

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
CANLILIĞI VE STRES KOŞULLARI
ALTINDAKİ PROLİFERASYONUNDA
KALSİYUM/KALMODULİN-BAĞIMLI
PROTEİN KİNAZ 2 (CaMKII) ENZİM
DEĞİŞİMİNİN BELİRLENMESİ**

TUĞBA ŞAN
TEMEL SİNİRBİLİMLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ
İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2016970084

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
CANLILIĞI VE STRES KOŞULLARI
ALTINDAKİ PROLİFERASYONUNDA
KALSİYUM/KALMODULİN-BAĞIMLI
PROTEİN KİNAZ 2 (CaMKII) ENZİM
DEĞİŞİMİNİN BELİRLENMESİ**

TEMEL SİNİRBİLİMLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞBA ŞAN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Pınar Akan

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube

Müdürlüğü tarafından x kodu ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2016970084

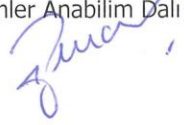
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler Anabilim Dalı,
Yüksek Lisans programı öğrencisi Tuğba ŞAN '**MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN CANLILIĞI VE STRES KOŞULLARI ALTINDAKİ
PROLİFERASYONUNDA KALSİYUM/KALMODULİN-BAĞIMLI PROTEİN
KİNAZ 2 (CaMKII) ENZİM DEĞİŞİMİNİN BELİRLENMESİ**' konulu
Yüksek Lisans tezini 14.06.2019 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN

Prof. Dr. Pınar AKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sinirbilimler Anabilim Dalı



ÜYE



Doç. Dr. Özlem GÜRSOY ÇALAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÜYE



Prof. Dr. Fatma TANELİ

Celal Bayar Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Gülgün OKTAY

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Cevval ULMAN

Celal Bayar Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1. Kök Hücre	8
2.1.1. Kök Hücre Tipleri	9
2.1.2. Mezenkimal Kök Hücreler	11
2.1.3. Wharton Jölesi Mezenkimal Kök Hücreleri	11
2.2. Kalsiyum Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz Ailesi.....	12
2.2.1. CaMKII	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. Araştırmanın Tipi	15
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	15
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	15
3.4. Araştırmanın Çalışma Materyali	15
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	15
3.6. Veri Toplama Araçları	16
3.6.1. Donör Dışlama Kriterleri.....	18
3.6.2. Göbek Kordonu Temini	18

3.6.3.	Kök Hücre İzolasyonu	19
3.6.4.	Kök Hücre Kültürü	20
3.6.5.	Kök Hücre Karakterizasyon Deneyleri	21
3.6.6.	Kök Hücrelere Stres Modeli Olarak Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Uygulaması.....	25
3.6.7.	KN-93 CaMKII İnhibitör Uygulaması	25
3.6.8.	KN-92 Negatif İnhibitör Uygulaması.....	25
3.6.9.	WJ-MKH'lerinde Oksidatif Stres Modeli Ve CaMKII İnhibisyonu İle Oluşturulan Deney Düzenneği 26	
3.6.10.	Canlılık Testi.....	27
3.6.11.	Proliferasyon Testi.....	28
3.6.12.	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR veya qPZR)	29
3.6.13.	BCA Protein Tayini.....	31
3.6.14.	CaMKII Aktivite Ölçümü	31
3.6.15.	Total Oksidan Ölçümü.....	32
3.7.	Araştırma Planı ve Takvim	34
3.8.	Verilerin Değerlendirilmesi	34
3.9.	Araştırmanın Sınırlılıkları	34
3.10.	Etik Kurul Onayı	35
4.	BULGULAR	36
4.1.	WJ-MKH'lerin Karakterizasyonu.....	36
4.1.1.	Akış Sitometri Deneyi Sonuçları	36
4.1.2.	WJ-MKH'lerin İmmünofloresan Yöntemle Değerlendirilmesi	38
4.1.3.	WJ-MKH'lerin Histokimyasal Boyama İle Değerlendirilmesi	40
4.1.4.	WJ-MKH'lerin RT-PZR Yöntemi İle Değerlendirilmesi	42
4.2.	WJ-MKH'lerin Canlılık Düzeylerinin Belirlenmesi	43
4.2.1.	H ₂ O ₂ Dozunun Belirlenmesi.....	43
4.2.2.	KN-93 İnhibitör ve KN-92 Negatif İnhibitör Dozunun Belirlenmesi.....	47

