enziminin kullanıldığı özel bir sistem şeklinde bulunmaktadır (Çaylak, 2011). Fe-SOD ökaryotlarda bulunmayıp prokaryotlarda bulunur (Akyol, 2004).
- d- Ni-SOD, *Streptomyces griseus* bakterinde tanımlanan nikel içeren, homotetramerik yapıya sahip bir izoenzimdir.
- e- Ekstraselüler SOD (EC-SOD), Marklund (1982) tarafından tanımlanmıştır ve CuZn- SOD'dan farklı olarak bakır ve çinko taşıyan salgısal SOD'dur (Çaylak, 2011).

İnsanlarda EC-SOD, hücre dışı boşluklarda süperoksit anyonlarının bir süpürücüsüdür. EC-SOD'un aktif EC-SOD ve inaktif EC-SOD olarak iki formu bulunur ve her biri özel bir disülfid köprüsü modeline sahiptirler (Petersen vd, 2003).

Yüksek katalitik aktiviteye sahip SOD enzimi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Çeşitli patolojik nedenlerle süperoksit yapımının artması durumunda, süperoksite özgül tepkimeler görülmeye başlar (Kılınç & Kılınç, 2002).

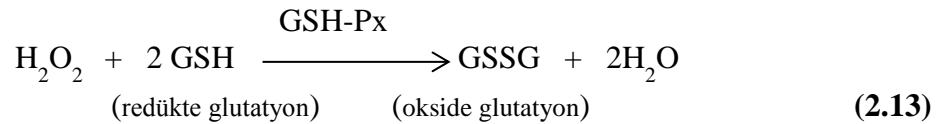
SOD, kollojen dokuyu süperoksit radikalının zararlı etkilerinden korur ve lipid peroksidasyonunu inhibe eder (Yegin & Mert, 2013). Kas hücrelerinde SOD aktivitesinin % 65-85'i sitozolde yapılıdır (Finaud vd, 2006).

2.3.2. Glutasyon peroksidaz (E.C.1.11.1.9.)

GSH-Px, H₂O₂'in detoksifikasyonu sağlar (Akyol, 2004). Her birinde selenosistein içeren 4 alt birimden oluşmaktadır. Membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur (Memişoğulları, 2005).

Lipit hidroperoksitler GSH-Px ile alkollere detoksifiye edilir. Glutasyon peroksidazın bir diğer tipi olan fosfolipit peroksidaz glutasyon peroksidaz, zar yapılarındaki fosfolipid peroksidazlar üzerinde etkilidir (Fang vd, 2002).

GSH-Px enzimi tarafından katalizlenen bu reaksiyonla glutasyon (GSH), hidrojen peroksit veya lipit peroksidazlarla reaksiyona girerken, kendisi başka bir glutasyon molekülü ile disülfid köprüsü oluşturarak GSSG formuna dönüşür (Öğüt vd, 2011). Böylece bu enzim GSH'ı yükseltgen iken H₂O₂'i de H₂O'ya çevirir (Memişoğulları, 2005). Fakat hücre içinde serbest radikallerin detoksifikasyonunun devam etmesi için GSSG formunun, GSH formuna geri dönmesi gereklidir. NADPH'nın kullanıldığı bir reaksiyonla ve glutasyon redüktaz enzimi katalizlemesiyle GSSG tekrar GSH formuna çevrilir (Öğüt vd, 2011) (2.13) (Finaud vd, 2006) (2.14) (Dansen & Wirtz, 2001).



GSH-Px, fosfolipaz enziminin etkisiyle zar fosfolipitlerinden ayrılan yağ asidi hidroperoksitleri ve hidrojen peroksidin zararlı etkilerini ortadan kaldırır. Bu enzimle birlikte eritrositlerin membran yapıları korunur ve hemolize karşı dayanıklılığı artar.

Hücre membran lipitlerinin yapısında bulunan doymamış yağ asitleri oksitlenmeden korunur ve membran dayanıklılığı sağlanır (Yegin & Mert, 2013).

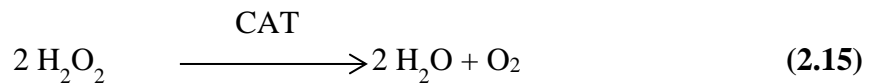
GSH-Px, vücutta bütün doku ve hücrelerde bulunur (Akyol, 2004). Glutasyon bağımlı peroksidazlar, peroksizom dahil hücre genelinde bulunurken (Dansen & Wirtz, 2001) sitoplazmada ve mitokondride daha yoğun olarak bulunur. Organlara göre farklılıklar gösterir örneğin beyindeki aktivitesi diğer bazı dokulara göre daha azdır (Akyol, 2004).

Hücre, doku ve organ sistemlerinin yapısal ve fonksiyonel olarak korunmasında önemli bir antioksidan olan GSH'ı koenzim olarak kullanır (Aksoy, 2002). Zarları E vitamini yetersizliğinde peroksidasyona karşı korur. Bunların yanında eritrositler de en kuvvetli antioksidandır (Memişoğulları, 2005). Aşırı oksidatif stres veya antioksidan potansiyelin yetersizliğinde oluşan oksidatif hasar sonucu GSH düzeyi azalır ve sonuçta serbest radikal harabiyetine bağlı olarak, patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır. GSH, yaşlanma, kanser, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde yer alması açısından önemlidir (Aksoy, 2002).

Selenyum, GSH-Px enziminin bir parçası olduğundan GSH-Px yetersizliği selenyum eksikliği sonucu olabilir (Memişoğulları, 2005). Hücre içi ortamın en önemli antioksidan molekülü olan GSH'ın antioksidan savunma sistemindeki görevinden başka aminoasitlerin transportu, ksenobiyotiklerin zehirsizleştirilmesi, proteinlerdeki sülfidril gruplarının redükte halde tutulması, bazı enzimatik reaksiyonlarda koenzim görevi görmesi gibi birçok fizyolojik fonksiyonu vardır (Birişik vd, 2011).

2.3.3. Katalaz (E.C. 1.11.1.6.)

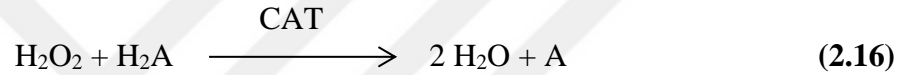
CAT, H₂O₂'in su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (2.15) (Derviş, 2011; Finaud vd, 2006).



Bu enzim, hücrenin sitoplazmasında ve endoplazmik retikulumda peroksizom ve mitokondrilere göre daha az yoğunlukta bulunur (Akyol, 2004). CAT, her birinde Fe⁺³ bulduran 4 hem grubundan oluşan bir hemoproteindir (Memişoğulları, 2005).

H₂O₂, CAT ve GSH-Px enzimleri ile temizlenir (Dansen & Wirtz, 2001). CAT ve GSH-Px enzimleri arasında fonksiyonel açıdan farklılık vardır. CAT, tek hücrelilerden, gelişmiş bitkilere ve hayvanlara kadar peroksizomların yapısında bulunur. Peroksizomlarda, D-amino oksidaz, urat oksidaz gibi enzimlerin ürettiği H₂O₂'i temizleyen katalaz organizmayı otokatalitik süreçten korur. CAT, yüksek H₂O₂ konsantrasyonlarında etkilidir. GSH-Px, sitoplazma ve mitokondride üretilen organik hidroperoksitleri ve H₂O₂'i temizler (Nalçaçı, 1994). GSH-Px'in, H₂O₂'e karşı K_m'i katalaza göre daha düşüktür. Düşük konsantrasyonlarda H₂O₂'i GSH-Px parçalar, yüksek konsantrasyonlarda ise CAT aktivite kazanır (Memişoğulları, 2005).

CAT, ayrıca bazı toksik maddelerin detoksifikasyonunu bir reaksiyon üzerinden yapabilir. Bu reaksiyonun fenol, alkol ve formik asit gibi bir substrata (A) ihtiyacı vardır (2.16) (Finaud vd, 2006).



CAT aktivitesi, eritrosit, karaciğer ve böbrekte yoğundur (Memişoğulları, 2005). Beyindeki aktivitesi, özgül aktivite olarak diğer birçok dokuya göre azdır. (Akyol, 2004) (Çizelge 2.8.).

Çizelge 2.8. Antioksidan enzimlerin reaksiyonları (Dansen & Wirtz, 2001)

Enzim	Substrat	Reaksiyon	Lokalizasyon
Katalaz	Hidrojen peroksit, hidroperoksit + H verici	2H ₂ O ₂ → 2H ₂ O + O ₂ ROOH+AH ₂ → ROH+A+H ₂ O	Peroksizom
Glutasyon peroksidaz	Hidrojen peroksit, hidroperoksit	ROOH+GSH→ROH+GSSG+ H ₂ O	Hücrenin her tarafında
MnSOD	Süperoksit anyon	2O ⁻ +2H ⁺ → H ₂ O ₂ + O ₂	Mitokondri Peroksizom
Cu,ZnSOD	Süperoksit anyon	2O ⁻ +2H ⁺ → H ₂ O ₂ + O ₂	Sitozol, peroksizom

2.4. Apoptozis

Apoptozis, ağaçlardan yaprakların dökülmesi anlamında latince bir kelime olup (Baykal vd, 1998) terim olarak Kerr vd (1972), hücre ölümünün morfolojik tanımında kullanmışlardır. Normal fizyolojik şartlarda, hasarlı veya yaşlı hücreler, genetik olarak düzenlenen hücre ölüm programı olan apoptozis ile kendi kendilerini öldürmektedirler (Aktuğ, 2014). Apoptozis, gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür (Koçyiğit & Çevik, 2011). Apoptozis, canlının kendi otonom mekanizması ile istenmeyen hücrelerini, yaşlanmış ve zararlı hücreleri, bakterileri, otoreaktif virüslerle enfekte olmuş hücrelerin enerji kullanılarak, zamana endekli, iz bırakmadan öldürülmesidir (Gültekin vd, 2008).

Nalbant (2006), programlanmış hücre ölümü ile apoptozisin birbirinin yerine kullanılmasına rağmen aynı şeyi ifade etmediğini, programlanmış hücre ölümünün gelişimsel bir olay iken apoptozun hücre ölüm modellerinden biri olduğunu belirtmiştir. İntrauterin gelişim sırasında el ve ayak parmaklarının arası başlangıçta kapalı iken parmaklar arasındaki hücrelerin apoptoz ile yıkılması ile parmaklar birbirlerinden ayrılmaktadır (Öztürk, 2002).

Hücresinin yaşamını bölünmeden sürdürmesi, çoğalması ya da ölmesi seçeneklerinden hangisinin gerçekleşeceğini belirleyen temel etmenler vardır. Bunlar; büyüme faktörleri, besin maddeleri ve hücre dışından gelen ve hücredeki reseptörler aracılığıyla hücreye iletilen ölüm sinyallerinin varlığı ya da yokluğudur. Hücresinin hasar görmesi ya da DNA yapısının bozulması da ölüm-yaşam kararının verilmesinde belirleyici rol oynar (Koçyiğit & Çevik, 2011).

DNA hasarı ve oksidatif stres apoptozisi indükleyen önemli faktörlerdir (Parlakpınar vd, 2004). Apoptozis normal hücre turnoverı, normal gelişim, hormon bağımlı atrofi, immun sistem fonksiyonu, embriyonik gelişim ve kimyasal olarak uyarılmış hücre ölümünü içerir. Apoptozis, ya hastalık ve zararlı ajanlar tarafından hücreler zarar gördüğünde ya da immun reaksiyonlar gibi bir savunma mekanizması olarak da oluşabilir. Uygun olmayan apoptozis otoimmun hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, iskemik zarar ve bir çok kanser tipine neden olmaktadır (Eröz vd, 2012) (Çizelge 2.9.)

Çizelge 2.9. İnsanlarda apoptozisin izlendiği durumlar (Öztürk, 2002)

İnsan Organizmasında Apoptozun İzlendiği Durumlar	
-	Embriyonal ve fetal gelişimde
-	Hormon azalmasına bağlı involusyonlarda
-	Dokulardaki hücre homeostazının sağlanmasında
-	İmmun reaksiyonlarda, defansif olarak
-	Hücrelerin herhangi bir nedenle hasarlanmaları durumunda
-	Yaşlılıkta

Ökaryotik hücrelerde şimdiye kadar morfolojik ve biyokimyasal analizlerle ayırt edilmiş iki tip hücre ölümü belirlenmiştir. Bunlar; patolojik hücre ölümleri olan nekroz ve fizyolojik programlanmış hücre ölümleri olan apoptozisdir (Çalışkan, 2000). Nekroz, rastlantısal bir son olmasına karşın apoptozis genetik kontrollü bir sonudur (Nalbant, 2006). Apoptozis ve nekroz arasında belirgin farklılıklar vardır. Nekroz, patojik bir ölüm şekli olup kimyasal ve fiziksel yaralanmaları takiben ortaya çıkar. Mitokondri ve sitoplazmik organeller hasarlanır, hücre zarı seçici geçirgenliğini kaybeder ve şişerek parçalanır. Apoptotik hücrede ise nekrozun aksine değişiklik çekirdekte meydana gelir (Parlakpınar vd, 2004), (Çizelge 2.10.).

Çizelge 2.10. Apoptozis ve nekrozun farkları (Aktuğ, 2014).

	Apoptozis	Nekroz
Nedenleri	Büyüme faktörlerinin eksikliği Hormonal etkiler Hafif toksik etkiler	Anoksi Fiziksel hasar Kimyasal hasar
Görülen ilk hücresel değişiklik	Büzülme Kıvrılma	Şişme
Çekirdekteki değişiklikler	Yoğunlaşma Segmentasyon DNA fragmentasyonu	-
Hücre zarındaki değişiklikler	Yüzeysel uzantılar Fosfatidilserin dağılımında ortaya çıkan değişiklikler	Düzensizleşme Liziz
Mitokondrial değişiklikler	-	Şişme
Metabolik değişiklikler	Gen ekspresyonunda aktif değişiklik Aktif protein sentezi Proteaz aktivasyonu	-

Apoptotik süreç, nekrotik süreçten farklı işlemekte olup zarın sağlam olduğu bu süreçte başta hücre morfolojisi olmak üzere gösterdiği etkiler ayrıdır (Aktuğ, 2014). Hücre küçülür ve yüzeyinde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Sitoplazmada

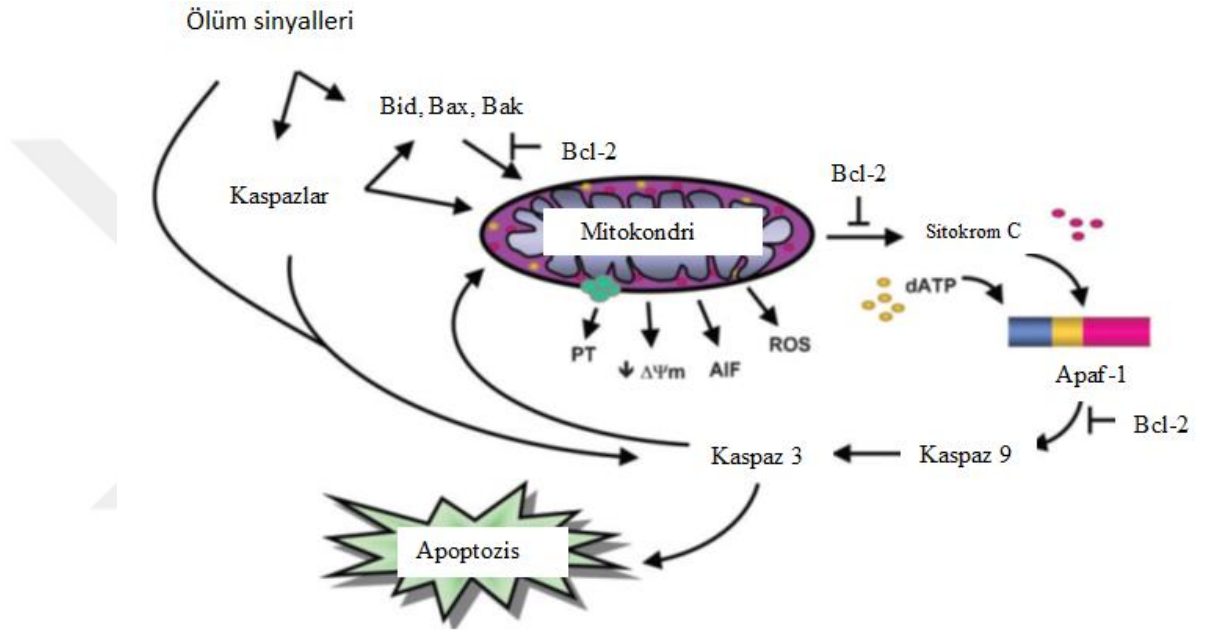
yoğunlaşma ve çekirdek membranına yakın bölgelerden başlayarak kromatinde yoğunlaşma görülür. En sonunda da DNA kırılmaları başlar (Parlakpınar vd, 2004). Martin & Barret (2002), apoptoziste reaktif oksijen türlerinin etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Mitokondriyal oksidatif stres, yaşlanma olayında apoptozisin intrinsik yolunun aktivasyonunda önemli rol oynar. Mitokondriyal GSH'un oksidasyonu hücreleri apoptozise yatkın hale getirmektedir (Burçak & Andican, 2004).

Parlakpınar vd (2004),

- 1- Bazı sağlam hücre tiplerinde fizyolojik olarak yaşlanma ile apoptozisin arttığını
- 2- Bölünmeyen hücrelerde uzun süreli oksidatif stres sonucu apoptozis arttığı ve oluşan hücre kaybının vücut fonksiyonlarında azalmaya neden olduğunu,
- 3- Bölünen hücrelerde fonksiyon dışı hücrelerin apoptozis ile elimine edilerek homeostazisin sağlanmaya çalışıldığını,
- 4- Genetik hasarlı preneoplastik hücrelerde apoptozisin yaşlanma ile baskılandığını,
- 5- Yaşla indüklenen apoptozisin Fas reseptör/ligand upregülasyonu ile ilişkili olabileceğini,
- 6- Apoptozisin, yaşlanmada ve kanser oluşumunda önemli rol oynayacağı sonuçlarını ortaya çıkarmışlardır.