4.2.3.	WJ-MKH'lere H ₂ O ₂ , KN-93 İnhibitör ve KN-92 Negatif İnhibitör Uygulamasının Canlılık Düzeyine Etkisi	49
4.3.	WJ-MKH'lerin H ₂ O ₂ , KN-93 İnhibitör ve KN-92 Negatif İnhibitör Uygulaması Sonucunda Proliferasyon Düzeylerinin Belirlenmesi	50
4.4.	CaMKII Enzimi İzofom Düzeylerinin RT-qPZR İle Değerlendirilmesi	51
4.5.	CaMKII Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	57
4.6.	Total Oksidan Durumunun Belirlenmesi	60
5.	TARTIŞMA	61
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	66
7.	KAYNAKLAR	68
8.	EKLER	72
8.1.	Ek-1 Gönüllü Bilgilendirme Formu	72
8.2.	Ek-2 Etik Kurul Onayı	75
8.3.	Ek-3 Özgeçmiş	79

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Kullanılan Cihazlar	16
Tablo 2: Kullanılan Kimyasallar	17
Tablo 3: Kullanılan Kitler	18
Tablo 4: Deney grupları ve gruplara uygulanan maddeler	27



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Kök hücrelerin farklılaşma kapasitelerine göre sınıflandırılması.....	10
Şekil 2: İnsan göbek kordonu görünümü (A) ve insan göbek kordonunun iç yapısı (B).....	12
Şekil 3: CaMK'ların hücre içi sinyal yolları [8]	13
Şekil 4: Göbek kordonunun açılmış görüntüsü (A), Wharton jelini bulunduran göbek kordonu parçaları (B), göbek kordonundan elde edilen eksplantlar 6 kuyucuklu plak içerisinde (C) ve petri kabında bulunan daha küçük boyutlardaki eksplantlar (D).	20
Şekil 5: İnsan MKH fonksiyonel tanımlama kiti protokolü.....	22
Şekil 6: MTT kit probunun formazan bileşiğine dönüşümü.....	28
Şekil 7: MTS kit bileşiğinin formazan bileşiğine dönüşümü.....	29
Şekil 8: BCA standart eğri grafiği.....	31
Şekil 9: WJ-MKH'ler ile gerçekleştirilen örnek bir akış sitometri verisinde CD90, CD44, CD105 ve CD73 kök hücrelere özgü yüzey antijenlerinin yüzde oranları.	36
Şekil 10: Eksplant yöntemi ile izole edilmiş WJ-MKH'lerde kök yüzey antijenleri olan CD44, DC73, CD90 ve CD105 antijenlerinin 4. Pasaja kadar pasaj numarasına göre değişim yüzdeleri.	37
Şekil 11: Kök hücrelere özgü hücre yüzey antijenlerinin İF mikroskop 20X büyütmede görüntüleri. .	38
Şekil 12: WJ-MKH'lerin osteojenik hücrelere farklılaştırıldıktan sonraki görüntüleri..	39
Şekil 13: WJ-MKH'lerin adipojenik hücrelere farklılaştırıldıktan sonraki görüntüleri..	39
Şekil 14: WJ-MKH'lerin osteojenik hücrelere farklılaştırıldıktan sonraki görüntüleri..	40
Şekil 15: WJ-MKH'lerin adipojenik hücrelere farklılaştırıldıktan sonraki görüntüleri..	40
Şekil 16: WJ-MKH'lerin kondrojenik hücrelere farklılaştırıldıktan sonraki görüntüleri.....	41
Şekil 17: Agaroz jel elektroforezinde WJ-MKH'lerin karakterizasyonu için kullanılan CD90, CDH2 ve house-keeping gen olan GAPDH genlerinden elde edilen PZR ürünlerinin görüntüleri..	42
Şekil 18: WJ-MKH'lerde 30 dakika H ₂ O ₂ uygulamasının doza bağlı olarak kök hücre canlılığı üzerine etkisi.....	43
Şekil 19: WJ-MKH'lerde 1 saat H ₂ O ₂ uygulamasının doza bağlı olarak kök hücre canlılığı üzerine etkisi.	44
Şekil 20: WJ-MKH'lerde 2 saat H ₂ O ₂ uygulamasının doza bağlı olarak kök hücre canlılığı üzerine etkisi	45
Şekil 21: WJ-MKH'lerde 3 saat H ₂ O ₂ uygulamasının doza bağlı olarak kök hücre canlılığı üzerine etkisi.	46
Şekil 22: WJ-MKH'lerde 24 saat KN-93 uygulamasının doza bağlı olarak kök hücre canlılığı üzerine etkisi.	47
Şekil 23: WJ-MKH'lerde 24 saat KN-92 uygulamasının doza bağlı olarak kök hücre canlılığı üzerine etkisi.	48
Şekil 24: WJ-MKH'lerde 24 saat 1µM KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1µM KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1mM H ₂ O ₂ uygulamalarının kök hücre canlılığı üzerine etkisi.	49

Şekil 25: WJ-MKH'lerde 24 saat 1µM KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1µM KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1mM H ₂ O ₂ uygulamalarının kök hücre Proliferasyonu üzerine etkisi	50
Şekil 26: WJ-MKH'lerinde CaMKII α, β, γ ve δ izoformlarının gen ekspresyon değişimleri.	51
Şekil 27: WJ-MKH'lerde 24 saat 1µM KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1µM KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1mM H ₂ O ₂ uygulamalarının kök hücrelerdeki CaMKII Alfa izoformu gen ekspresyon değişimine etkisi.	52
Şekil 28: WJ-MKH'lerde 24 saat 1µM KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1µM KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1mM H ₂ O ₂ uygulamalarının kök hücrelerdeki CaMKII Beta izoformu gen ekspresyon değişimine etkisi.	53
Şekil 29: WJ-MKH'lerde 24 saat 1µM KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1µM KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1mM H ₂ O ₂ uygulamalarının gruplar arasındaki CaMKII Beta izoformu gen ekspresyon değişimine etkisi.	54
Şekil 30: WJ-MKH'lerde 24 saat 1µM KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1µM KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1mM H ₂ O ₂ uygulamalarının kök hücrelerdeki CaMKII Gama izoformu gen ekspresyon değişimine etkisi.	55
Şekil 31: WJ-MKH'lerde 24 saat 1µM KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1µM KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1mM H ₂ O ₂ uygulamalarının kök hücrelerdeki CaMKII Delta izoformu gen ekspresyon değişimine etkisi.	56
Şekil 32: 0mU, 15mU ve 30mU CaMKII pozitif kontrol dozuna bağlı olarak CaMKII aktivite kiti kullanılarak hesaplanmış CaMKII aktivite düzeyleri (mU).	57
Şekil 33: WJ-MKH'lerde 24 saat 1µM KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1µM KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1mM H ₂ O ₂ uygulamalarının kök hücrelerdeki CaMKII enzim aktivitesine etkisi	58
Şekil 34: WJ-MKH'lerde 24 saat 1µM KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1µM KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1mM H ₂ O ₂ uygulamalarının ve aktivite testine başlamadan önce 1µM STS veya 1µM KN-93 CaMKII inhibitörü uygulamasının kök hücrelerdeki CaMKII enzim aktivitesine etkisi... ..	59
Şekil 35: WJ-MKH'lerde 24 saat 1µM KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1µM KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1mM H ₂ O ₂ uygulamalarının kök hücrelerdeki total antioksidan (H ₂ O ₂) miktarına etkisi.....	60

KISALTMALAR

ATP: Adenozin Trifosfat

BSA: Bovin Serum Albumin

CaMKII: Kalsiyum/Kalmodulin-Bağımlı Protein Kinaz 2

CaM-kinaz: Kalsiyum/Kalmodulin-Bağımlı Protein Kinaz

cDNA: Komplamenter DNA

DMEM/F-12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

DMSO: Dimetil sülfoksit

EE-MKH: Ekstra Embriyonik Mezenkimal Kök Hücre

EKH: Embriyonik kök hücre

ELISA: Enzyme-Linked ImmünoSorbent Assay

FBS: Fötal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum)

GAPDH: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

HKH: Hematopoetik Kök Hücre

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

mRNA: Mesajcı RNA (Messenger RNA)

PBS: Fosfat tamponlu fizyolojik solüsyon (Phosphate buffered saline)

PKA: cAMP-bağımlı protein kinaz

RT-qPZR veya qPZR: Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR)

WJ-MKH: Wharton Jölesi Mezenkimal Kök Hücre

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince öneri, yardım ve desteğini asla esirgemeyen, bilimsel desteği ile birlikte her durumda moral ve motivasyonumun düşmemesi için pozitif enerjisi ve yapıcı tutumu ile zorlu ve sabır gerektiren tez dönemimde yanımda olan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Pınar AKAN'a,

Eğitim dönemim boyunca tecrübelerini benimle paylaşan, öneri ve yardımlarını esirgemeyen ve bizleri aydınlatarak iyi bir geleceğe ilerlememizi sağlayan değerli Sınırbilimler Anabilim Dalı ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Güler yüzünü hiç kaybetmeyen, pozitif enerjileriyle bizleri destekleyen Biyokimya Anabilim Dalı personellerine,

Göbek kordonlarının elde edilmesinde yardımcı olan Doç. Dr. Deniz Öztekin'e ve Uzm. Dr. Mehmet Emin GÜNEŞ'e,

Çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübelerimizi paylaştığımız, desteklerini sunan yüksek lisans ve doktora eğitimindeki laboratuvar arkadaşlarıma,

Tüm eğitim hayatım süresince maddi ve en çok da manevi olarak bana her anımda destek olan, her zaman her koşulda arkamda olduklarını hissettiren ve bana sonsuz güvenen annem Sultan ŞAN'a, babam Hasan ŞAN'a ve sevgili kardeşlerime,

Sevecenliği ve yardımseverliğiyle her zaman yanımda hissettiğim, eğitim dönemim boyunca destek olan tüm arkadaşlarıma,