Apoptozis sürecinde Bax Yolağı ve Fas Yolağı etkindir. Bu iki yolağında son noktası kaspazların aktivasyonudur. APO-1 veya CD95 olarak da bilinen Fas tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesinden bir hücre zar proteinidir. Fas yolağında parakrin ya da otokrin olarak üretilen bir fas ligandı fas reseptörüne bağlanır ve kaspaz 8'i aktive edecek olan adaptör proteinlerin eşleşmesini yapar. Kaspaz 8 hücre yıkımını başlatmak için diğer kaspazları aktifleştirir (Aktuğ, 2014). Fas ligand/reseptörü farklı durumlara cevap olarak uyarılabilir. Örneğin insan hepatosit hücrelerinde aşırı bakır birikimi oksidatif stresi oluşturur ve Fas ligand/ reseptör ekspresyonu da hepatositlerde apoptozisi artırır (Parlakpınar vd, 2004). Bax yolağında ise bax kanal proteini mitokondri zarına girerek kaspaz aktivatörü olan sitokrom c kaçmasını kolaylaştırarak diğer kaspazların aktivasyonunu sağlar ve hücre yıkımını gerçekleştirir (Aktuğ, 2014).

İç sinyallerle oluşan apoptozisde mitokondri önemli rol oynamaktadır. Hücrenin içinden kaynaklanan apoptotik sinyaller Apaf 1'in (Apoptotic Protease Activating Factor1) mitokondriden ayrılmasına neden olur ve dış mitokondri zarının geçirgenliğini artırır. Geçirgenliğin artması, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan sitokrom c'nin sitozole çıkmasına neden olur. Sitokrom c sitoplazmada apaf 1, kaspaz 9 ve ATP ile birleşir. Oluşan bu yapıya apoptozom denir. Apoptozom sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz 3' ü aktive ederek apoptozisa (Şekil 2.22) neden olur (Öztürk, 2002).



Şekil 2.22. Klasik apoptozis yolu (Alimonti vd, 2003)

Kaya vd, (2012) apoptozisi düzenleyen proteinleri,

a. Anti-apoptotik düzenleyiciler: Bcl-2, Bcl-w, BclxL, Mcl-1, CED-9, c-Abl, Rb gibi.

b. Pro- apoptotik düzenleyiciler: Bax, , p 53, Bcl-xS, Bad, Bakc-Fos, c-Jun gibi iki sınıfa ayırmışlardır. Bu proteinlerin aileleri Bcl-2 ailesi olarak tanımlanmış olup hepsi tek geçişli transmembran proteinlerdir. Memeli hücrelerinde Bcl-2 ailesinden 6 proteinin apoptozisi engellediği, 9 proteinin ise apoptozise katkıda bulunduğu belirlenmiştir (Kaya vd, 2012).

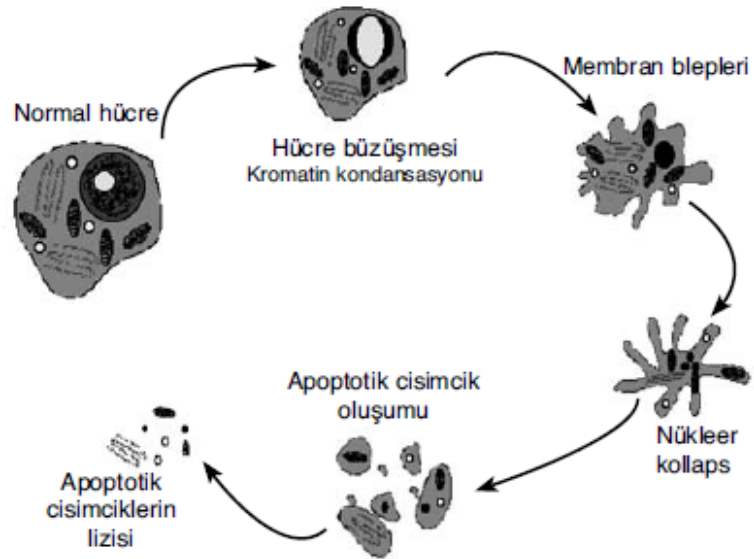
Gültekin vd (2008), apoptoz uyarıcılarını, genetik kontrol, iyonize radyasyon, kemoterapi ilaçları, tarımsal ilaçlar, iskemi sonrası reperfüzyon, mekanik travmalar, viremi, bakteriyemi sonrası gelişen sepsis ve septik şok olarak belirtmişlerdir.

Apoptozis, hematoksilen eozinle boyanmış kesitlerde mikroskop ile izlendiğinde hücreler koyu eozinofilik sitoplazmalı, bir veya birkaç parçalı piknotik çekirdekli olarak görülür (Öztürk, 2002).

Apoptotik Ölüm Basamakları,

- Başlama (Tetikleme) Fazı: Apoptotik hücre ölümünün başlangıç aşamasıdır. Apoptozisin prototipik indükleyicileri Fas ligant (FasL) ve TNF-a'dır.
- Sinyal Fazı: Apoptozis süreci boyunca sinyal iletim mekanizması önemlidir. Bu fazda, çeşitli kinazlar rol almaktadır.
- İnfaz Fazı: Apoptozis sürecinde hücre ölüm kararının alındığı basamaktır. Kaspazlar, bu basamakta rol alırlar.
- Gömme Fazı: Bu basamak apoptotik cisimciklerin, onu çevreleyen parenkimal hücreler ya da fagositler tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılması işlemlerini kapsar,

şeklinde belirtilmiştir (Eröz vd, 2012).



Şekil 2.23. Apoptozisde görülen morfolojik değişimler (Gültekin vd, 2008)

Kaspazlar, apoptozda hücreyi parçalayan, yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler olarak bilinirler (Koçyiğit & Çevik, 2011) (Şekil 2.23).

2.4.1. Kaspazlar

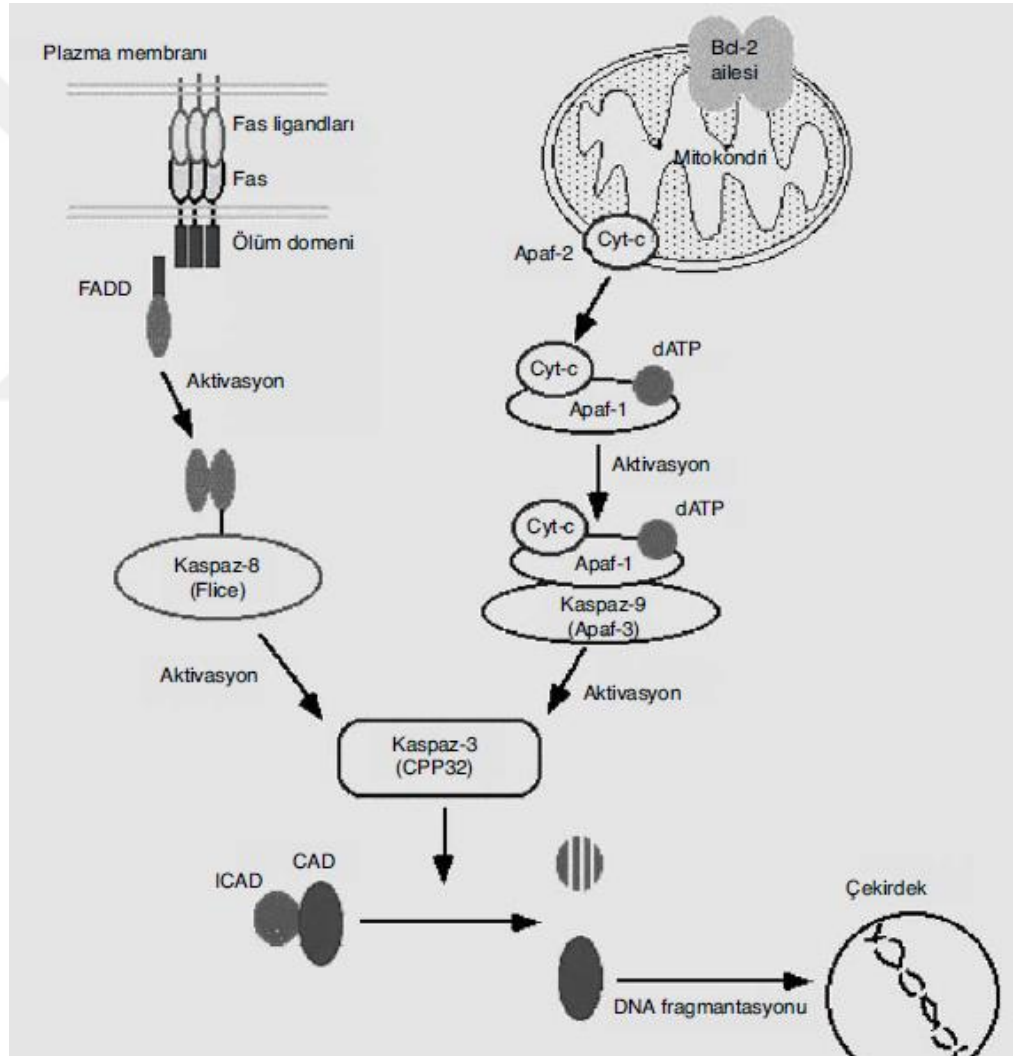
Hücre içi veya hücre dışı mekanizmayla başlayan apoptotik süreç, kaspaz adlı proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir (Koçyiğit & Çevik, 2011). Katalitik bölgelerinde sistein aminoasiti taşıdıkları, seçici olarak hedef proteinlerin C-uçlarındaki aspartat'ı kestikleri ve enzim görevi yaptıkları için kaspaz (caspase: cysteine-containing aspartate specific protease) olarak adlandırılır (Kaya vd, 2012; Öztürk, 2002).

Kaspazlar, sistein proteazlarıdır , aspartik asitten sonraki peptid bağımlı kırarlar, hücrede inaktif olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler (Koçyiğit & Çevik, 2011). Sağlıklı hücrelerde kaspazlar, enzimatik olarak inaktif ve aktif forma göre daha uzun bir polipeptid zincir olarak bulunurlar. Buna zimogen form denir. Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığı ile ve iç sinyaller de mitokondri aracılığı ile başlatıcı kaspazları aktive ederler. Aktive olan başlatıcı kaspazlar da, zincirleme olarak diğer kaspazları aktive ederler (Öztürk, 2002). Aktive olan kaspazlar da hücre ölümünü geri dönüşümsüz olarak gerçekleştirirler (Eröz vd, 2012).

Kaspazlar, prokaspazlar olarak sentezlendikten sonra aktif kaspaz halini alırlar (Kaya vd, 2012). Kaspazların, DNA tamir enzimleri olan poli-ADP-riboz polimeraz ve DNA protein kinazı yıkması sonucu kromatinde sınırlanamayan kırılmalar meydana gelir (Aktuğ, 2014). Görevini tamamlayan kaspazlar inaktive olur. Kaspazların iki kolu vardır. Büyük kol 20 kDa, kısa kol 10 kDa'dır. Kaspazların aktif kısmı küçük alt birimdedir (Gültekin vd, 2008).

Kaspaz ailesinin 14 üyesi tanımlanmıştır. Kaspazlar, başlatıcılar (kaspaz- 2,-8,-9,-10), effektorler ya da karar vericiler (kaspaz-3,-6,-7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1,-4,-5) olarak gruplandırılmıştır. Kaspaz 11 ve diğer kaspazlar apoptozis düzenleyicisi ve septik şok süresince sitokin olgunlaştırıcıdır. Kaspaz-12, endoplazmik retikuluma özgü apoptoziste önemli rol oynamakta olup kaspaz-13 de bir bovin gendir. Kaspaz-14 ise embriyonik dokularda oldukça yüksek düzeyde ekspre olurken erişkin dokularda ifade edilmemektedir (Eröz vd, 2012). Koçyiğit & Çevik (2011), farklı dokular için farklı kaspaz türlerinin apoptozisi gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir. Periferik T hücreleri apoptozise gitmek için kaspaz-3 ve kaspaz-9'a ihtiyaç duymazken, embriyonik kök hücreler her ikisine de ihtiyaç duyduğunu örnek vermişlerdir.

Gültekin vd (2008), kaspazların hücredeki aktivasyonlarını şu şekilde özetlemiştir: Aktif kaspaz 9'un, çekirdek porlarını genişletip harap etmesiyle kaspaz 3 ve kaspaz 7 çekirdeğe girer. Burada kaspaz 3, ICAD'ı (Kaspaz aktif DNaz inhibitörü) ikiye bölerek inhibitör alt birimini bozar ve nükleozomlar arasındaki DNA'yı böler. Kaspazların aktivitesi, fagositozda rol oynayan sinyallerin ortaya çıkmasına neden olur. Kaspaz 3, hücre zarına yönelerek buradaki gelsolini parçalar. Bu parçalanmayla hücre içinde aktin filamentler oluşur ve hücre zarında çıkıntılar meydana gelir. Kaspaz 3, p-21 aktive kinaz 2'yi (PDK2) aktive etmesi sonucunda da hücre iskeleti bozularak hücre apoptotik cisimlere parçalanır (Şekil 2.24.).



Şekil 2.24. Ölüm reseptörleri ve mitokondriyal yollarla kaspaz-3 aktivasyonunun başlamasıyla nükleusta oluşan DNA fragmentasyonu (Gültekin vd, 2008).

Kaspaz 12, 3, 6, 7, 8 ve 9'un işlevleri Endoplazmik retikulum (ER) stresiyle ilgili çalışmalarda gösterilmiştir. Kaspaz 12'nin, ER stresiyle indüklenen apoptozis de önemli rolü vardır. Kaspaz 12, çeşitli yollardan ER stresi tarafından aktive olduktan sonra kaspaz-12, prokaspaz 9'u keser ve kaspaz 9'da kaspaz 3'ün aktivasyonunu sağlar ve sonuçta apoptozis gerçekleşir (Seydel & Aksoy, 2012)

2.4.2. Kaspaz 3

Cellat kaspaz olarak bilinen kaspaz-3, başlatıcı kaspazlar olan, kaspaz-8, kaspaz-9 ya da kaspaz-10'un herhangi biri ile aktive olur. Özgül olarak da endonükleaz CAD'ı aktive eder. Hücrede CAD ve inhibitörü olan ICAD kompleks oluşturur. Apoptotik hücrelerde, aktive olmuş kaspaz-3, ICAD'ı parçalar ve CAD serbest kalır. Serbest CAD, çekirdek içerisindeki kromozomal DNA'yı parçalar ve kromatinin yoğunlaşmasına neden olur (Eröz vd, 2012) (Şekil 2.24.).

Kaspaz-3 aynı zamanda hücre iskeletinin yeniden organizasyonunu ve apoptotik yapılar içerisinde hücrenin parçalanmasını da indükler. Protein bağlayıcı bir aktin olan gelsolin, aktive edilmiş kaspaz-3'un anahtar substratlarından biridir. Kaspaz- 3 sırasıyla gelsolini, gelsolin parçalarını ve kalsiyum bağımsız bir şekilde aktin filamanlarını parçalar. Böylece, hücre iskeletinin bozulmasına, hücre içi transporta, hücre bölünmesi ve sinyal iletimine yol açar (Eröz vd, 2012).

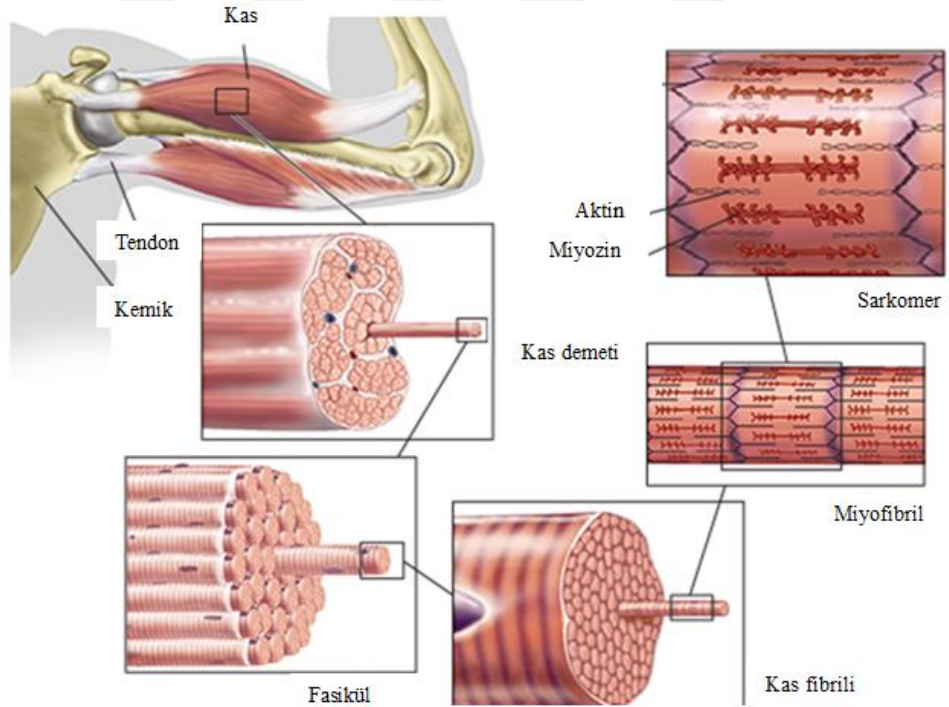
2.5. SRY Geni ve Sox2

Y kromozomu kısa kolu üzerinde testis tayin eden faktör (TDF) bulunmaktadır. TDF bölgesinde seks belirleyici genin (SRY) yerleşmiş olduğu gösterilmiştir (Demirel vd, 1997). TDF salgılanmasına neden olan gen, memelilerde Sry geni olup testis belirlenmesi için seçilmiş gen görevi görmektedir (Tosun vd, 2000). Cinsel organlar, embriyolojik dönemde primordial germ hücrelerinden köken alır. Y kromozomu ve SRY varlığında primordial germ hücreleri testis yönünde, yokluğunda ise over yönünde gelişir (Ceylaner & Ceylaner, 2010).

SRY-ilişkili SOX ailesinin bir üyesi olan Sox2, hücre farklılaşmasının ve embriyo gelişiminin düzenlenmesinde rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (Takahashi & Yamanaka, 2006). Omurgalılarda sınıflandırılmış ve tanımlanmış 21 farklı Sox geni vardır. Sox2 proteini, 317 amino asitten oluşan 34.3 kDa'luk bir transkripsiyon faktörüdür. Oct4 ve Nanog ile birlikte, insan embriyo hücrelerinde bazı hedef genlerin ifadesini düzenlemektedir. Sox2 proteini, -NH₂ ucu, -COOH ucu ve HMG (high mobility group) olmak üzere üç bölgeden oluşur. HMG bölgesi türlerde evrimsel olarak korunmuş, Sox2'nin diğer proteinlere ve DNA'ya bağlanma bölgesidir. Sox2'nin transkripsiyonel düzeyde aktivasyonu için Nanog, Oct4 gibi diğer pluripotensi elemanları ile birlikte DNA'ya bağlanması gerekmektedir. Pluripotent kök hücreler, çoklu-potansiyelliliğini ve farklılaşmamış konumunu Oct-3/4, Sox2 ve Nanog gibi transkripsiyon faktörlerinden oluşan bir moleküler ağ ile sürdürürler. Son zamanlarda Sox2 proteininin embriyonik gelişimde önemi kadar onkolojik programlamada da önemli olduğu gösterilmiştir (Turaçlı & Ekmekçi, 2016).

2.6. Kas Hasarı

Kas hücreleri, iğ şeklinde veya ince, uzun yapıdadır. Kas lifleri halinde bulunan kas hücreleri, kas dokuyu oluşturur. Kas doku embriyonun mezoderm tabakasından oluşur. Kas doku düz ve çizgili kas dokusu olarak, çizgili kas ise iskelet kası ve kalp kası olarak gruplanır. İskelet kası hücre zarına sarkolemma, sitoplazmasına da sarkoplazma adı verilir. Sarkoplazmada % 80 su, bolca kalsiyum, potasyum, magnezyum ve fosfat iyonu, protein, yağ, enzimler, glikojen, ATP ve fosfokreatin bulunur. Aynı zamanda mitokondri ve endoplazmik retikulum bakımından oldukça zengindir. Sarkoplazmada kasılmayı sağlayan 1-2 mikron çapında kontraktıl miyofibriller bulunur. Kalın ve koyu renkli olan olan miyofibriller miyozin, ince ve açık renkli olan miyofibriller aktin protein yapılıdır (Başaran, 1999) (Şekil 2.25.).



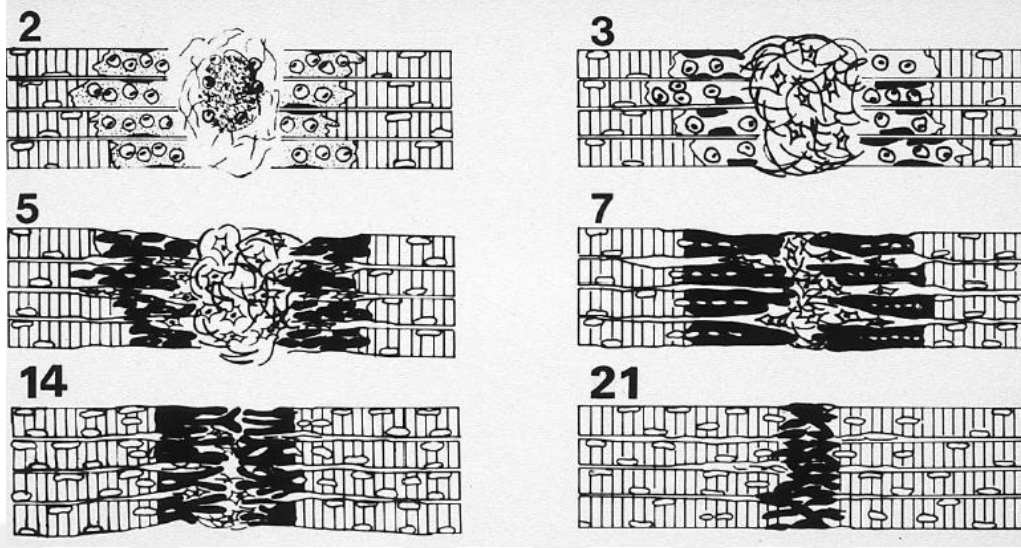
Şekil 2.25. İskelet kasının yapısı (Anonymous, 2016b)

İskelet kası liflerinin çekirdeği bölünmez. Bunun yerine uydu hücrelerince kas rejenerasyonu ve hipertrofisi gelişmektedir. Bir kas yaralandığında ya da tekrarlayan şiddetli egzersizlerle uyarıldığında uydu hücreleri bölünür, yeni oluşan hücreler zarar

görmüş hücrelerin yerini alırlar. Şiddetli egzersiz devam ettiği müddetçe uydu hücreden meydana gelen yavru hücrelerden birinin mevcut kas lifine birleştiği ve kas lifinde hipertrofik artışa yol açtığı, diğer yavru hücrenin bir kök de hücre olarak kaldığı belirlenmiştir (Gökçimen vd, 1999).

Kaslar vücut ağırlığının yaklaşık % 40'ını oluşturur. Çoğunluğu ekstremitelerde bulunduğu için çizgili kaslar travmaya çok açıktır (Sever, 2009). Ezilme sendromunda kas hasarı başlangıçta travmanın direk etkisi ile oluşmakta, ilerleyen zamanda kas içi basıncın artması ile gelişen kompartman sendromu ile iskemi gelişmektedir. Hücre zarında bulunan Na-K ATPaz ve Ca ATPaz aktivitesi azalır. Kas hücresi zarlarında geçirgenlik artışı nedeni ile hücre dışı Na ve Ca hücre içine doğru yer değiştirir. Hücre içine Na ve Ca geçişi hücrenin şişmesine neden olur. Sitolitik Ca artışı proteolitik enzimleri aktive eder ve ATP tüketimini daha da artırır. Proteolitik enzim aktivasyonu ve hücre şişmesi ile kas hücrelerinin lizisi sonucu rabdomyoliz gelişmektedir. Kas iskemisi ve bu iskeminin düzelmesi sırasında gelişen iskemi-reperfüzyon hasarı da ROT'nin oluşumuna neden olur (Akdam & Alp,2015). ROT etkisiyle oluşan lipid peroksidasyonu ve karbohidrat oksidasyon ürünleri de proteinlerin aminoasit içeriğinde modifikasyonlar oluşturmakta ve plazma protein karbonil içeriğinde artışa neden olmaktadır. İskelet kasında aniden oluşan ROT, iskelet kası hücrelerinde hasara neden olabilmektedir. Uzun ve yorucu egzersiz iskelet kası ve kalp kası hücrelerinin sarkoplazmik zarlarında hasara, kas kontraktilesinde ve miyofibril yapıda bozulmaya ve kan üre, kreatin kinaz, laktat dehidrogenaz aktivitesini de kapsayan bazı biyokimyasal parametrelerde değişikliklere yol açmaktadır (Kahraman vd, 2003).

Järvinen vd (2005), kas iyileşmesini şekil üzerinde açıklamışlardır (Şekil 2.26.). 2. gün, parçalanmış miyofibrillerin nekrotize parçaları, makrofajlar tarafından uzaklaştırılırken, santral bölgede fibroblastlar tarafından bağ dokusu formasyonu başlar. 3. gün, rejenerasyon bölgesindeki bazal lamina silindirleri içindeki uydu hücreler aktive olur. 5. gün, rejenerasyon bölgesinde miyoblastlar, miyotüpler içinde birleşir. Santral bölgedeki bağ dokusu daha yoğun hale gelir. 7. gün, rejenere kas hücreleri santral bölgedeki eski bazal lamina silindirlerinin dışına ulaşır ve skar dokusunun içine geçer. 14. gün, santral bölgedeki skar dokusu daha yoğunlaşır ve ebatı azalır. Rejenere miyofibriller santral bölge açıklığını daraltır. 21. gün, karışık miyofibriller skar dokusu ile birleşir.



Şekil 2.26. Kas dokusu iyileşmesinin şematik gösterimi (Jârvinen vd, 2005).

2.6.1. Deney hayvanı soleus kası



Şekil 2.27. Rat soleus kası (Anonoyous, 2016c)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Sağlanması

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi (OMÜ) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan izinle (2011/70) gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanları OMÜ Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi'nden sağlanarak cerrahi işlemler burada gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 56 tane, ağırlıkları 200-250gr olan *Wistar albino* dişi rat kullanılmış olup plastik kafeslerde standart yem ile beslenmiştir.

3.2. Araştırma Gruplarının Oluşturulması

Wistar albino dişi ratların sağ soleus kası üzerinde çalışıldı.

Gruplar; n=8

Kontrol Grubu: Ratlar sakrifiye edildikten sonra kas dokusu hasar oluşturulmadan çıkarıldı.

Kas Hasarı +7. Gün (KH+7): Ratların soleus kasında sadece kas hasarı oluşturuldu ve 7 gün sonra sakrifiye edilerek kas doku çıkarıldı.

Kas Hasarı+14. Gün (KH+14): Ratların soleus kasında sadece kas hasarı oluşturuldu ve 14 gün sonra sakrifiye edilerek kas doku çıkarıldı.

Kas Hasarı+21. Gün (KH+21): Ratların soleus kasında sadece kas hasarı oluşturuldu ve 21 gün sonra sakrifiye edilerek kas doku çıkarıldı.

Kas Hasarı +Mezankimal Kök Hücre Uygulaması+ 7. gün (KH+MKH+7): Ratların soleus kasında hasar oluşturuldu + 24 saat sonra lokal enjeksiyonla kemik iliği MKH verildi ve 7 gün sonra sakrifiye edilerek kas doku çıkarıldı.

Kas Hasarı +Mezankimal Kök Hücre Uygulaması+14. gün (KH+MKH+14): Ratların soleus kasında hasar oluşturuldu + 24 saat sonra lokal enjeksiyonla kemik iliği MKH verildi ve 14 gün sonra sakrifiye edilerek kas doku çıkarıldı.

Kas Hasarı +Mezankimal Kök Hücre Uygulaması+ 21. gün (KH+MKH+21): Ratların soleus kasında hasar oluşturuldu + 24 saat sonra lokal enjeksiyonla kemik iliği MKH verildi ve 21 gün sonra sakrifiye edilerek kas doku çıkarıldı.

3.3.Cerrahi Hazırlık ve Kas Hasarı Oluşturma

Cerrahi işlem öncesi ve sonrasında ratların sterilizasyonu povidin iyot ile sağlandı. Bu işlemler steril şartlarda ve genel anestezi altında yapıldı. Genel anestezi 75 mg/kg Ketamin HCL (Ketalar®) ve 10 mg/kg Xylazine (Rompun®) intraperitoneal verilerek uygulanmıştır. Anesteziden sonra ratların sağ bacağı elektrikli traş makinesi ile traş edildi. Lateral gastroknemius kas başından aşil tendonuna doğru yapılan posterolateral longitudinal yaklaşık 2cm'lik kesi ile cilt ve altındaki fasya açılarak soleus kası çıkarıldı. Uçlarına silikon boru geçirilmiş klemp kullanılarak 10'ar saniyelik 2 klemp tıki şeklinde künt ezilme hasarı oluşturuldu (Matziolis vd, 2006), (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Kas hasarı oluşturma.

3.4. Kemik İliği Mezankimal Kök Hücre Uygulaması

Çalışmada kullanılan MKH'ler, Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilmiştir. 2 adet sıçandan izole edilip karakterizasyon çalışmaları tamamlanmış GFP+ hücreler kriyotüplerde -80 °C 'de kuru buz içinde gelmiştir.

3.4.1.Kemik iliği mezankimal kök hücrelerin izolasyonu ve kültüre hazırlanması

Sıçan kemik iliği MKH'lerinin izolasyonu için ratlar (n:2) servikal dislokasyon ile öldürülerek femurları ve femurun etrafındaki yumuşak dokular steril şartlarda çıkartıldı. Hava akımlı steril kabinde uygun kesiler yapılarak kemik iliği içerikleri L-DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose) medyum içeren petri kaplarında toplandı. Kemik iliği içerikleri santrifüj edilerek iki kez yıkama işleminden geçirildikten sonra %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 penisilin ve streptomisin içeren L-DMEM'de T75 flasklarında kültür edildi. 72 saat sonra yüzen tüm hücreler atıldı ve yeni medyum ilavesi yapıldı. Haftada iki kez bu işlem tekrarlanarak flaskın tabanı yaklaşık %80 oranında hücreler ile kaplanınca (14-25. günler arasında) tripsinizasyon işlemiyle yapışan hücreler kaldırılarak yeniden kültür edildi ve bu ilk pasaj (alt kültür) olarak değerlendirildi. Bu işlemler üçüncü pasaja (P3) kadar tekrar edildi ve üçüncü pasaj sonunda elde edilen hücrelere karakterizasyon çalışması yapılmıştır.

3.4.2.Akım sitometrik analiz

Analizler, hücreler P3 aşamasına geldiğinde *FACS Calibur* akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak hücre sayımı yapıldı. Hücre sayısı belirlendikten sonra Phosphate Buffered Saline (PBS) içinde homojenize edildi. Belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel fluoresan izotiyosiyonat (FITC) ve fikoeritrin (PE) konjuge monoklonal antikorlar (CD29, CD45, CD54, CD90, CD106) ve uygun izotip kontrollerinden 10µl eklenerek karanlıkta ve oda ısısında 45 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (%0.1 sodyum azid içeren PBS) eklenerek 5dk. 1780 rpm de santrifüj edildi. 400µl hücre yıkama solüsyonu ile de yeniden süspanse edilmiştir.

3.4.3. Plazmid DNA izolasyonu

Yüksek kalitede plazmid DNA izolasyonu, ayırma ve saflaştırma işlemlerinden sonra *E.coli* 'den toksik lipopolisakkaritler gelmemesi için EndoFree Plazmid Maxi Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Seçici katı besi ortamından yeni çoğalmış tek bir koloni alınarak, 2-5 ml uygun antibiyotik içeren LB broth (Luria Bertani) sıvı besi ortamına ekilerek 8 saat boyunca 300 dak/dev ve 37 °C 'de çoğaltıldı. 250 ml seçici LB ortamı 1 ml içerisinde bakteri çoğalmış ortam ile inoküle edilmiş ve aynı koşullarda 12-16 saat bekletilmiştir. Hücreler 6000xg hızda 15 dakika boyunca 4 °C 'de döndürülerek toplanmış ve 10 ml P1 tampon çözeltisi içerisinde homojen hale getirip, 10 ml Tampon P2 eklenip sertçe 4-6 kez ters çevrilerek karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. 10 ml buzda soğutulmuş P3 tamponu eklenerek 4-6 kez ters çevrilip karışım QIA filter şırıngasına aktarıldı. 10 dakika bekletildi ve filtreden geçirilerek 50 ml tüp içerisine aktarılıp 2,5 ml ER tamponu eklendi. 30 dk buzda bekletildi. 10 ml QBT tampon çözeltisi ile önceden dengelenmiş QIAGEN-tip 500 kolonuna karışım eklenip süzülmesi beklendi. 2 kez kolon 30 ml QC tamponu ile yıkanarak 15 ml QN tamponu içerisinde DNA çözülmüştür. Plazmid DNA 'sı 10,5 ml izopropanol eklenerek 4 °C 'de, 30 dakika boyunca asgari 15.000xg hızla çöktürüldükten sonra DNA, 5 ml endotoksin içermeyen %70 etanol içerisinde yıkanarak 10 dk 15.000xg hızla çöktürülmüştür. Yıkanmış plazmid DNA 'sı oda sıcaklığında 5-10 dakika kurutulduktan sonra endotoksin içermeyen TE tamponu içerisinde çözülmüştür.

3.4.4. GFP gen transformasyonu

Gen aktarımı elektroporasyon yöntemini temel alan Neon Transfection Sistemi, 10 µl Neon Kit ve 100 µl Neon Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Plazmid DNA 'sı 1-5 µg/µl konsantrasyonunda deiyonize su içerisinde hazırlanmıştır. MKH'ler ise deneyin olacağı günde transfeksiyon başına $0,5-1 \times 10^6$ hücre olacak şekilde çoğaltıldı. Deney günü hücreler kültür kabından kaldırıldı ve Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen PBS'le yıkayıp, 1300 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Resuspension Buffer R tampon çözeltisi ile son hücre yoğunluğu 1 ml başına $1,0 \times 10^7$ hücre olacak şekilde hazırlanmıştır. 6 kuyucuklu kültür kapları içerisine 2 ml serum içeren, seçici antibiyotik içermeyen uygun besiyeri eklenip ve 37°C 'de % 5 CO₂ sirkülasyonu olan nemli ortamda inkübe edilmiştir. Steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü içerisine

transfeksiyon başına 2-4 µg plazmid DNA 'sı konulmuştur. Bu tüp içerisine transfeksiyon başına DNA ile birlikte 10 µl olacak miktarda hücre aktarıldı. Neon™ Pipeti ile yavaşça tüp içerisinden 10 µl DNA-hücre süspansiyonu çekildi ve ucundaki hücre-DNA karışımı ile birlikte Neon™ Pipet İstasyonu içerisinde bulunan ve 3 ml elektrolit tamponu eklenmiş tüpe yerleştirildi. Belirtilen ayarlarda sistem elektrik akımı uygulanıp, gen aktarılmış hücreler hemen önceden ısıtılmış serum içeren fakat seçici antibiyotik içermeyen besi ortamına aktarılarak hücreler 37°C 'de nemlendirilmiş CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Transformasyon sonrası 3. günde ortam değiştirilerek besi ortamı tazelendi ve bu noktadan itibaren seçici antibiyotik (pGFP için G418, Kat. No. 11811-098) eklenmiştir.

3.4.5. Kemik iliği mezankimal kök hücreleri çözme işlemi ve uygulanması

- Kriyotüpler doğrudan 37 °C'de çözüldü.
- Kriyotüp içerikleri bir falkon tüpe konuldu, pipetajlandıktan sonra 1300 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve kendi medyumundan üzerine 6 ml eklendi.
- 1300 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve kendi medyumundan 6,5 ml eklendi, pipetajlandı.
- Bu içerikten 200µl alındı ve bir ependorfa konuldu. Üzerine 200 µl Trypan Blue Solüsyonu eklendi ve pipetajlandı.
- Hazırlanan bu süspansiyondan 50 µl alınarak thoma lamında hücre sayımı yapıldı.