Sonsuz güveni ve koşulsuz sevgisi ile her zaman yanımda olan, hayata karşı pozitif kalmamı sağlayan ve farklı bakış açısıyla desteklerini hiç esirgemeyen Mahmut Talha ERKOÇ'a,

Bu çalışmaya destek sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Tuğba ŞAN

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN CANLILIĞI VE STRES KOŞULLARI ALTINDAKİ PROLİFERASYONUNDA KALSİYUM/KALMODULİN-BAĞIMLI PROTEİN KİNAZ 2 (CaMKII) ENZİM DEĞİŞİMİNİN BELİRLENMESİ

Tuğba Şan, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilimler Anabilim
Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

Giriş ve amaç: Kalsiyum/Kalmodulin-Bağımlı Protein Kinaz 2 (CaMKII) bir serin treonin protein kinaz ailesinin üyesidir ve nöronal hücrelerde yoğun olarak bulunur. Öğrenme süreci, hafıza oluşumu, sinaptik plastisite üzerinde anahtar role sahip olduğu gösterilmiştir. Bu enzimin inhibisyonunun nöronal hücrelerde apoptozisi önleyebildiği, primer kültürlerde glutamat ile indüklenen nöronal hücre ölümünü zayıflattığı ileri sürülmektedir. Ayrıca CaMKII ile aynı aileye ait olan kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz kinaz (CaMKK) enzim değişiminin ise hematopoetik kök hücre proliferasyonunu kontrol ettiği son yıllarda ileri sürülmüştür. Ancak CaMKII enziminin kök hücre proliferasyonu ve stres koşullarında oluşan hücresel yanıt üzerine etkileri henüz net olarak bilinmemektedir. Bu projede, CaMKII enzim düzeylerindeki değişimlerin mezenkimal kök hücrelerin yaşam süresi ve proliferasyon değişimleri üzerindeki etkilerini ve hidrojen peroksit (H₂O₂) ile indüklenen stres koşulundaki düzey ve aktivite değişimlerini belirlemek amaçlanmıştır. Ayrıca stres koşullarında enzimin izoform (alfa, beta, gama, delta) ekspresyon değişimlerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Yöntemler: Çalışmamızda insan göbek kordonu Wharton jölesinden (WJ) eksplant yöntemi ile MKH'ler elde edildi. MKH'lerin CD44, CD90, CD105 yüzey antijenlerinin gen ve protein ekspresyon düzey değişimleri RT-qPCR, immünohistokimya ve akış sitometrisi yöntemleri ile gösterilerek karakterize edildi. Hidrojen peroksit ile indüklenen stres koşulunda CaMKII enzimi düzey ve aktivite değişimleri fotometrik olarak, enzim izoform değişimleri ise RT-qPCR yöntemi ile saptandı. CaMKII inhibitörü (KN-93) uygulamasının kök hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkisi MTT ve MTS testleri ile belirlendi.

Bulgular: Tez kapsamında Wharton Jeli'nden izole edilen kök hücreler kullanılarak Mezenkimal Kök Hücre'lerin (MKH) tanımlanmasında Uluslararası Hücre Tedavisi Derneği'ne (ISCT) göre minimal kriterler olan adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma kapasitesi histokimyasal olarak gösterildi. Oksidatif stres oluşturmak amacı ile 30 dakikalık H₂O₂ (1 mM) uygulamasının kök hücre canlılığını kontrol grubuna göre ~%40-50 oranında azalttığı gösterildi. KN-93 uygulaması ile CaMKII enzim inhibisyonunun H₂O₂ uygulaması ile birlikte hücre canlılığını , sadece H₂O₂ uygulanan gruba göre daha da azalttığı , negatif inhibitör (KN-92) uygulanmasında bu etkinin olmadığı belirlendi. Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücrelerinin (WJ-MKH) H₂O₂ ile tetiklenen stres koşulları altında ağırlıklı olarak CaMKII enziminin Beta izoformunu ekprese ettiği belirlendi.

Sonuç: Sonuç olarak literatür taramamıza göre CaMKII enziminin mezenkimal kök hücre canlılığı ve H₂O₂ ile indüklenen stres koşullarındaki değişimi ilk kez bu tez çalışması ile gösterildi. Çalışmamız ile elde edilen verilerin MKH'lerin stres koşullarına verdiği yanıt mekanizmasının anlaşılmasını, hedefe yönelik kök hücre tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için temel basamak sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Mezenkimal Kök Hücre, Wharton Jölesi, Oksidatif Stres, CaMKII, KN-93, KN-92

DETERMINATION OF CALCIUM-CALMODULIN DEPENDENT PROTEIN KINASE 2 (CaMKII) ENZYME IN MESENCHYMAL STEM CELL VIABILITY AND PROLIFERATION UNDER THE STRESS CONDITIONS