Hücre sayısı x Dilüsyon oranı x 10 000

- Bir hayvana, $0.5 \cdot 10^6$ kök hücre verilecek şekilde insülin enjektörüne kök hücre solüsyonundan çekildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Deney hayvanlarına uygulanacak kök hücre solüsyonu

KH+MKH grubu hayvanlarına kas hasarı oluşturulduktan 24 saat sonra, genel anestezi altında soles kası tekrar açılarak lokal uygulama ile GFP+ MKH hücre verilmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Deney hayvanlarının hasarlı soleus kasına lokal GFP+ MKH uygulaması

Sakrifiye edilen hayvanlardan solus kası alındı ve 0,25 M sükröz çözeltisine konuldu (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Alınan doku örnekleri

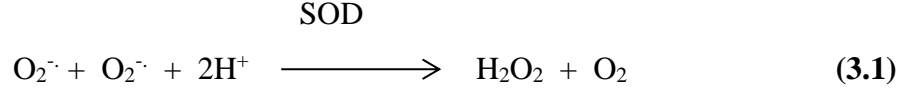
Alınan kas doku örnekleri biyokimyasal analizler için -80 °C'lik derin dondurucuya (Sanyo ultra low) konuldu. Histolojik inceleme için alınan dokular % 10'luk nötral tamponlanmış formalin solüsyonu bulunan kavanozlara konuldu.

3.5. Dokuların Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması

Doku örnekleri -80 °C'den çıkarıldı ve +4 °C'de çözündü. Sonra hassas terazide (Ohaus Adventure Pro AV 264C) tartılarak ağırlıkları belirlendi. Plastik tüp içine alınan doku örneklerine 1/10 (w/v) oranında soğuk fosfat tamponu (0,1 M pH:7,4) çözeltisi eklendi. Bütün doku örnekleri, plastik tüpte fosfat tamponu içinde önce makasla küçük parçalara ayrıldı. Bıçaklı homejenizatörde (Ultra-Turrax T25) 20 saniye (sn) süre 10 sn aralıkla 8000 rpm'de 3 kere, ardından ultrasonikasyon aletinde (Sonics vibracell vcx 130) 20 sn süre 10 sn aralıklarla 6 kere %25 amplitutda homejenizasyon tamamlandı. Homejenizasyon işlemleri buzlu ortamda gerçekleştirildi. Homojenatlar, +4 °C'de 15.000 rpm de 15 dk. santrifüj (Kubota model 3500) edilerek süpernatant elde edildi.

3.6. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini

SOD enziminin aktivite tayini için ticari olarak satılan Süperoksit Dismutaz (Cayman) Ölçüm Kiti kullanıldı (3.1) .



Enzim aktivitesinin ölçümünde 96 kuyucuklu mikroplate kullanılmıştır.

Kullanılan Reaktifler:

SOD standart
Sample buffer
Assay buffer
Radikal detektör
Xanthine Oxidase

Ölçümün Yapılması:

1. SOD standart kuyucukları
10 µl SOD standardı
200 µl dilüe edilmiş radikal dedektör
2. Örnek kuyucukları
200 µl dilüe edilmiş radikal dedektör
10 µl örnek

Dokulardan elde edilen süpernatantlar örnek olarak kullanıldı. Reaksiyon 20 µl dilüe Xanthine Oxidase'ın kuyucuklara konulmasıyla başlatıldı. Plate, birkaç sn çalkalandı ve 20 dk. oda ısısında inkübe edildi. 440-460 nm'de absorbans (ChemWell Awareness technology) okundu.

$$\text{SOD (U/ml)} = \left[\left(\frac{\text{örnek LR-y intercept}}{\text{slope}} \right) \times \frac{0,023}{0,01} \right] \quad (3.2)$$

(3.2) formülü ile hesaplandı.

3.7. Katalaz Aktivite Tayini

CAT enziminin aktivite tayini için ticari olarak satılan Katalaz (Cayman) ölçüm kiti kullanıldı.

Kullanılan Reaktifler:

Sample buffer
Assay buffer
Formaldehit standartı
Katalaz
Potasyum Hidroksit
Hidrojen Peroksit
Purpald (Kromojen)
Potasyum Periodat
Metanol

Ölçümün Yapılması:

1. Formaldehit Standart Kuyucukları
30 µl metanol
20 µl standart
100 µl dilüe assay buffer
2. Pozitif Kontrol kuyucukları
30 µl metanol
100 µl dilüe assay buffer
20 µl dilüe katalaz
3. Örnek kuyucukları
30 µl metanol
100 µl dilüe assay buffer
20 µl örnek

Dokulardan elde edilen süpernatantlar örnek olarak kullanıldı. Reaksiyonu başlatmak için tüm kuyucuklara 20 µl dilüe hidrojen peroksit ilave edildi. Plate, 20 dk. oda ısısında çalkalayıcıda inkübe edildi. Reaksiyonu sonlandırmak için her bir kuyucuğa 30 µl dilüe potasyum hidroksit eklendi. Sonra her bir kuyucuğa 30 µl purpald eklendi. Oda ısısında 10 dk. inkübe edildikten sonra her bir kuyucuğa 10 µl

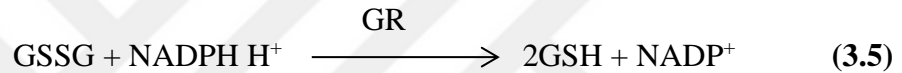
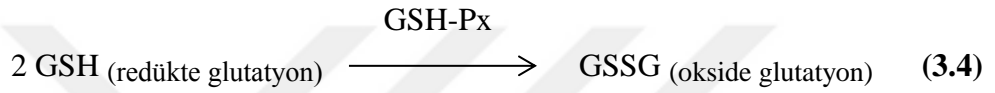
potasyum periodat eklendi. Oda ısısında çalkalayıcıda 5 dk. İnkübe edildikten sonra 540 nm 'de absorbans (ChemWell Awareness technology) okundu .

$$\text{CAT Aktivitesi: } \frac{\mu\text{M örnek}}{20\text{dk}} \times \text{Dilüsyon oranı} \quad (3.3)$$

(3.3) formülü ile hesaplandı.

3.8. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini

GSH-Px enziminin aktive tayini için ticari olarak satılan Glutasyon Peroksidaz (Cayman) Ölçüm Kiti kullanıldı.



Bu reaksiyonlar (3.4) (3.5) sonucunda NADPH'ın NADP⁺'ya oksidasyonu 340 nm'deki absorbans değerlerinde azalmaya neden olur. Enzim aktivitesinin ölçümünde 96 kuyucuklu mikropate kullanılmıştır.

Kullanılan Reaktifler:

- Glutasyon peroksidaz (kontrol)
- Assay buffer
- Sample buffer
- GSH-Px Cumene Hydroperoxide
- GSH-Px Co- Substrat karışımı

Ölçümün Yapılması:

1. Non- enzimatik kuyucuklar:
 - 50 µl Co- substrat karışımı
 - 120 µl assay buffer
2. Pozitif kontrol kuyucukları:
 - 50 µl Co- substrat karışımı
 - 100 µl assay buffer
 - 20 µl dilüe GSH-Px kontrol

3. Örnek kuyucukları

50 µl Co- substrat karışımı

100 µl assay buffer

20 µl örnek

Dokulardan elde edilen süpernatantlar örnek olarak kullanıldı. Reaksiyon tüm kuyucuklara 20 µl Cumene Hydroperoxide eklenmesiyle başlatıldı. Plate, birkaç sn hafifçe çalkandı. 340 nm'de 5 dk. süresinde 1'er dk. aralıklarla absorbans (ChemWell Awareness technology) ölçüldü.

$$\text{GSH-Px Aktivitesi} = \frac{\Delta A_{340}/dk}{0,00373 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0,19 \text{ ml}}{0,02 \text{ ml}} \times \text{dilüsyon oranı} = \text{nmol/dk/ml} \quad (3.6)$$

(3.6) formülü kullanılarak hesaplandı.

3.9. Kaspaz-3 Aktivite Tayini

Kaspaz-3 enziminin aktivite tayini için ticari olarak satılan Caspase-3 Assay Kit Colorimetric (Cayman) kullanıldı. Testin esası, peptit substrat Ac-DEVD-pNA'nın kaspaz 3 tarafından hidrolizine dayanır. Hidroliz sonucunda p-nitroanilin (pNA) salınır. pNA, 405 nm'de yüksek absorbansa sahiptir.

Kullanılan Reaktifler:

5x Lysis buffer

1 x Assay buffer

Caspase 3

Ac-DEVD-pNA Substrat (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p- nitroanilide)

Ac-DEVD-CHO Inhibitör (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al)

p-Nitroaniline Standart

Su (17 megohm)

DMSO

BSA

pNA stok solüsyonu 10x Assay buffer ile dilüe edilerek farklı konsantrasyonlarda seri pNA solüsyonu hazırlandı. Farklı konsantrasyonlardaki pNA'dan 100 µl birer kuyucuğa konuldu.

Çizelge 3.1. de gösterilen değerler 96 kuyucuklu plate üzerinde uygun yerlere konuldu.

Çizelge 3.1. Plate kuyucuğuna konulan maddeler ve miktarları

	Örnek	Kaspaz 3 5µg/ml	1x Assay buffer	Kaspaz 3 inhibitör 200µM	Kaspaz 3 Substrat 2mM
Blank	-	-	90 µl		10 µl
Örnek	10 µl		80 µl		10 µl
Örnek + inhibitör	10 µl	-	70 µl	10 µl	10 µl
Kaspaz 3 pozitif kontrol	-	10 µl	80 µl	-	10 µl
Kaspaz 3 pozitif kontrol+ inhibitör	-	10 µl	70 µl	10 µl	10 µl

Dokulardan elde edilen süpernatantlar örnek olarak kullanıldı. Her bir örnekten 10 µl uygun kuyucuklara konuldu. 1x assay buffer kuyucuklara Çizelge 3.1. deki gibi konuldu. Kaspaz-3 inhibitörü uygun kuyucuklara ilave edildi. Her bir kuyucuğa 10 µl kaspaz-3 substratı eklenerek reaksiyon başlatıldı ve yavaşça çalkalanarak karıştırıldı. Plate üzeri kapatıldıktan sonra 37 °C’de 100 dk. İnkübe edildi. 405 nm’de absorbans (Synergy 4 biotek) okundu.

$$\text{Kaspaz-3 } \mu\text{mol pNA/dk/ml} = \frac{\mu\text{mol pNA} \times \text{dilasyon oranı}}{\text{dk} \times \text{ml örnek}} \quad (3.7)$$

(3.7) formülü ile kaspaz-3 aktivitesi hesaplandı.

3.10. Dokuların Histolojik İnceleme İçin Hazırlanması

Dokuda GFP⁺ MKH’lerin yerleşim durumunu belirlemek için %10’luk nötral formalinde fikse edilen dokular, PBS ile yıkanarak rutin histolojik takibe (alkol, ksilol ve parafin) alınıp parafin bloklara gömülmüştür. 2-3 µm kalınlığında kesitler alınarak doku kesitlerinde deparafinizasyon ve antijen retrieval işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlerden sonra doku kesitleri % 1,5 blok serumda 30 dk. 37 °C’de inkübe edilmiş ve GFP antikoru (Santa Cruz Biotechnology) ile 4°C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. PBS ile 3 kez yıkama yapıldıktan sonra doku kesitleri sekonder antikor ile 60 dk. 37 °C’de inkübe edilmiştir. Kesitler DAPI (Santa Cruz Biotechnology) ile kapatılarak Leica DMI 4000 Microsystems flouresan

mikroskop ile incelenmiştir (Negatif kontroller için, aynı yöntem uygulanmış fakat primer antikor yerine PBS kullanılmıştır).

3.11. SRY Geni

Deneysel çalışmada *Wistar albino* dişi ratlar kullanılmıştır. MKH' ler ise *Wistar albino* erkek ratlardan hazırlanmıştır. Kök hücrenin varlığını deney grubu hayvanlarda göstermek amacıyla SRY analizi çalışması için öncelikle dokulardan DNA izolasyonu yapıldı.

3.11.1. Dokudan DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için ticari olarak satılan İnvitrogen- Mini Kit (PureLink) kullanılmıştır.

Kullanılan Reaktifler:

- RNase A
- Proteinaz A
- Genomik digestion buffer
- Genomik lysis buffer
- Genomik wash buffer 1
- Genomik wash buffer 2
- Genomik elution buffer

Kas dokusundan elde edilen doku lizati -20 °C den çıkarıldı. Oda ısısında ve 37 °C de inkübasyonda çözüldü. Vortekslendi ve 12 000 rpm de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant alındı. Ependorf kurutma kâğıdı üzerinde ters çevrilerek kalan süpernatant alındı. Her örnek için ayrı kurutma kağıdı kullanıldı. Her bir ependorfa 180 µl genomik digestion buffer sonra 20µl Proteinaz K eklendi. 55 °C da 4 saat inkübasyona bırakıldı. Her hangi bir partikülü uzaklaştırmak için max. hızda 3 dk. santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant yeni ependorfa konuldu. Ependorflara 20µl RNase A eklendi, 5sn vortekslendi, oda ısısında 2 dk inkübe edildi. 200 µl genomik lysis/ binding buffer eklendi ve vortekslendi. 200 µl etanol lizata eklendi, 5sn vortekslendi. Her bir ependorftan 640 µl alıp etiketli spin column tüpe konuldu. 9500 rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildikten sonra içinde sıvı olan collectin tüpü atılarak yeni collection tüp yerleştirildi. Wash buffer 1 den 500 µl column

üzerine eklendi. 9500 rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Alttaki içinde sıvı olan collectin tüpler atıldı ve yeni collection tüpler yerleştirildi. Wash buffer 2 den 500 µl column üzerine eklendi. 13 000 rpm de 3 dk oda ısısında santrifüj edildi. Collection tüpü çıkartıldı ve spin column 1.5 ml lik steril mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Column üzerine 100 µl elution buffer eklendikten sonra oda ısısında 1 dk inkübe edildi. 13 000 rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Bu şekilde tüplerde genomik DNA çökeltisi elde edildi.

3.11.2. Gerçek zamanlı PCR

Doku içerisinde Y-kromozomu taşıyan hücrelerin belirlenmesi için SRY geninin çoğalması incelenmiş ve bu gerekçe ile gerçek zamanlı (Real-Time) PCR yöntemi kullanılmıştır. DNA örnekleri SYBR içeren PCR karışımı (LightCycler 480 SYBR Green I Master, Roche, Mannheim) içerisine eklenmiştir. SRY ve Sox2 genlerine özgün primerler reaksiyona eklenerek 95 °C, 15 sn ve 60 °C, 1 dakika koşullarında 45 döngü yapılarak genler çoğaltılmıştır. Her bir döngüdeki çoğalan genler ortamdaki SYBR DNA boyasının ışımaya miktarındaki artış ile LC480 (Roche) Real-Time PCR cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar Cp değeri cihaz tarafından hesaplandıktan sonra delta-Cp değerleri grafik üzerinde gösterilmiştir. Dişi sıçan dokularından elde edilen DNA örneği çalışmada negatif kontrol ve erkek sıçan dokularından elde edilen hücrelerin DNA'sı pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Deneyler her bir örnek için dört kez tekrar edilmiştir.

3.11. İstatiksel Analiz

İstatistik analiz için SPSS 15.0 programı kullanıldı. Veriler aritmetik ortalama \pm standart sapma ile gösterildi. SOD, CAT ve GSH-Px enzimleri için varyanslar homojen olduğunda ikili karşılaştırma için Tukey testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Kaspaz 3 enzimi için veriler normal dağılıma uymadığı için, değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. İkili grupların karşılaştırması için Benferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.01$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

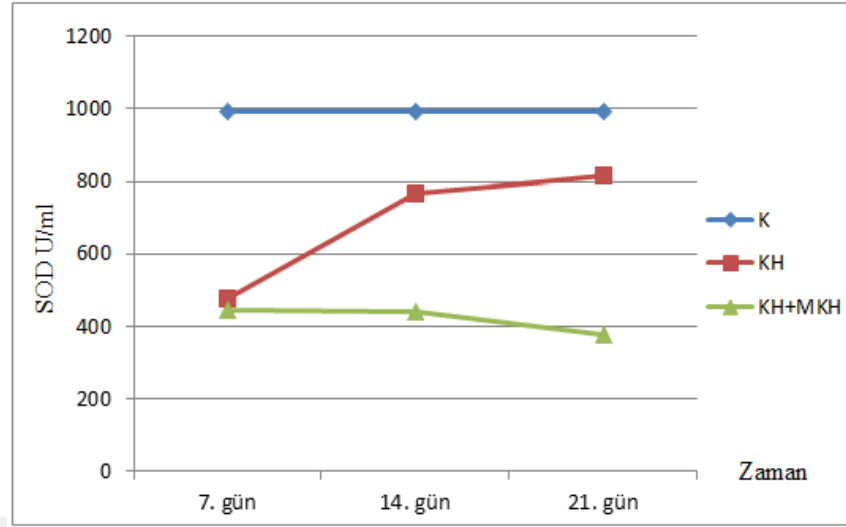
Bu çalışmada, kas hasarı oluşturulmuş ratlarda, mezankimal kök hücre uygulamasının antioksidan enzimler olan SOD, CAT ve GSH-Px ile apoptozis belirteci olan kaspaz 3 enzimi üzerine etkisi araştırıldı. Elde edilen enzim değerleri istatistiksel olarak değerlendirildi.

4.1. Süperoksit Dismutaz Enzimi Aktivite Değişimi

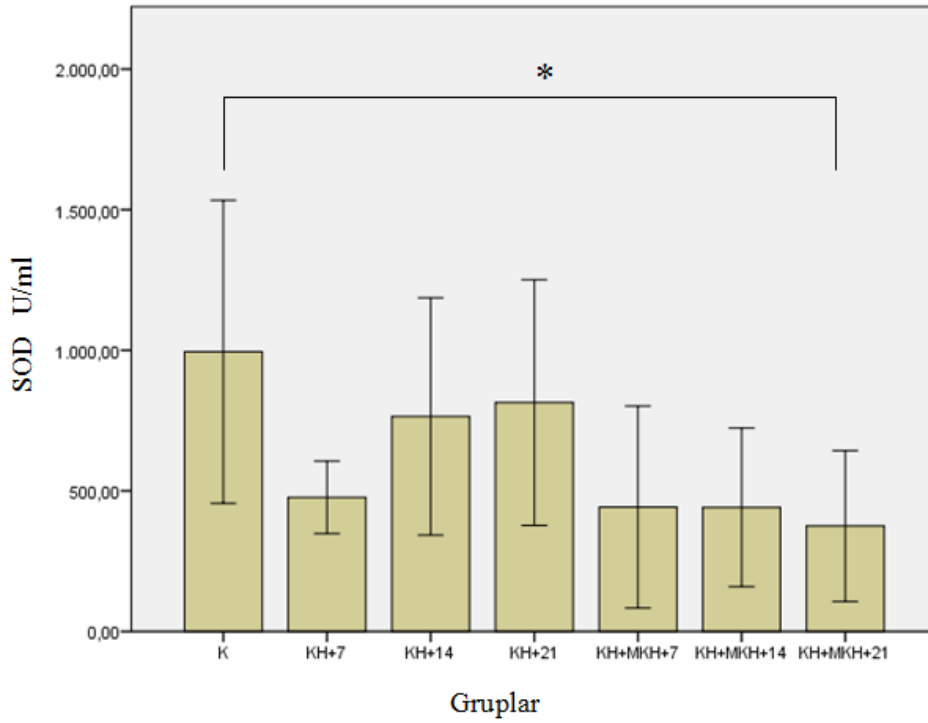
Kontrol grubu (K) ve deney gruplarının SOD enzimi aktivite değerleri karşılaştırıldı (Çizelge 4.1.). Sadece kas hasarı oluşturulan gruplarda, KH+7 grubu SOD değeri K grubuna göre düşük iken KH+14 ve KH+21. grubu değerleri artış göstererek K grubu değerlerine yaklaşmaktadır. KH+MKH gruplarının SOD değerleri, K ve KH gruplarına göre daha düşük aktivite değerleri göstermektedir. K grubuna ile KH+MKH+21 grubu karşılaştırıldığında, SOD aktivitesinde ki azalma istatistiksel olarak anlamlı ($p:0,038$) bulunmuştur (Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3.).

Çizelge 4.1. SOD enzimi aktivite ve p değerleri

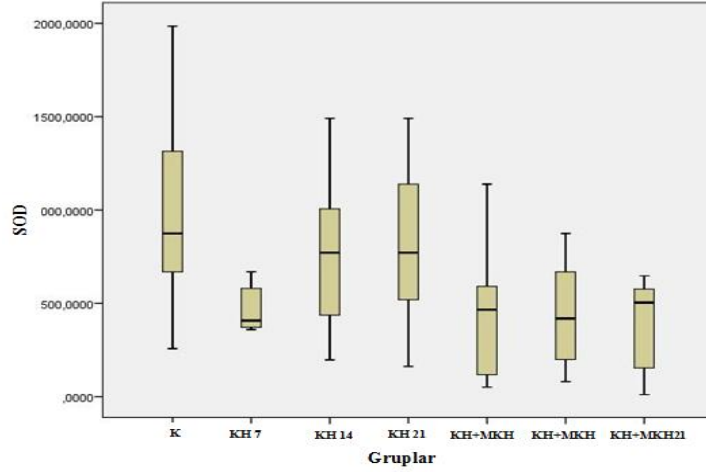
Gruplar	AO \pm SS	Ortanca(Min-Mak)	P
K*	994.75 \pm 538.89	874.30 (257.36-1984.8)	
KH+7	476.99 \pm 129.34	407.03 (359.58-668.65)	0.130
KH+14	764.76 \pm 422.08	771.47 (197.22-1491.24)	0.880
KH+21	814.03 \pm 437.11	771.47 (162.44-1491.24)	0.959
KH+MKH+7	442.26 \pm 359.46	466.134 (51.11-1138.70)	0.069
KH+MKH+14	441.03 \pm 281.87	418.44 (81.09-874.30)	0.068
KH+MKH+21*	374.92 \pm 268.31	504.13 (10.58-647.48)	0.038



Şekil 4.1. SOD enzimi aktivitelerinin zamana göre değişimi



Şekil 4.2. SOD enzimi aktivite değerleri grafiği (*: P < 0,05)



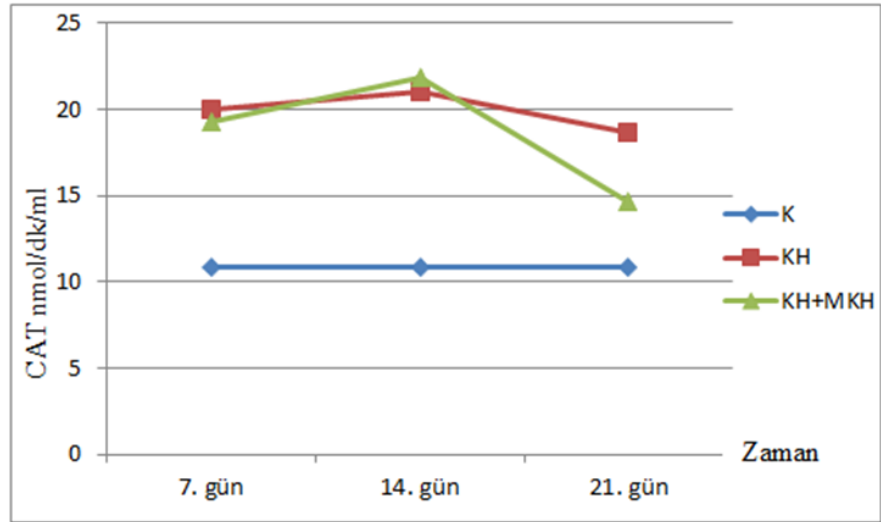
Şekil 4.3. SOD enzimi aktivitesi

4.2. Katalaz Enzimi Aktivite Değişimi

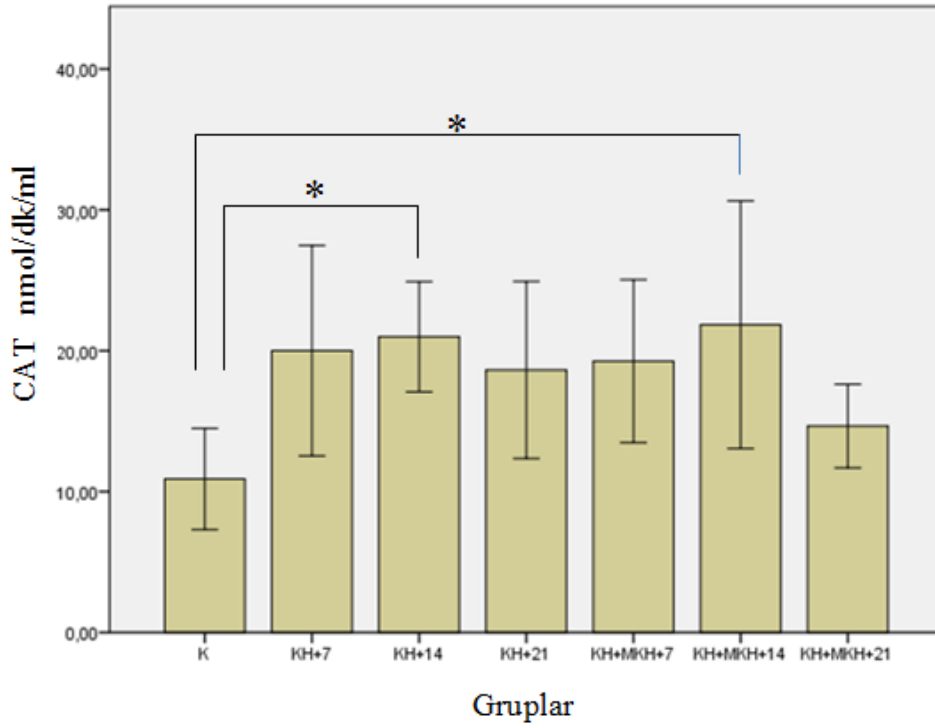
K grubu ve deney gruplarının CAT enzimi aktivite değerleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.2.). K grubuna göre deney gruplarının CAT enzim aktivitesinde artış görülmüştür. KH+14 (p:0,030) ve KH+MKH+14 (p:0,010) gruplarının CAT enzim aktivite değerlerindeki artış K grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. KH+21 grubunda CAT aktivitesi, KH+7 ve KH+14 gruplarına göre az miktarda azalmasına rağmen K grubuna göre yüksek olduğu görülmüştür. KH+MKH gruplarında ise CAT enzim aktivitesinin KH+MKH+7 ve KH+MKH+14.gruplarında arttıktan sonra KH+MKH+21 grubunda ise azalarak K grubu değerlerine yakın değerler olduğu belirlenmiştir. KH+21 grubuna göre KH+MKH+21 grubu CAT aktivite değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6.).

Çizelge 4.2. CAT enzimi aktivite ve p değerleri

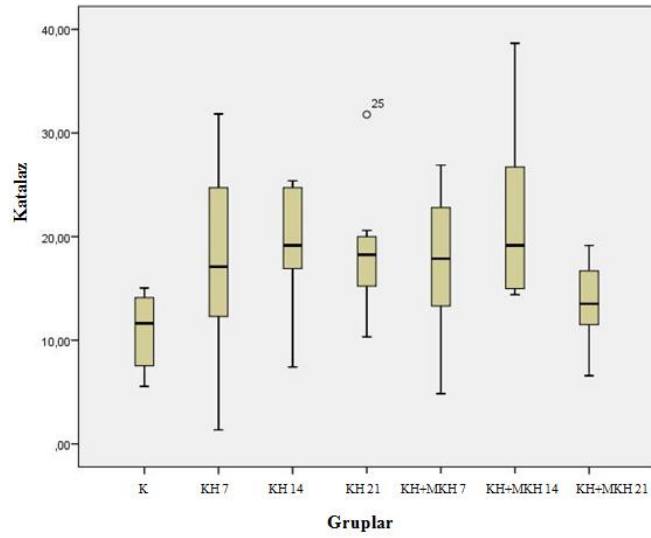
Gruplar	AO ± SS	Ortanca(Min-Mak)	P
K*	10.89± 3.59	11.63 (5.55-15.04)	
KH+7	20.00± 7.46	18.04 (10.39-31.84)	0.067
KH+14*	20.99 ± 3.91	20.72 (16.59-25.38)	0.030
KH+21	18.63 ± 6.28	18.25 (10.33-31.77)	0.149
KH+MKH+7	19.25 ± 5.77	18.49 (10.58-26.90)	0.117
KH+MKH+14*	21.84 ± 8.79	19.16 (14.40-38.65)	0.010
KH+MKH+21	14.65 ± 2.96	13.55 (11.23-19.14)	0.882



Şekil 4.4. CAT enzimi aktivitelerinin zamana göre değişimi



Şekil 4.5. CAT enzimi aktivite değerleri grafiği (*: $P < 0,05$)



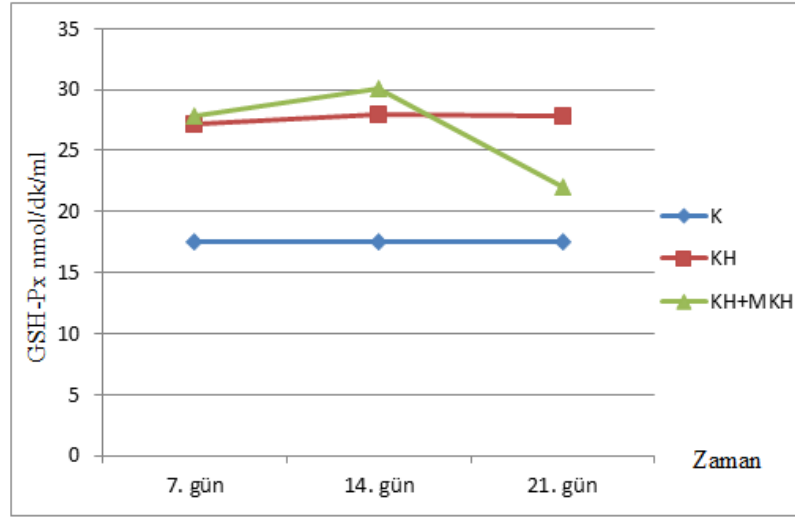
Şekil 4.6. CAT enzimi aktivitesi

4.3. Glutasyon Peroksidaz Enzimi Aktivite Değişimi

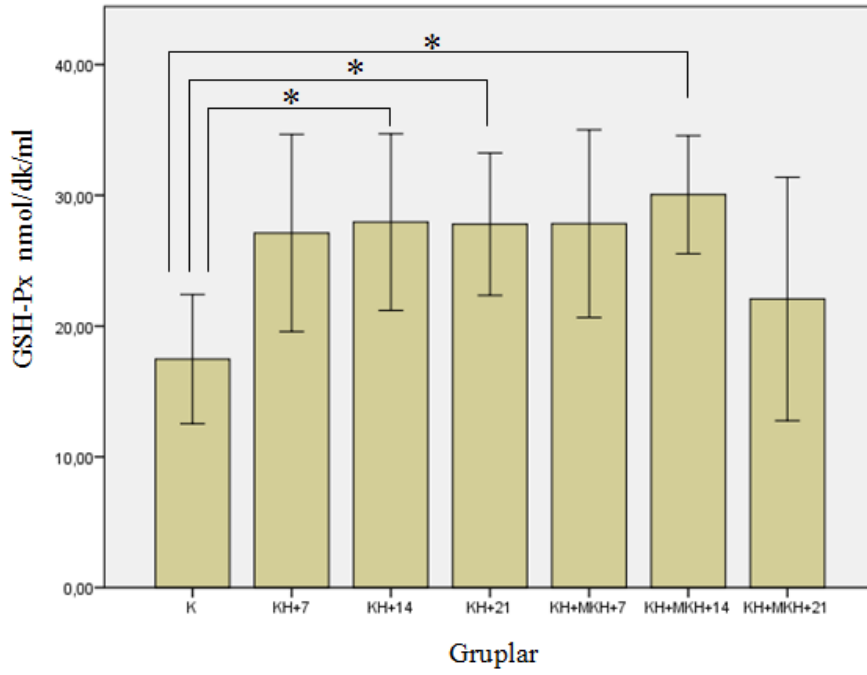
K grubu ve deney gruplarının GSH-Px enzimi aktivite değerleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.3). K grubuna göre deney gruplarında GSH-Px aktivitesinin arttığı belirlendi. K grubuna göre kas hasarı oluşturulan KH+ 14 (p:0,038) ve KH+21 (p:0,043) gruplarında GSH-Px enzim aktivitesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. K grubuna göre KH+MKH+14. grubundaki artış da istatistiksel olarak anlamlı (p:0,007) bulunmuştur. KH+MKH+21 grubu değerlerinin K grubu değerlerine yakın olduğu görülmüştür (Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9.).

Çizelge 4.3. GSH-Px enzimi aktivite ve p değerleri

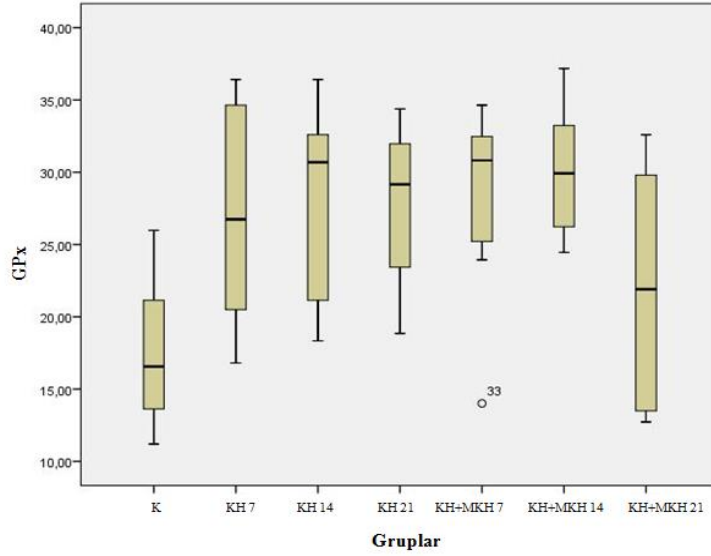
Gruplar	AO ± SS	Ortanca(Min-Mak)	P
K*	17.47 ± 4.93	16.55 (11.21-25.98)	
KH+7	27.12 ± 7.53	26.74 (16.81-36.42)	0.070
KH+14*	27.95 ± 6.75	30.69 (18.34-36.42)	0.038
KH+21*	27.79 ± 5.44	29.16 (18.85-34.38)	0.043
KH+MKH+7	27.83± 7.17	30.81 (14.01-34.64)	0.054
KH+MKH+14*	30.05 ± 4.52	29.92 (24.45-37.18)	0.007
KH+MKH+21	22.07± 9.30	21.90 (12.73-32.60)	0.850



Şekil 4.7. GSH-Px enzimi aktivitelerinin zamana göre değişimi



Şekil 4.8. GSH-Px enzimi aktivite değerleri grafiği (*: $P < 0,05$)



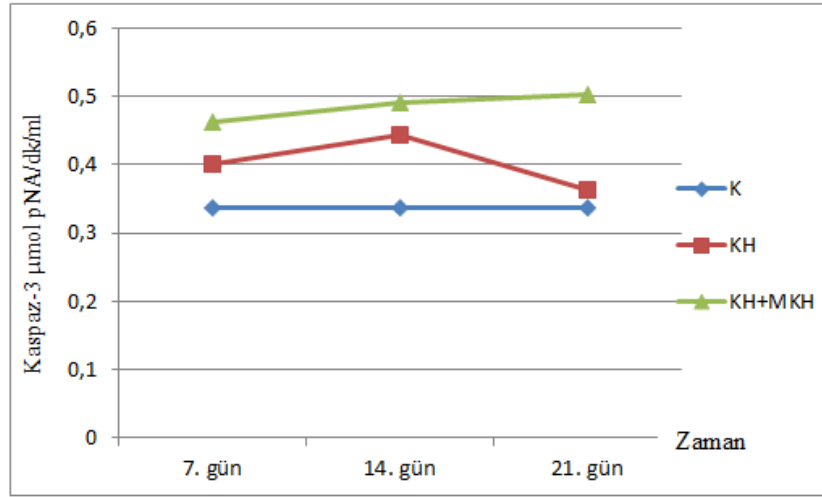
Şekil 4.9. GSH-Px enzimi aktivitesi

4.4. Kaspaz-3 Enzimi Aktivite Değişimi

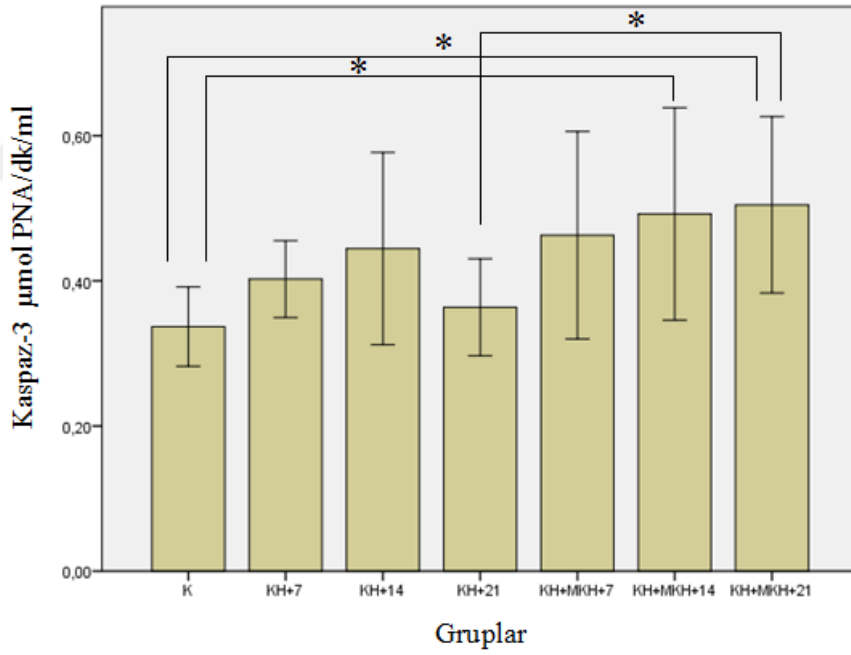
K grubu ve deney gruplarının kaspaz-3 enzim aktivite değerleri karşılaştırmıştır (Çizelge 4.4.). K grubuna göre deney gruplarında kaspaz-3 aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. KH grubunda en yüksek değer KH+14 grubunda olup KH+21. grubu değerlerinin K grubu değerlerine yakın olduğu görülmüştür. K grubuna göre KH+MKH+14 (p: 0,009) ve KH+MKH+21 (p: 0,003) grubu değerlerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tüm çalışma grupları birbiri ile karşılaştırıldığında ise KH+21 grubuna göre KH+MKH+21 grubu kaspaz-3 enzim aktivite değerlerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı (p: 0,006) bulunmuştur (Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12.) .