Tuğba Şan, Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Neuroscience, 35340, İnciraltı, İzmir

ABSTRACT

Introduction and aim: Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase 2 (CAMKII) is a member of serine threonine kinase family and it is found intensively in neuronal cells. It has been shown that CaMKII has a key role on the learning process, on the memory formation and on the synaptic plasticity. It has been suggested that nonspecific inhibition of calcium / calmodulin dependent protein kinase 2 can prevent apoptosis in neuronal cells, and also inhibition of induced and autonomic CAMKII activity decreases glutamate-induced neuronal cell death in primary cultures. In addition in recent years it has been suggested that change in the amount of Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK) enzyme which belongs to the same family as CaMKII controls hemopoietic stem cell proliferation. Although the effects of CaMKII enzyme on cellular response in stem cell proliferation and under the stress conditions are still unclear. In this project, changes in the levels of calcium / calmodulin dependent protein kinase 2 on mesenchymal stem cells survival and proliferation changes and on the changes of CaMKII levels under the Hydrogen peroxide (H₂O₂) induced stress conditions were aimed to investigate. Besides changes on the amount of gene expressions of CaMKII isoforms (alpha, beta, gama, delta) were aimed to investigate under the stress conditions.

Methods: In our project, mesenchymal stem cells were obtained from human umbilical cord by explant method. Gene and protein expressions of CD44, CD90, CD105 surface antigens were determined by RT-qPCR, immünohistochemistry and flow cytometry, thus MSCs were characterized. CaMKII enzyme levels and activity levels were determined photometrically and CaMKII enzyme isoforms levels were determined

by RT-qPCR under the hydrogen peroxide induced stress conditions. Effects of application of KN-93 which is a CaMKII inhibitor on stem cell viability and proliferation were determined by MTT and MTS tests.

Results: In this thesis project, the minimal criteria which are the capacity of differentiation into osteogenic, chondrogenic and adipogenic cells on the characterization of Mesenchymal Stem Cells (MSC) according to International Society for Cellular Therapy (ISCT) were shown histochemically by using the stem cells which were isolated from Wharton Jelly. It was shown that the application of 1mM H₂O₂ for 30 minutes to generate oxidative stress decreased the cell viability ~40 – 50% in proportion to control group. It was determined that CaMKII enzyme inhibition by the application of KN-93 with the H₂O₂ application decreased the cell viability more than the H₂O₂ application alone and this effect was not exist in the application of KN-92 negative inhibitor. It was identified that Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSC) express mostly Beta isoform of CaMKII enzyme under the H₂O₂ induced stress conditions.

Conclusion: As a result, according to our literature review the effects of CaMKII on the cell viability and H₂O₂ induced stress conditions were shown for the first time. It is thought that the data which were obtained from our research will provide a fundamental ground to understand response mechanism of MSCs to the stress conditions and to develop targeted stem cell treatment strategies.

Keywords: Mesenchymal Stem Cell, Wharton's Jelly, Oxidative Stress, CaMKII, KN-93, KN-92

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kinaz terimi ATP'nin gama pozisyonundaki fosfatı, protein substratının içerisindeki Serin, Treonin veya Tirozinin hidroksil grubuna katalizleyen büyük bir enzim kategorisini tanımlar [1]. Kalsiyum kalmodulin bağımlı protein kinaz (CaM-kinaz) ailesinin üyeleri (CaMKI, CaMKII, CaMKIII, CaMKIV ve CaMKK) Serin/Treonine kinazlar olarak sınıflandırılırlar ve substratlarının fosforilasyon bölgesinde Serin veya Treonin içerirler. İsimlerinden anlaşılacağı üzere bu kinazların aktivasyonu kalsiyum (Ca^{2+})/kalmodulin (CaM) kompleksinin bağlanmasıyla gerçekleşir. Fakat CaM kinazlardan bazılarının aktivasyonun devamında Ca^{2+} /CaM bağımsız olabilme kapasitesine sahiplerdir ya da aktivasyonu tamamen sağlamak için diğer regülatörler tarafından ekstra fosforilasyon modifikasyonu gerektirirler. Görece küçük protein ailesinin regülasyonlarındaki bu farklılıklar, onlara bir çok farklı hücresel fonksiyon üzerinde mükemmel bir kontrol sağlamalarına izin verir [2].

Nöronların içerisindeki kimyasal olayların beyin fonksiyonlarını etkileyebildiği keşfedildiğinden beri bilim insanları bir "hafıza molekülü" aramaya başlamışlardır. Bir iyon, protein, küçük bir molekül ya da nükleik asit olabilecek bir hafıza molekülünü tanımlamak, hafızanın nasıl oluştuğunu ve bilişselliğin sırlarını ortaya çıkarmakta bir temel oluşturur. Bu molekülün nasıl çalıştığı hakkında modeller oluştukça, hafıza molekülünün bir kinaz/fosfataz bağımlı anahtar olduğuna dair önemli bir fikir ortaya çıkmıştır [3]. Fazla miktarda bir nöronal protein kinazın ve önemli özelliklerinin keşfedilmesiyle kalsiyum kalmodulin bağımlı protein kinaz II'nin (CaMKII) öğrenme ve hafıza üzerindeki etkileri yoğun olarak çalışılmaya başlanmıştır [4].

CaMKII geniş substrat çeşitliliğine sahip olan bir Serin/Treonin kinazdır ve aktivitesi ilk olarak 1970'lerin sonlarında tanımlanmıştır [5]. O zamandan beri CaMKII'nin özelliklerini konu edinen 1200'ün üzerinde makale yayınlandı ve bu çalışmalar kinazın yapısal bütünlüğü ve enzimatik özelliklerinin belirlenmesini sağladı. CaMKII, pek çok dokuda bulunmasına rağmen özellikle nöron hücrelerinde, beyinin bazı bölgelerinde total proteinin %2'sini oluşturabilecek kadar yüksek konsantrasyonlarda bulunur [6]. Beyin dokularında oldukça zengin olarak bulunmasıyla birlikte tüm vücutta da mevcuttur ve CaMKII, Ca^{2+} sinyal transdüksiyonunun

yönetilmesi ve koordinasyonunun temelini oluşturur. CaMKII tarafından fosforlanan substratlar hücrenin homeostatik regülasyonunda, öğrenme ve hafızayı içeren kompleks bilişsel ve davranışsal yanıtların altında yatan nöronal fonksiyonun aktivite bağımlı değişimlerinde rol alırlar [7].

CaMKII holoenzimlerinin yapısı doğada eşsiz olarak bulunur. Kinazın bir holoenzim için 12 fonksiyonel domaini her küme 6 domain içermek üzere 2 küme ile bir dişli çarkı şeklinde birbirine bağlanır. Her alt birim bir katalitik, bir otoregülatör ve bir yardımcı domain içerir. Ca^{2+} /CaM'in holoenzime bağlanması otoregülatör domaini disinhibe ederek otofosforilasyonun başlamasını ve enzimin Ca^{2+} /CaM hassaslığında Ca^{2+} /CaM-bağımsız aktivitenin oluşturulması, CaM yakalama ve CaM kapatma gibi kompleks değişikliklerin gerçekleşmesine olanak sağlar. Bu durum CaMKII'nin aktivitesi ve otoregülasyonuna bir çeşit moleküler hafıza kazandırır [8]. CaMKII, memellilerde 4 gen tarafından kodlanır ve bunlar α , β , γ , ve δ izoenzimleridir. α ve β izoenzimleri beyinde daha fazla oranda bulunur. Bu izoenzimlerden her biri pek çok bağlantı çeşitliliklerine sahiptir. Omurgasız türlerde ise tek bir alternatif katlanmış gen CaMKII'yi kodlar [9].

Mezenkimal kök hücreler(MKH), mezodermden köken alan pek çok dokuyu (kemik, kıkırdak, yağ dokusu vb.) oluşturabilme kapasitesine ve ayrıca tümüyle farklılaşarak nöronlara dönüşme potansiyeline sahiptir. Nörodejeneratif hastalıkların hücre bazlı tedavisinde gelecek vadetmektedirler. Mezenkimal kök hücreler kemik iliğinde bulunurlar, fakat kemik iliğinden kök hücre alınması invaziv bir yöntem ve bağışçı yaşıyla birlikte kök hücre farklılaşma potansiyeli azaldığından insan göbek kordonunda bulunan Wharton jölesinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kullanılması bir alternatif oluşturmaktadır [10].

Embriyojenez süresince ve doğum sonrası dönemde gelişen dokular için doku büyümesini desteklemek için farklılaşmış hücre oluşumu, gelecekteki büyüme potansiyelini korumak için gerekli kök hücre devamlılığını sağlayabilmeye aykırıdır. Büyüme kıkırdağında bu denge hipertrofik kondrositlere farklılaşma öncesi projenitör hücrelerin sayısını arttıran proliferatif faz kurularak sağlanır. Yapılan çalışmada, CaMKII aktivitesinin hipertrofi öncesi arttığı ve CaMKII fonksiyon kaybının proliferasyondan

hipertrofiye geçişi önemli ölçüde bloke ettiği saptanmıştır [11]. Çok fonksiyonlu CaMKII enziminin düz kas hücrelerinin fenotip değişiminde ve devam ettirilmesinde yer aldığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada CaMKII'ın  izoformunun insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kontraktil düz kas hücrelerine farklılaşmasında rol oynadığı belirlenmiştir. Farklılaşma sürecinde CaMKII'y düzeyi kademeli olarak artmıştır [12].