Çizelge 4.4. Kaspaz-3 enzimi aktivite ve p değerleri

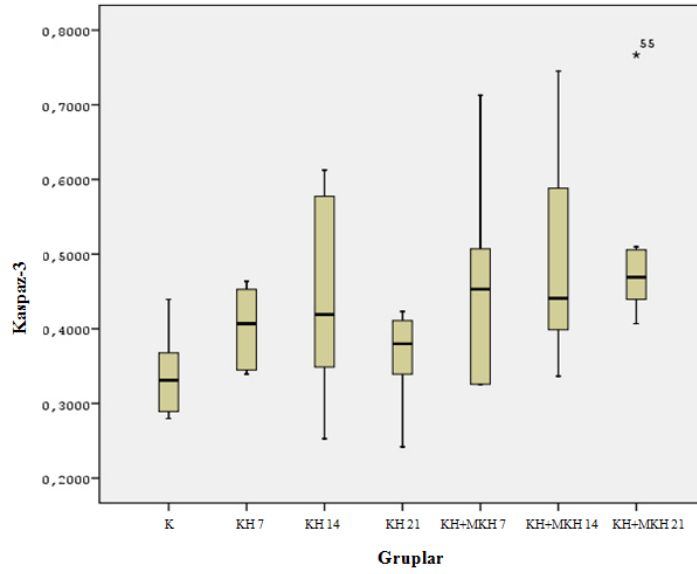
Gruplar	AO ± SS	Ortanca(Min-Mak)	P
K*	0.336 ± 0.05	0.331 (0.27-0.43)	
KH+7	0.402 ± 0.05	0.406 (0.33-0.46)	0.071
KH+14	0.444 ± 0.13	0.419 (0.25-0.61)	0.074
KH+21°	0.363 ± 0.06	0.379 (0.24-0.42)	0.247
KH+MKH+7	0.462 ± 0.14	0.453 (0.32-0.71)	0.039
KH+MKH+14*	0.492 ± 0.14	0.440 (0.33-0.74)	0.009
KH+MKH+21* °	0.504 ± 0.12	0.469 (0.40-0.76)	*0.003 ° 0.006



Şekil 4.10. Kaspaz-3 enzimi aktivitelерinin zamana göre değışimi



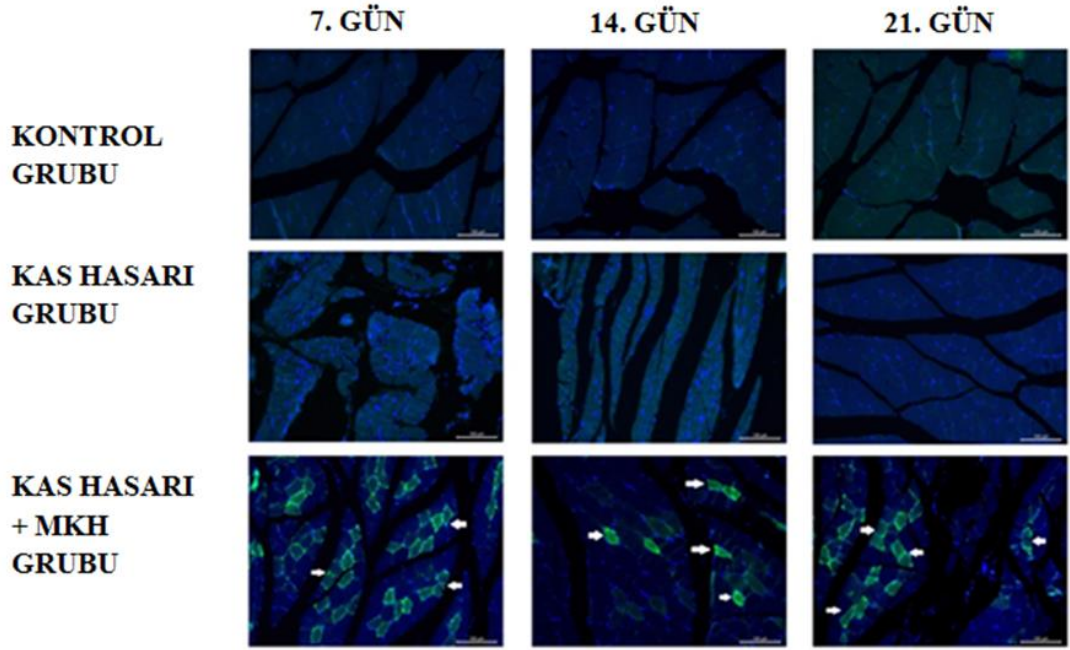
Şekil 4.11. Kaspaz-3 enzimi aktivite değeri grafiği (*: P < 0,05)



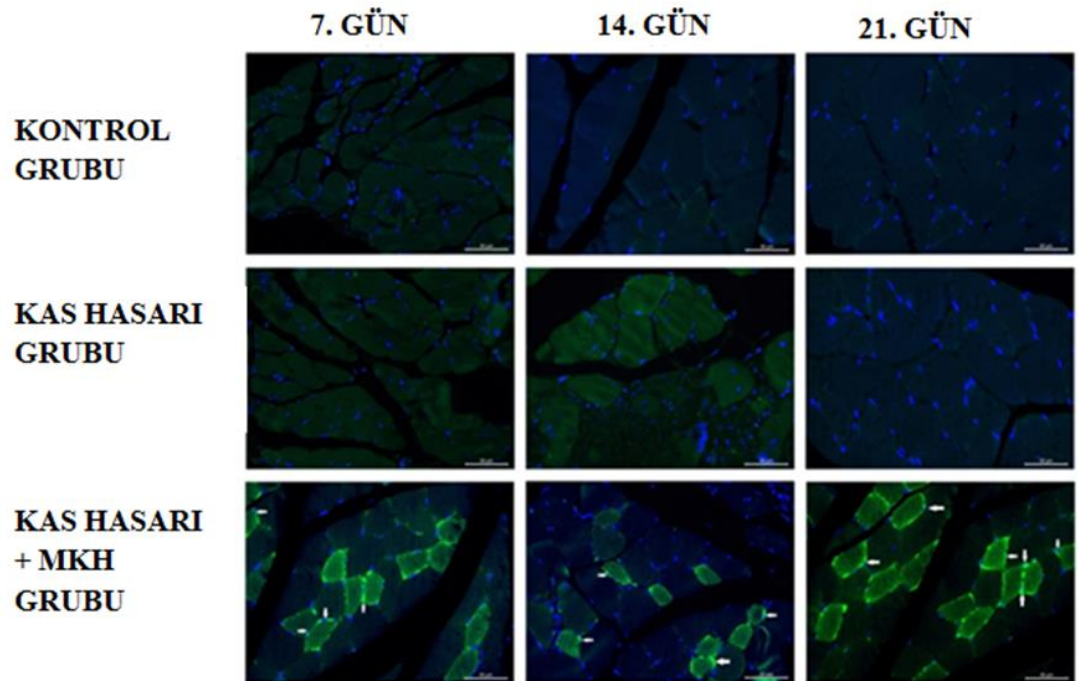
Şekil 4.12. Kaspaz-3 enzimi aktivitesi

4.5. İmmünohistokimyasal inceleme

Yapılan incelemelerde kas hasarı oluşturulup 24 saat sonra MKH uygulanan KH+MKH gruplarının 7., 14. ve 21. gün gruplarında GFP'li mezankimal kök hücrelerin varlığı belirlenmiştir. Böylece MKH uygulaması ile GFP'li MKH'lerinin canlı olarak hasarlı bölgeye nakil edildiği gösterilmiştir. Ratların soleus kasında oluşturulan kas hasarlı bölgede MKH'lerinin, morfolojik olarak kas hücrelerine farklılaştığı görülmüştür. K grubu ile karşılaştırıldığında KH+MKH gruplarında doku iyileşmesinin KH gruplara göre daha iyi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.13., Şekil 4.14.).



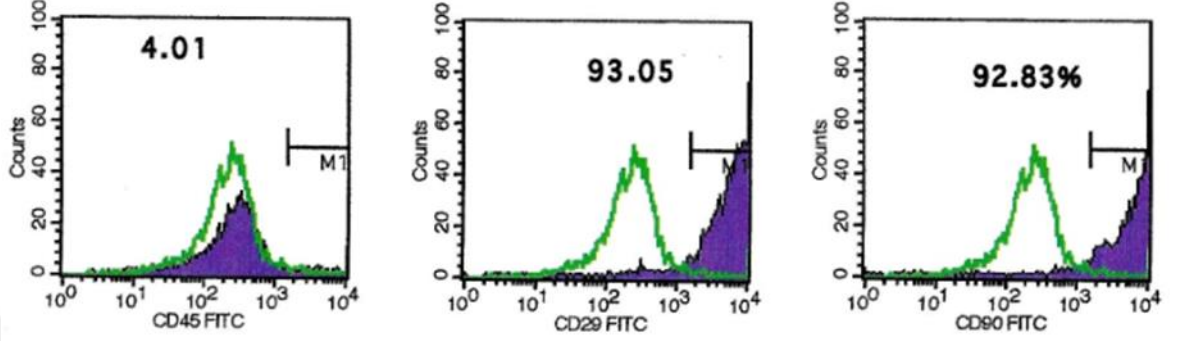
Şekil 4.13. K, KH+MKH gruplarına ait kas doku kesitlerinde GFP için immün boyama sonuçları. Kas hasarı oluşturulduktan 24 saat sonra GFP⁺ MKH uygulaması yapılmış olup KH+MKH grubunda GFP⁺ MKH'lerin (oklar) hasarlı kas dokusunda yerleştiği görülmektedir.



Şekil 4.14. KH+MKH grubunda GFP⁺ MKH'lerin (oklar) hasarlı kas dokusunda yerleştiği görülmektedir.

4.6. Akım sitometrik analiz sonuçları

Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akış sitometri cihazında okutulmuş ve analizi BD Cell Quest TM software programı ile gerçekleştirilmiştir.

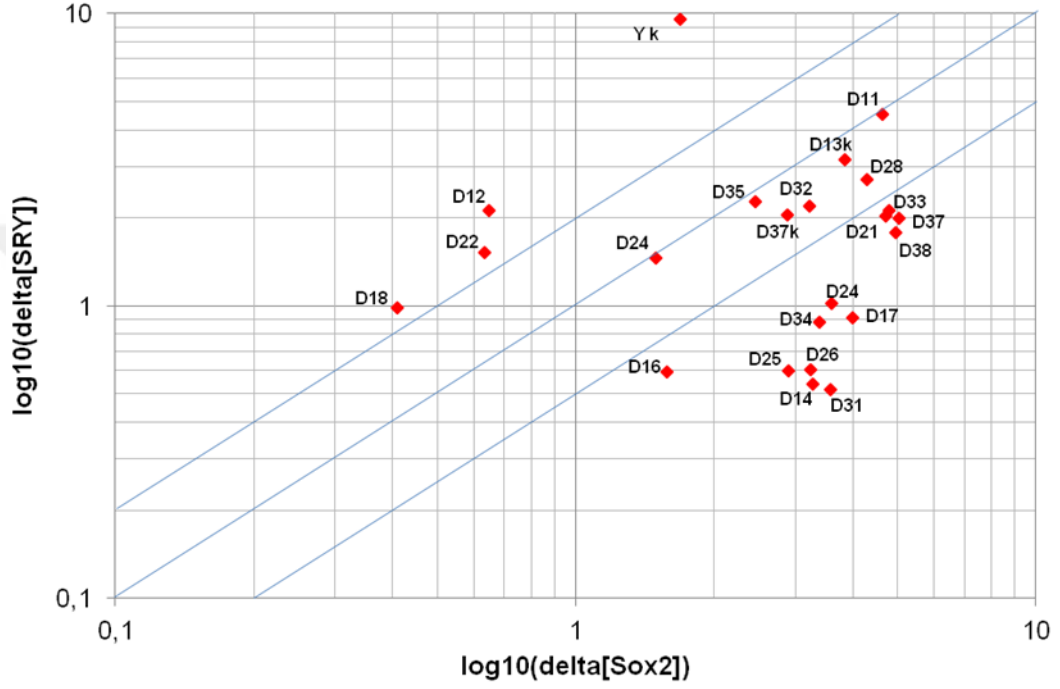


Şekil 4.15. Akım sitometrik analiz sonuçları

4.7. Y-Kromozomu Taşıyan Hücrelerin Tespiti

MKH nakli yapılan KH+MKH grubu ratların soleus kaslarından alınan dokular KH+MKH 7 grubu D1, KH+MKH 14.grubu D2, KH+MKH grubu D3 olarak ve her grupta hayvanlarda numaralandırılarak etiketlenmiştir (Örneğin D1.8; KH+MKH+7. grubundaki 8. deney hayvanı olarak etiketlenmiştir). Ratlardan alınan kas dokularının DNA izolasyonu sonrasında örneklerde gerçek zamanlı (Real-Time) PCR yöntemi ile Y-kromozom belirteci SRY genin varlığı belirlenmiştir. Çoğalma sonrasında örneklerin SRY (Y kromozomu) ve Sox2 (3. kromozom) genlerinin oranları karşılaştırılmıştır. Marjinal değer aralığında SRY pozitif olan örnekler grafik alanında mavi hat aralığında belirtilmiştir (Şekil 4.15.). Bu alanın solunda yer alan örnekler yüksek pozitif (dokuda SRY+ hücre sayısı yüksek) oranına sahipken sağında yer alan örnekler az sayıda SRY+ hücre barındırmaktadır. Grafikte SRY geni taşımayan (negatif) örnekler gösterilmemiştir. D2.3, D2.8, D3.1 ve dişi sıçan hücrenin DNA'sı (negatif kontrol) Sox2 geni taşıdığı ama SRY geni içermedikleri belirlenmiştir. Örneğin tamamı SRY+ hücrelerden oluşan Y- (pozitif kontrol) en yüksek SRY/Sox2 oranını vermiştir. D1.5 ve D2.7 örnekleri yetersiz olduklarından incelenememişlerdir.

Doku içerisinde nakil yapılan hayvanın hücreleri ve nakledilen hücreler karışık olarak bulunduğundan SRY geni oranı her örnek için farklı çıkmıştır. En yüksek SRY geni oranı beklendiği gibi erkek hayvanın örneklerinde (pozitif kontrol) rastlanılmıştır. Nakledilen hücrelerin doku içerisindeki migrasyonu ve alınan doku örneğinin nakil yapılmış bölgeden uzaklığı gibi değişkenler analiz edilen hücre topluluğu içerisindeki SRY+ hücrelerin oranını değiştirmiştir (Şekil 4



Şekil 4.16. Hücre nakli sonrasında dokularda Y-kromozomu taşıyan hücrelerin tespiti

5. TARTIŞMA

Serbest radikal molekülleri eşlenmemiş elektron içeren, çok kararsız, diğer moleküllerle çok hızlı reaksiyona giren ve kimyasal olarak kararlı hale gelebilmek için elektron almaya gereksinim duyan moleküllerdir (Gökpınar vd, 2006). Normal metabolizmanın sürdürülmesi ve hücrelerde enerji üretimi için zorunlu birçok reaksiyonda serbest radikaller üretilmektedir (Akdoğan vd, 2000). Farklı metabolik reaksiyonlarda oksijen tüketimi nedeniyle oluşan (Elmaksoud vd, 2015) serbest radikaller çeşitli dış etkenler aracılığı ile de meydana gelebilir (Çakatay & Kayalı, 2006). Serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden makrofaj, nötrofil gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da fazla üretimi hücre ölümü ve doku hasarı ile sonuçlanmaktadır (Altan vd, 2006; Halliwell & Gutteridge, 1992).

ROT'leri oldukça yüksek reaktiviteye sahip moleküller olup başta mitokondri olmak üzere hücre organellerinde gerçekleşen normal metabolizma sonucunda oluşurlar. Ayrıca iskemi-reperfüzyon, inflamasyon, radyasyon, yaşlanma, yüksek oksijen basıncı ve kimyasal ajanlara maruz kalma gibi nedenlere bağlı olarak da üretilirler (Özcan vd, 2015). Düşük derişimlerdeki ROT'leri, hücrelerin antioksidan sistemleri tarafından inaktive edildiklerinden önemli toksik etkilere neden olmazlar. Oksijen radikallerininin fazla yapımının neden olduğu etkilerin toplamı oksidatif stres olarak tanımlanır (Kılınç & Kılınç, 2002). Oksidatif stres sonucu oluşan ROT'leri, hücre içi proteinler üzerinde geri-dönüşümlü veya geri-dönüşümsüz oksidatif hasara yol açarlar (Özcan vd, 2015).

Çeşitli mekanizmalar sonucu ortaya çıkan serbest radikallere karşı vücutta doğal bir savunma mekanizması vardır. Bu savunma mekanizmasını oluşturan bileşiklere antioksidanlar denir (Gökpınar vd, 2006). SOD, CAT ve GSH-Px'in antioksidan aktiviteleri enzimatik antioksidan savunma olarak adlandırılmaktadır (Dündar & Aslan, 2000; Altan vd, 2006). Antioksidanlar düşük konsantrasyonlarda okside edilebilen ve diğer bir substratın oksidasyonunu azaltan, engelleyen, oksidasyona karşı mücadele eden maddelerdir (Çaylak, 2011). Hem direkt, hem de dolaylı olarak ilaçların, ksenobiyotiklerin, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir (Mercan, 2004). Sağlıklı hücreler, SOD, GSH-Px ve CAT gibi sellüler antioksidan enzimleri

kullanarak serbest radikalleri ortadan kaldırırlar (Aksoy, 2002; Kılınç & Kılınç, 2002).

Serbest radikallere karşı ilk savunma SOD enzimi ile gerçekleşir (Seven & Candan, 1996). SOD, oksijenden oluşan ilk reaktif ürün olan süperoksit anyonunun moleküler oksijene ve daha az reaktif bir ürün olan hidrojen perokside dönüşümünü katalizler (Derviş, 2011).

K grubuna göre, deney gruplarının SOD enzimi aktivite değerleri karşılaştırıldığında (Çizelge 4.1.) sadece kas hasarı oluşturulan KH+7 grubunda SOD değeri K grubuna göre düşük iken KH+14 ve KH+21 grubu değerleri artış göstererek K grubu değerlerine yaklaşmıştır. Kas hasarı oluşturulup 24 saat sonra lokal olarak MKH uygulanan KH+MKH gruplarının SOD aktivite değerleri, K ve KH gruplarına göre daha düşük bulunmuştur. K grubuna göre, KH+MKH+21 grubu SOD aktivitesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı (p: 0,038) bulunmuştur. KH+MKH gruplarında, K ve KH gruplarına göre SOD enzim aktivitesindeki azalmanın ortamda oksidatif stresin azalmasına bağlı olduğu düşünülmüştür.

Potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'in derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir (Kılınç & Kılınç, 2002). Memeli hücrelerinde H_2O_2 ' in uzaklaştırılması GSH-Px ve CAT enzimleri tarafından gerçekleştirilir (Davies, 2000).

K grubu ve deney gruplarının CAT enzimi aktivite değerleri (Çizelge 4.2.) karşılaştırıldığında K grubuna göre deney gruplarının tümünde CAT enzim aktivitesinde artış bulunmuştur. Bu sonuç, oluşturulan kas hasarı nedeniyle radikal oluşumunun arttığını buna bağlı olarak CAT enzim aktivitesinde de artış olduğunu düşündürmüştür. K grubuna göre KH+14 grubunda enzim aktivitesindeki artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p: 0,030). K grubuna göre KH+MKH+14 grubu CAT aktivitesindeki artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p: 0,010). Özellikle KH ve KH+MKH gruplarının 14. gün değerlerindeki bu anlamlı artış dikkat çekmiştir. Kas hasarı oluştuktan sonra 14. gün H_2O_2 oluşumunun arttığını düşünülmüştür. KH+14 grubu enzim aktivisinde artışın KH+21 grubunda az miktarda düşme olmasına rağmen K grubuna göre yüksek olduğu görülmüştür. CAT enzim değerleri KH+MKH+14 grubunda arttıktan sonra KH+MKH+21 grubunda azalmış ve K grubu değerlerine yakın değerler bulunmuştur. Bu durum kas hasarı oluşturulan bölgeye MKH uygulamasının 21. günde CAT aktivitesinin normal değere yaklaştırdığını düşündürmektedir.

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) hidrojen peroksitin ve organik hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlar (Gündüz vd, 2001).

GSH-Px enzimi aktivite değerleri karşılaştırıldığında (Çizelge 4.3.) K grubuna göre deney gruplarında GSH-Px aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Bu artışın kas hasarına bağlı olarak oluşan radikaller nedeniyle olduğu düşünülmüştür. K grubuna göre KH+14 (p: 0,038) ve KH+MKH+14 (p: 0,007) gruplarında GSH-Px enzim aktivitesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. CAT enzim aktivitelerinde de KH+14 ve KH+MKH+14 gruplarında anlamlı artış belirlenmişti. K grubuna göre KH+ 14 ve KH+MKH+14 gruplarında GSH-Px ve CAT enzim değerlerindeki anlamlı artış dikkat çekicidir. Memeli hücrelerinde H₂O₂' in uzaklaştırılması CAT ve GSH-Px enzimleri tarafından gerçekleştirildiğine (Davies, 2000) göre kas hasarı oluşturulduktan sonraki 14. günde H₂O₂'in bölgede arttığı, buna bağlı olarak CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin de arttığı söylenebilir. Bu sonuç, CAT ve GSH-Px enzim aktiviteleri açısından MKH uygulamasının 14. günde fark yaratmadığını düşündürmüştür. K grubuna göre KH+21 grubunda GSH-Px enzim aktivitesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p: 0,043). GSH-Px enzim değerlerinde KH+MKH+21 değerlerinin deney grupları değerlerinde en düşük seviye olduğu ve K grubu değerlerine yakın olduğu görüldü. CAT enzim değerlerinin de KH+MKH+21 grubunda azalmış ve K grubu değerlerine yakın değerler olduğu belirlenmişti. MKH uygulamasının yapıldığı KH+MKH+21 grubunda CAT ve GSH-Px enzim değerlerinin azalması ve K grubu değerlerine yakın seviye inmesi 21. günde MKH uygulamasının oksidatif stresi azalttığı ve antioksidan bir etki gösterdiğini düşündürmüştür. K grubuna göre KH+21 grubunda GSH-Px enzim aktivitesindeki anlamlı artış bu düşüncemizi desteklemiştir. SOD enzimi aktivite değerlerinde KH+MKH+21 grubunda ki anlamlı azalma H₂O₂'in ortamda azaldığını göstermiştir. Azalan SOD aktivitesine bağlı olarak KH+MKH+21 grubunda CAT ve GSH-Px aktivitelerinin azalarak K grubu değerlerine yaklaştığı düşünülmüştür.

Lanza vd (2009), santral sinir sisteminin demiyelizasyonu, inflamasyonu ve sinir dejenerasyonu ile karakterize olan ve etyolojisinde serbest radikallerinde etkili olduğu insandaki multipl sclerosis hastalığının deneysel modeli olan otoimmün ensefalomiyelitte MKH çalışmışlardır. Çalışmalarında, oksidatif strese maruz bırakılan nöroblastoma hücrelerinde *in vitro* olarak MKH'lerin antioksidan ve nöron koruyucu özelliği olduğu sonucuna ulaşmışlardır. MKH'lerin antioksidan özelliği olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. *In vitro* bir çalışmada, MKH'nın

oksidatif strese dirençli olduğu ve bu dirençte ürettiği SOD, GSH-Px ve CAT gibi antioksidan enzimlerin etkisi ile olduğunu belirtmiştir (Poyrazoğlu vd, 2013).

Normal şartlarda hasarlı veya yaşlı hücreler, apoptozis olarak adlandırılan, genetik olarak düzenlenen bir hücre ölüm programıyla kendi kendilerini öldürmektedir (Aktuğ, 2014). Apoptozis süresince kaspazlar önemli yer tutmaktadır. Kaspaz-3 en önemli cellat kaspaz olarak bilinir ve başlatıcı kaspazlar olan kaspaz-8, kaspaz-9 ya da kaspaz-10'un herhangi biri ile aktive edilir (Eröz ve vd, 2012).

Çalışmamızda apoptozis belirteci olarak kaspaz-3 enzim aktivite değerleri ölçülmüştür (Çizelge 4.4.). K grubuna göre deney gruplarında kaspaz-3 aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Deney gruplarında kas hasarı oluşturulmuş olduğu için bu sonuçların olağan olduğu düşünülmüştür. KH+21 grubu değerlerinin K grubu değerlerine yakın olduğu belirlenmiştir. K grubuna göre MKH uygulanan KH+MKH+14 (p: 0,009) ve KH+MKH+21 (p: 0,003) değerlerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. KH+MKH+14 ve KH+MKH+21 gruplarında kaspaz-3 enzim değerlerindeki bu anlamlı artışın nedeninin hasarlı hücrelerin apoptozise yönelmesi olduğu düşünülmüştür. Tüm gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında KH+21 grubuna göre KH+MKH+21 grubu kaspaz-3 enzim aktivite değerlerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p: 0,006). K grubuna göre, KH+MKH+21 grubundaki anlamlı artış ile K grubu değerlerine yakın değerler veren KH+21 grubuna göre KH+MKH+21 grubundaki anlamlı artış (p: 0,003) bu düşüncemizi desteklemektedir.

MKH uygulamasının anti-apoptotik özelliği olduğunu belirten yayınlar bulunmaktadır (Selek vd, 2014; Nyugen vd, 2010). Çalışmamızda ise MKH uygulamasının 14. gün ve 21. günde apoptozisi arttırdığı yönünde sonuçlara ulaşılmıştır. Elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıkların uygulanan deney protokolleri, incelenen doku örneklerinden ileri gelebileceği düşünülmüştür.

Şahin vd (2005), kök hücrelerin genler ve dış uyaranlar gibi etkenlerle aldıkları sinyallere göre farklı hücre tiplerine dönüşebildiğini belirtmişlerdir. Vücudumuzdaki herhangi bir hücre grubunda hasar veya ölüm meydana geldiğinde, kök hücrelerin hangi hücreye ihtiyaç varsa o hücreye dönüştüğünü açıklamışlardır. İnan & Özbilgin (2009), MKH'lerin, fibroblast, iskelet kası hücreleri gibi mezodermal hücreler ile mezodermal kökenli olmayan çeşitli hücre tiplerine farklılaştıklarını ve kök hücrelerin bir dokunun işlevsel olarak yeniden yapılandırılması özelliğine sahip olduğunu belirtmişlerdir. MKH'lerin, yetişkin

omurgalı türlerinin iskelet dokusuna, kemik, kıkırdak, ilik stroması ve yağ hücrelerine farklılaştığı bir çok kaynakta bildirilmiştir (Malgieri vd, 2010; Pittenger vd, 1999; Alhadlaq & Mao,2003). Can & Karahüseyinoğlu (2009), MKH'lerin, en belirgin özelliklerinden birisinin alıcıda inflamasyonu ve immünolojik yanıtları baskılaması olduğunu belirtmişlerdir. Uygulanan MKH'lerin hasarlı bölgede özellikle hipoksik, inflamasyonlu ve apoptotik alanlara yerleşerek dokunun rejenarasyon ve tamirini oluşturmaktadır. Hasarlı bölgeye yerleşen MKH'ler biyoaktif maddeler salarak lokal immün sistemin baskılanmasını, anjiogenezin artmasını, serbest radikallerin azalmasını, fibrozis ve apoptozisin inhibisyonunu sağlamakta, ayrıca dokuda bulunan kök hücreler, iyileşmeyi, çoğalmayı ve farklılaşmayı uyarmaktadır (Kıroğlu & Aksu, 2015). Deniz vd (2015), MKH'leri, diğer kök hücreler gibi kendi kendilerini yenileme ve vücudun diğer hücrelerine dönüşebilme kapasitesine sahip multipotent kök hücreler olarak tanımlamış ve kas, kıkırdak, kemik, yağ dokusu, tendon gibi dokulara farklılaşabildiklerini belirtmişlerdir. Farklılaşma özellikleri yanı sıra trofik, parakrin, anti-apoptotik ve immunomodulator özellikleri nedeniyle hasar sonrası hastaya özel hücreler olarak tanındıklarını belirtmişlerdir.

Deprem, göçük, trafik kazası, iş kazası gibi nedenlerle bir çok insan ezilme tarzı kas hasarına maruz kalmaktadır. Bu tür yaralanmalarda müdahale süresi düşünülerek 24 saat sonra MKH uygulaması yapılmıştır.

GFP'li MKH verilen KH+MKH grubu hayvanlardan alınan kas dokusu kesitlerinde, immünohistokimyasal boyama yapılarak mikroskopik olarak incelemiş ve GFP'li MKH'lerin varlığı görülmüştür. Gerçek zamanlı PCR analizi ile KH+MKH grubu hayvanlardan alınan kas doku örneklerinde büyük çoğunlukla Y-kromozomu taşıyan hücrelerin varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, MKH'lerin hasarlı bölgeye nakil işleminin gerçekleştiğini göstermiştir. Nakledilen hücrelerin doku içerisindeki migrasyonu ve alınan doku örneğinin nakil yapılmış bölgeden uzaklığı gibi değişkenler analiz edilen hücre topluluğu içerisindeki SRY+ hücrelerin oranını değiştirmiştir (Şekil 4.15.).

İmmünohistokimyasal incelemede GFP+ MKH'ler çizgili kas morfolojisinde görülmüştür. Bu sonuçlar bölgedeki hasarlı hücrelerin apoptozise yöneldiği ve GFP+ MKH'lerin de kas hücrelerine dönüşerek bu hasarlı hücrelerin yerini aldığı şeklinde yorumlanmıştır (Şekil 4.13, Şekil 4.14.).

Selek vd (2014), yaptıkları deneysel bir çalışmada, nuks yırtıklarını azaltmak için başvurulan MKH uygulamasının, muhtemel anti-apoptotik etkileri sayesinde tendonun gücünü arttırdığını belirtmişlerdir. MKH uygulamalarının tendon iyileşmesinin geç dönemlerinde perkutan olarak etkili bir şekilde kullanılabileceği şeklinde yorum yapmışlardır.

Nyugen vd (2010), deneysel olarak domuzlarda myokardiyal enfarktüsü takiben koroner damar içi MKH kökenli büyüme faktörleri uygulaması sonrası fibröz doku oluşumu ve apoptozda azalma gözlemlemişlerdir.

Von Roth vd (2012) rat soleus kasında ezilme tarzı kas hasarı oluşturulan ratlara bir hafta sonra selektif damar içi yoldan MKH vermişler ve kontrol grubuna göre kas gücünde anlamlı düzelme tespit etmişlerdir. Ancak sistemik uygulanan MKH'leri soleus kasında histolojik olarak gösterememişlerdir.

Von Roth vd (2013), rat soleus kasında ezilme tarzı kas hasarı oluşturulan ratlara 7 gün sonra lokal şekilde MKH vermişler ve 28 günde kas gücünde anlamlı iyileşme tespit etmişlerdir. Ancak histolojik olarak fibrozis açısından bir fark görmemişlerdir.

Winkler vd (2012) rat soleus kasında ezilme tarzı kas hasarı oluşturulan ratlara hasar anında ve 7. günde lokal olarak MKH uygulamışlar ve 4 hafta sonra fonksiyonel kas rejenerasyonu kas kasılması açısından bir fark görememişlerdir.

Yapılan bu çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda, hasardan 24 saat sonra GFP+ MKH nakli gerçekleştirildi ve 7., 14. ve 21. günlerde SOD, CAT, GSH-Px ve kaspaz-3 enzim aktiviteleri ölçülmüştür. MKH'lerin hasarlı bölgeye nakil işleminin gerçekleştirildiği, SRY ve Sox2 genlerinin oranlarının karşılaştırılması ve GFP+ MKH'lerin immunohistokimyasal boyanması ile gösterilmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda K grubuna göre, SOD enziminde KH+MKH+21.günde istatistiksel olarak anlamlı azalma ile CAT ve GSH-Px enzimlerinde KH+MKH+21.gün değerlerinin K grubu değerlerine en yakın değerler olması MKH uygulamasının 21. günde antioksidan özellik gösterdiği şeklinde yorumlanabilir. CAT ve GSH-Px enzim değerlerinin KH+14. gün ve KH+MKH+14.gün gruplarında K grubuna göre gösterdiği istatistiksel olarak anlamlı artış dikkat çekici bulunmuştur. Kas dokusunda hasar oluşturulduktan sonra 14. günde oksidatif stresin arttığı buna bağlı olarak antioksidan enzimlerin aktivitesinde de artış olduğu düşünülmüştür. GSH-Px enzim değerlerinde K grubuna göre KH+21. gün grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuşken KH+MKH+21.gün değerlerinin K grubu değerlerine en yakın değerler olması MKH uygulamasının 21. günde antioksidan özellik gösterdiği yorumumuzu desteklemiştir. Kaspaz-3 enzim aktivite değerlerinde K grubuna göre KH+MKH+14.gün ve KH+MKH+21. gün değerlerindeki istatistiksel olarak anlamlı artış kas hasarı oluşturulan bölgedeki hasarlı hücrelerin apoptozise yöneldiği ve MKH'lerin kas hücrelerine dönüşerek bu hasarlı hücrelerin yerini aldığı şeklinde yorumlanmıştır. K grubu değerlerine yakın değerler veren KH+21. güne göre KH+MKH+21. gün grubundaki kaspaz 3 enzim değerlerindeki anlamlı artış bu yorumumuzu desteklemektedir.

Çalışmamızda 7., 14., ve 21. günlerdeki enzim aktivite düzeylerine göre tartışma yapılmıştır. Bu çalışmadan elde edilecek sonuçların insanlarda, trafik kazaları, iş kazaları, deprem, göçük gibi nedenlerle oluşabilecek kas hasarlarının kök hücre ile tedavi edilebilmesi noktasında katkısı olabileceği düşünülmüştür. Elde edilen bilgilerin, farklı bir çok çalışmaya da katkısı olacağı düşünülmektedir. Kas hasarında MKH uygulamasının apoptozis ve antioksidan enzimler üzerine daha uzun dönemdeki etkisinin araştırılmasının faydalı olacağı kanısındayız.