Çalışmamızda Wharton jölesinden elde edilen mezenkimal kök hücreler kullanılarak CaMKII inhibitörleri yardımıyla hücre içindeki kinazın inhibe edilmesi ve böylece CaMKII'nin proliferasyon üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca CaMKII izoformlarının hücre proliferasyonuna etkisinin mRNA düzeyinde incelenmesi amaçlanmıştır. Yapılan literatür taramamıza göre bu çalışma ile ilk kez hafıza oluşumu, öğrenme, sinaptik plastisite üzerinde önemli bir etkisi olduğu düşünülen CaMKII enziminin wharton jölesinden elde edilecek insan mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonunu nasıl etkilediğinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Tez çalışmamız ile ulaşmak istediğimiz hedefler şu şekilde özetlenebilir;

- ✓ Hidrojen peroksit (H_2O_2) uygulaması ile oksidatif stres modeli oluşturulması
- ✓ KN-93 CaMKII inhibitörü ve KN-92 negatif inhibitör uygulamalarında WJ-MKH'lerin hücresel canlılık düzeyinin ve hücre proliferasyonunun belirlenmesi
- ✓ CaMKII inhibisyonu ve H_2O_2 varlığında WJ-MKH'lerin hücre canlılıklarının ve hücre proliferasyon değişimlerinin belirlenmesi
- ✓ H_2O_2 oksidatif stres koşulu uygulanan ve CaMKII inhibisyonu tetiklenen hücrelerde CaMKII izoformlarının gen ekspresyon değişimlerinin belirlenmesi
- ✓ CaMKII inhibisyonu ve H_2O_2 oksidatif stres koşulu varlığında WJ-MKH'lerindeki CaMKII enzim aktivitesi değişimlerinin saptanması.

Bu tez çalışması ile toplanan veriler ve optimize edilen protokoller ileride planlanabilir rejeneratif tıp uygulamalarını kapsayan projeler için temel sağlayabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

Kök hücreler ilk kez 1960'larda yetişkin fare kemik iliğinde tespit edilmişlerdir ve ontogenez süresince köken aldıkları zaman dilimine göre embriyonik, fetal ve yetişkin kök hücreler olarak 3 temel başlık altında incelenebilirler [13]. Bir organizmanın vücudundaki hücrelerin her birinin spesifik rolleri bulunmaktadır, ama kök hücrelerin henüz spesifik bir rolü keşfedilememiş olup vücuda gerekli olan neredeyse her hücreye farklılaşabilme kapasitelerine sahiplerdir. İnsan fetal dokularından kültür edilen pluripotent kök hücrelerin embriyonik germ tabakalarında bulunan farklılaşmış çeşitli hücrelere temel sağladığı daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir. Bir çok yetişkin dokudaki kök hücreler travma, hastalık ya da yaşlanma sonrasında kendilerini yenileyebilme kapasitesine sahiptir. Belirli kök hücreler tek bir doku içerisinde bulunabileceği gibi diğer dokularda da bu kök hücreleri sağlayan depolar bulunabilir. Örneğin; yetişkin hematopoetik kök hücrelerin (HKH) en temel kaynağı kemik iliği olmasına karşın bu hücreler diğer dokularda da bulunabilmektedir [14].

Kök hücreler organizmada bulunan diğer hücreler gibi limitli mitoz bölünme sayılarına sahip değildir. Kök hücrelerin farklılaşmasıyla elde edilen hücreler bu farklılaşma süresince pek çok faktörden etkilenebilirler. Fakat bu süreçler spesifik olarak izlendiğinde hem kök hücrenin kendinden olan faktörlerin hem de dış etkenlerin kök hücre farklılaşmasındaki ekspresyonları kontrol ettiği gözlemlenir ve bunun sonucunda spesifik bir dokudaki fonksiyonlar temelde buradaki spesifik hücrelerin moleküler içeriğine bağlıdır [15] [16].

Kök hücreler limitli olmayan mitoz bölünme sayılarına sahip olduklarından uzun bir süre boyunca kendilerini yenileyebilme kapasitesine sahiplerdir. İçsel ve dış kaynaklı uyaranlar ile bulundukları doku ya da organa bağlı olarak spesifik bir fonksiyona sahip hücrelere farklılaşabilirler. Kök hücreler hem embriyonik dönemde hem de yetişkin dönemde elde edilebilirler, ayrıca prenatal ve postnatal olarak da elde edilebilirler. Farklılaşma kapasiteleri köken aldıkları embriyonik germ tabakalarındaki hücre tiplerine bağlı olarak farklılık gösterir [17].

2.1.1.Kök Hücre Tipleri

Bilim insanları kök hücreleri farklı tipte hücrelere farklılaşabilme potansiyellerine göre sınıflandırmaktadır (Şekil 1).