7. KAYNAKLAR

- Akar A R (2009). Kardiyovasküler hastalıklarda kök hücre uygulamaları. Kök hücre biyolojisi ve klinik uygulamalar. *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları*, 20: 77-85.
- Akdam, H & Alp A (2015). Ezilme sendromu-Crush syndrome. *Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi*, 25(2):71-77.
- Akdoğan M, Gültekin F, Altuntaş İ, Delibaş N & Kaleli S (2000). Tavşanlarda deneysel olarak aşırı demir yüklemesiyle oluşturulan oksidatif hasarın karaciğer dokusunda yaptığı biyokimyasal değişiklikler. *Türk Biyokimya Dergisi*, 25(1):29-35.
- Aksoy Y (2002). Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *Türkiye Klinik Tıp Bilimleri Dergisi*, 22: 442-448.
- Aktuğ H (2014). Apoptozis ve hücre döngüsü. *Ege Journal of Medicine*, 53(1):60-64.
- Akyol Ö (2004). Şizofrenide oksidatif stres, *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5 (Ek Sayı): 15-25.
- Alhadlaq A & Mao J J (2003). Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *Journal of Dental Research*, 82:951-956.
- Altan N, Dinçel A S & Koca C (2006). Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry)*, 31(2): 51-56.
- Anonim (2004). Türkiye Bilimler Akademisi Raporları (TÜBA) . Kök hücre araştırmalarında güncel kavramlar. Tanımlar ve kök hücre elde etme yöntemleri. 7: 9-13, Ankara.
- Anonymus (2015a). Free radical.
http://www.bionutric.com/web/products/index_iframe.asp?page=biogrape.
(Erişim tarihi: 19.11.2016).
- Anonymus (2015b). mechanism-of-irreversible-cell-injury.
<https://theartofmed.wordpress.com/2015/06/11/mechanism-of-irreversible-cell-injury/> (Erişim tarihi: 19.11.2016).
- Anonymous (2016a). The cleavage divisions and the migration of the embryo through the tube.
<http://www.embryology.ch/anglais/evorimplantation/furchung01.html>
(Erişim tarihi: 19.11.2016).
- Anonymous (2016b). Skeletal muscle.
<https://global.britannica.com/science/skeletal-muscle>
(Erişim tarihi: 19.11.2016)

- Anonymous (2016c). Soleus muscle.
<http://neurodojo.blogspot.com.tr/2012/06/compete-off-beat-to-delete.html>
(Erişim tarihi:19.11.2016).
- Asgari S, Pournasr B, Salekdeh G H, Ghodsizadeh A, Ott M & Baharvand H (2010). Induced pluripotent stem cells: a new era for hepatology. *Journal of Hepatology*. 53:738-751.
- Ayala A, Muñoz M F & Argüelles S (2014). Lipid Peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 360438:31.
- Baksh D, Song L & Tuan R S (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8(3):301-316.
- Başaran A (1999). *Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı* (Genişletilmiş 5. Baskı). Güneş & Nobel Tıp Kitabevi. Bursa.
- Baykal Y, Özet G & Kocabalkan, F (1998). Apoptozis ve İmmün Sistem. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 18:11-14.
- Beksaç M (2010). Kök hücre. *Bilim ve Teknik TUBİTAK*, 511: 36-41.Ankara.
- Birişik A, Kökçin A & Karataş F (2011). Arı poleninde redükte ve okside glutatyon miktarları. *Fırat University. Journal of Science*, 23(2): 107-110.
- Burçak, G & Andican, G (2004). Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 35(4): 159-169.
- Can A (2014). *Kök Hücre* (1.Baskı), Akademisyen Kitapevi, Ankara.
- Can, A & Karahüseyinoğlu S (2009). Erişkin kök kücrelerin farkanmasındaki hücresel ve moleküler mekanizmalar. Kök Hücre: Biyolojik ve Klinik Yaklaşım. *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1(5): 57-65.
- Can, A (2009). Kök hücre tanımları. Kök hücre biyolojisi ve klinik uygulamalar. *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları*, 20: 15-22.
- Can, A (2010). Mezankimal kök hücrenin kökeni ve gelişimi. 1. *Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Sempozyumu*, 29 Eylül-01 Ekim 2010. Özet Kitabı, 15-16, Samsun.
- Caplan A I (1991) Mesenchymal stem cell. *Journal of Orthopaedic Research*, 9(5): 641-650.
- Ceylaner G & Ceylaner S (2010). Kromozomla Uygunsuz Cinsiyet ve Cinsiyet Farklılaşma Bozuklukları (Sex Reversal and Disorders of Sexual Development). *Türkiye Klinikleri Journal of Gynecology and Obstetrics Special Topics*. 3(2):91-9

- Çakatay U & Kayalı R (2006). Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 37: 162–167.
- Çalışkan M (2000). Apoptosis: Programlanmış hücre ölümleri. *Turkish Journal of Zoology*, 24 (Ek Sayı): 31-35.
- Çamurdanoğlu B Z & Kansu E (2009). Erişkin ve hematopoetik kök hücreler. Kök Hücre: Biyolojik ve Klinik Yaklaşım. *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1(5): 41-51.
- Çaylak E (2011). Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*: 9 (1): 73-83.
- Çetinkaya D U (2009). Mezankimal kök hücreler. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları*, 20: 53-62.
- Dansen T B & Wirtz, K W A (2001). The peroxisome in oxidative stress. *IUBMB Life*, 51: 223–230.
- Davies K J A (2000). Oxidative stres, antioxidant defenses and damage removal, repair and replacement systems. *IUBMB life*, 50: 297-289.
- Demirel, S, Çora, T, Durakbaşı, G., Zamani, A G, Acar, H & Acar A (1997). Seksüel gelişme bozuklukları olan olgularda seks kromozom düzensizliklerinin değerlendirilmesi. *Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 13(1): 13-16.
- Deniz G Ç, Durdu S & Akar A R (2015). Kök Hücre Tedavileri. *Türkiye Klinikleri Journal of Cardiovascular Surgery (Special Topics)*, 7(1):18-23.
- Derviş E (2011). Oral Antioksidanlar. *Dermatoz*, 2(1): 263-267.
- Docherty K, Bernardo A S & Vallier L (2007). Embryonic stem cell therapy for diabetes mellitus. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18: 827–838.
- Dreher D & Junod A F (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of Cancer*, 32A(1), 30-38.
- Dündar Y & Aslan R (2000). *Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar*. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, 107, Afyon.
- Edwards RG, Bavister B D & Steptoe P C (1969). Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature*, 221: 632-635.
- Elçin Y M (2009). Embriyonik Kök Hücreler. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları*, 20: 23-28
- Elmaksoud S A E M A, El-Bassyouni H, Afifi H, Thomas M M, Ibrahim A A, Shalaby A, Hamid T A A, Hamid N A & El-Ghobary H (2015). Detection and quantification of free Radicals in peroxisomal disorders: A comparative study with oxidative stress parameters. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(11): 17-20.

- Eröz R, Karataş A, Alkoç O A, Baltacı D, Oktay M & Çolakoğlu S (2012). Apoptozis hakkında bilinenler (Literatür Taraması). *Düzce Tıp Dergisi*; 14(2):87-101.
- Evans M J & Kaufman M H (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292:154-156.
- Fang Y Z, Yang S, & Wu G (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10): 872-879.
- Finaud J L G & Filaire, E (2006). Oxidative stress relationship with exercise and training. *Sports Medicine*, 36(4): 327-358.
- Friedenstein AJ, Gorskaja J F & Kulagina N N (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology*, 4(5):267-274.
- Fuchs E, Tumber T & Guasch G (2004). Socializing with the neighbors: Stem Cells and their niche. *Cell*, 116: 769-778.
- Gökçimen A, Öztürk Ö & Karaöz E (1999). Rejenerasyon. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, 19:169-183.
- Gökpinar Ş, Koray T, Akçiçek E, Göksan T & Durmaz Y (2006). Algal antioksidanlar. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 23: 85-89.
- Gurdon J B (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of embryology and experimental morphology*, 10(4): 622-640.
- Gülen H (2009). Hematopoetik kök hücreler. Kök Hücre: Biyolojik ve Klinik Yaklaşım. *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1(5), 67-80.
- Gültekin N, Karaoğlu K & Küçükateş E (2008). Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyoloji Derneği Araştırmaları*, 36(2):120-130.
- Gündüz K, İnanır I, Türel A, Uyanık B S & Öztürkcan S (2001). Psöriasisli hastalarda süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesi. *Türkiye Klinikleri Dermatoloji*, 11: 207-210.
- Halliwell B & Gutteridge J M C (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry Journal*, 219: 1-14.
- Halliwell B & Gutteridge J M C (1992). Free Radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119(6), 598-620.
- Halliwell B & Gutteridge J M C (2001). Free radicals in biology and medicine (Third Edition). *Oxford Science Publications*, 22- 24.

- İnan S & Özbilgin K (2009). Kök Hücre Biyolojisi. *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1: 11-23.
- İskender B & Canatan, H (2013). Induced pluripotent stem cells and cell therapy *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 4(4): 550-561.
- Järvinen T A H, Järvinen T L N, Kääriäinen M, Kalimo H & Järvinen M (2005). Muscle injuries-biology and treatment. *The American Journal of Sports Medicine*, 33(5):745-764.
- Kahraman A, Çakar H, Vurmaz A, Gürsoy F, Koçak S & Serteser M (2003). Ağır egzersizin oksidatif stres üzerindeki etkisi. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 2:33-38.
- Kansu E (2005). Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 36: 191-197.
- Karaöz E (2009). Erişkin kök hücre plastisitesi: sanılanlar ve gerçekler. Kök Hücre : Biyolojik ve Klinik Yaklaşım. *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1 (5): 81-143.
- Karaöz E (2010). Laboratuvarından kliniğe mezankimal kök hücreler. 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Sempozyumu, Özet kitabı, 29 Eylül-01 Ekim 2010, Samsun.
- Karaöz E, Aksoy A, Ayhan S, Sarıboyacı A, Kaymaz F & Kasap M (2009). Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and Cell Biology*. 132: 533. DOI 10.1007/s00418-009-0629-6.
- Karaşahin T (2012). Embriyonik Kök Hücreler. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9: 65-71.
- Kaya C, Çalışkan Y & Yönden Z (2012). Apoptosis. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*. 3: 11.
- Kerr J F, Wyllie A H & Currie A R (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26: 239-257.
- Kılınç K & Kılınç A (2002). Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33:110-118.
- Kıroğlu O E. & Aksu F (2015). Nörodejeneratif hastalıklarda mezenkimal kök hücre uygulamaları. Application of mesenchymal stem cells in neurodegenerative diseases. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi-Archives Medical Review Journal*; 24(1):41-55.
- Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu S J & Lanza R (2006). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*, 444: 481-485.

- Koçyiğit A & Çevik M (2011). Memeli reproduktif dokuları,gamet hücreleri ve embriyolarında apoptozis. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 8(1): 33-41
- Kozanoğlu İ, (2010). Mezankimal kök hücrelerin ayrıştırılması ve tanımlanması. 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Sempozyumu, Özet kitabı, 29 Eylül-01 Ekim 2010, 17, Samsun.
- Lanza, C, Morando S, Voci A, Canesi L, Principato M C, Serpero L D, Mancardi G, Uccelli A & Vergani L (2009). Neuroprotective mesenchymal stem cells are endowed with a potent antioxidant effect in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 110:1674–1684.
- Lonergan, T, Bavister B & Brenner C (2007). Mitochondria in stem cells. *Mitochondrion*, 7: 289–296.
- Malgieri A, Kantzari E, Patrizi M P & Gambardella S (2010). Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 3(4): 248-269.
- Marklund S (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(24): 7634-7638.
- Martin K R & Barret J C (2002). Reactive oksijen species as double-edged swords in cellular processes:low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Human & Experimental Toxicology*, 21: 71-75.
- Matziolis G, Winkler T, Schaser K, Wiemann M, Krockner D, Tuischer J, Perka C & Duda G (2006). Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats. *Tissue Engineering*, 12 (2): 361-367.
- McCord J M & Fridovich I (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, 244 (22): 6049-6055.
- Memişoğulları R (2005). Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*,3: 30-39.
- Mercan U (2004). Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzüncü yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1-2):91-96.
- Mollura D J, Hare J M & Rabb H (2003). Stem-cell therapy for renal diseases. *American Journal of Kidney Diseases*, 42 (5): 891-905.
- Nalbant S (2006). Yaşlanmanın Biyolojisi. *Türkiye Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi*, 52 (Özel Ek A):12-17.
- Nelson D L & Cox M M (2005). *Lehninger Biyokimyanın ilkeleri*. (Çev. Kılıç N). Palme Yayıncılık. (Orjinal eserin yayın tarihi, 2001). S1, Ankara.
- Nguyen B K, Maltais S, Perrault L P, Tanguay J F, Tardif J C, Stevens L M, Borie

- M, Harel F, Mansour S & Noiseux N (2010). Improved function and myocardial repair of infarcted heart by intracoronary injection of mesenchymal stem cell-derived growth factors. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 3:547–558. doi: 10.1007/s12265-010-9171-0.
- Öğüt S, Polat M & Alanoğlu E G (2011). Kan bağışçılarının kanlarındaki malondialdehit ve redükte glutatyon seviyeleri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 18(4): 128-131.
- Özcan O, Erdal H, Çakırca G & Yönden Z (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3): 331-336.
- Öztürk F (2002). Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 9(2) 143-148.
- Von Roth P, Duda G N, Radojewski P, Preininger B, Strohschein K, Röhner E, Perka C & Winkler T (2012). Intra-Arterial MSC Transplantation Restores Functional Capacity After Skeletal Muscle Trauma. *The Open Orthopaedics Journal*, 6: 352-356. doi: 10.2174/1874325001206010352.
- Von Roth P, Winkler T, Rechenbach K, Radojewski P, Perka C & Duda GN (2013). Improvement of contraction force in injured skeletal muscle after autologous mesenchymal stroma cell transplantation is accompanied by slow to fast fiber type shift. *Transfusion Medicine Hemotherapy*, 40(6):425-430. doi: 10.1159/000354127.
- Parlakpınar H, Koç M & Acet A (2004). Yaşlanmada apoptozis ve melatoninin etkisi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, 24:62-67.
- Petersen S V, Oury T D, Valnickova Z, Thøgersen I B, Højrup P, Crapo J D & Enghild J J (2003). The dual nature of human extracellular superoxide dismutase: One sequence and two structures. *PNAS*, 100 (24): 13875–13880.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca J, Moorman M, Simonetti D, Craig S & Marshak DR (1999). Multilineage potential of mesenchymal cells. *Science*, 284: 143–147.
- Poyrazoğlu MH, Tülpar S, Gündüz Z, Baştuğ F, Özbilge H, Çetin E, Torun Y, Akgün H, Kaya E, Düşünsel R & Düdükçü M (2013). Oxidant-antioxidant status of rats treated with mesenchymal stem cells in chronic peritoneal dialysis. *Erciyes Medicine Journal*, 35(4): 224-8.
- Selek Ö, Buluç L, Müezzinoğlu B, Ergun R E, Ayhan S & Karaöz E (2014). Mezenkimal kök hücrelerin anti-apoptotik etkileri ve tendon iyileşmesi (Hayvan çalışması), *Acta Orthopaedica Traumatologica Turcica*, 48(2):187-195.
- Seven A & Candan G (1996). Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 27: 41-52.
- Sever L (2009). Ezilme Sendromu. *Türk Pediatri Arşivi Dergisi*, 44:43-47.

- Sevim H & Gürpınar Ö A (2012). İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ve uygulamaları. *Marmara Medical Journal*, 25:5-9.
- Seydel G Ş & Aksoy K (2012). Endoplazmik retikulum stresi ve apoptozis mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi (Archives Medical Review Journal)*, 21(4): 221-235.
- Shifman A M, Giuseppe & Basetto F (Editors) (2014). *Stem Cells in Aesthetic Procedures*. 3-15, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-45207-9_1
- Şahin F, Saydam G & Omay S B (2005). Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, 15(1): 48-56.
- Takahashi K & Yamanaka S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663–676.
- Tamer L, Pola, G, Eskandari G, Ercan B & Atik U (2000). Serbest Radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1:52-58.
- Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, Waknitz M A, Swiergiel J J, Marshall V S & Jones J M (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282:1145-1147.
- Tosun, M., Aktan, M., Duman, S., Erdoğan, E & Taşkapu H (2000). İntrauterin Dönemde Dişi ve Erkek Gonadal Yapıların Gelişimine Etkin Olan Faktörler. *Türkiye Klinik Tıp Bilimleri*, 20: 40-46
- Tuna M (2009). Solid tümörlerde ve lösemilerde kanser kök hücreleri. *Türk Onkoloji Dergisi*, 24(1): 42-47.
- Ural A U (2006). Kök Hücreler. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi*, 5(3-4): 140-145.
- Valko M, Morris H & Cronin M T D (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12: 1161-1208.
- Vincent AM, Russell JW, Low P & Feldman E L (2004). Oxidatif stress in the pathogenesisin diabetic neuropathy. *Endocrine Reviews*, 25(4): 612–628.
- Wei Y H &. Pang C Y (2005). The Role of Mitochondria in human aging process. *Biotech International*, 17: 8-13.
- Weissman I L (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic barriers and opportunities. *Science*, 287: 1442-1446.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind A J & Campbell KH (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385 :810-813.

Winkler T, von Roth P, Radojewski P, Urbanski A, Hahn S, Preininger B, Duda G N & Perka C (2012). Immediate and delayed transplantation of mesenchymal stem cells improve muscle force after skeletal muscle injury in rats. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 6 (Suppl 3): 60-67. doi: 10.1002/term.1542.

Yegin S Ç & Mert N (2013). Deneysel olarak diyabet oluşturulmuş sıçanlarda Hba1c, Mda, Gsh-Px ve Sod miktarlarının tayini. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi*, 24 (2): 51-54.



8. ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Rukiye Demir
Doğum Yeri : Samsun
Doğum Tarihi : 6/8/1971
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Giresun Atatürk Lisesi/1988
Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi/ Fen Edebiyat Fakültesi/ Biyoloji/1993
Yüksek Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Eylül 2005/Ocak 2008

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Milli Eğitim Bakanlığı / Samsun/ Çarşamba /Yaycılar Köyü İlkokulu	1996
MEB / Samsun /Çarşamba / Değirmenbaşı İlköğretim Okulu	1998
MEB / Samsun/ Atakum/ Recep Tanrıverdi Lisesi	2005
MEB / Samsun/ İlkadım/ Köksal Ersayın Anadolu Lisesi	2015
MEB / Samsun/ İlkadım/ Samsun Rotary Kulübü Bilim ve Sanat Merkezi	2015

Yayımlar

Demir R, Dıraman E, Karaöz E, Kara N & Eren Z (2015). The Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Application on Antioxidant Enzymes in Rats with Crushed Muscle Damage. *2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies (ICSCCT)*, PP-077, Abstract Book page: 190, 15-18 October, 2015 Antalya, Turkey.

Demir R, Dıraman E & Karaöz E (2016). The Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Applicatio on Caspase 3 Enzyme in Rats With Crushed Muscle Damage. *1st International Cell Death Research Congress*, PP-049, Abstract Book page: 117, 4-7 May 2016, İzmir, Turkey.