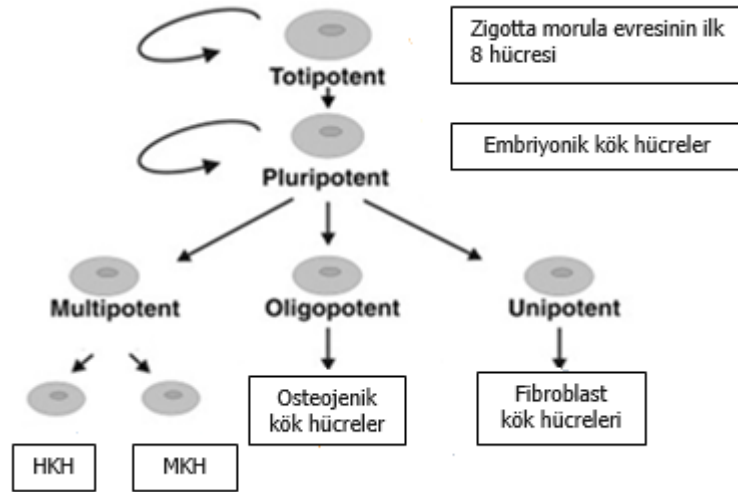
Totipotent Kök Hücreler: Bu hücreler bilinen tüm hücre tiplerine yani embriyonik, somatik ve germ hücrelerine farklılaşabilme yeteneğine sahiplerdir ve tüm dokuları oluşturabilirler. Zigotun oluşup bölünmeye başlamasıyla ortaya çıkan ve morula evresinin erken dönemindeki ilk 8 hücre totipotent hücredir [18].

Pluripotent Kök Hücreler: Bu sınıfta yer alan hücreler erken embryo döneminde oluşurlar. Embriyonik süreçte gelişim gösteren blastosist yapısının iç kısmında bulunurlar. Pluripotent kök hücreler embriyonik germ tabakalarından endoderm, ektoderm ve mezodermi oluşturma kapasitesine sahiplerdir [19].

Multipotent Kök Hücreler: Bu gruptaki hücreler birbirlerine fonksiyon olarak oldukça yakın organ veya doku içerisindeki hücre gruplarına farklılaşabilirler. Örneğin yetişkin hematopoetik kök hücreler farklılaşarak kırmızı ve beyaz kan hücrelerini veya kan pulcuklarını oluşturabilirler. Umbilikal kord kanında, kemik, yağ ve kalp dokusunda yer alan mezenkimal kök hücreler bu grupta yer alırlar

Oligopotent Kök Hücreler: Bu tip kök hücreler sadece birkaç farklı hücre çeşidine farklılaşabilir. Örneğin, yetişkin lenfoid ve myeloid kök hücreleri bu grupta yer alırlar.

Unipotent Kök Hücreler: Bu tip kök hücreler sadece kendi hücre tipini yani tek bir hücre çeşidi üretebilme kapasitesine sahip hücrelerdir. Kendilerini yenileyebilme kapasitesine sahip olduklarından kök hücre olarak nitelendirilirler ve bu sebeple öncül (progenitör) hücrelerden farklılardır. Örnek olarak kas kök hücreleri bu grupta yer alır [20].



Şekil 1: Kök hücrelerin farklılaşma kapasitelerine göre sınıflandırılması.

Bilim insanlarına göre kök hücreler temel aldıkları kaynak dokuya göre iki grup altında incelenebilirler:

Yetişkin Kök Hücreler: Bir organizmanın vücudu yaşamı boyunca kök hücre bulundurur. İhtiyaç durumlarında bu kök hücreler kullanılır. Bu kök hücreler doku spesifik ya da somatik kök hücreler olarak adlandırılırlar. Yetişkin kök hücreleri fazla spesifik durumda olmayıp pek çok hücre tipine farklılaşabilirler ama embriyonik kök hücrelere göre daha spesifiktirler. Vücudun hastalık, travma, doku yenilenmesi gibi spesifik bir amaç için bu kök hücrelere ihtiyacı olana kadar bulundukları durumda kalmaya devam ederler. Yetişkin kök hücreleri, beyin, kemik iliği, kan ve kan damarları, iskelet kasları, cilt, karaciğer, göbek kordonu, kordon kanı, yağ dokusu gibi vücudun farklı bölgelerinde bulunabilirler [21].

Embriyonik Kök Hücreler: Embriyonik kök hücreler zigot oluştuktan 4-5 gün sonra meydana gelen blastositten elde edilebilirler. Blastosit iki kısımdan oluşur; dıştaki hücreler plasantanın bir parçası olurken içteki hücreler vücudu geliştirirler. Embryonic kök hücreler içeride bulunan bu blastosit kısmında bulunurlar. Embriyonik kök hücreler pluripotent kök hücrelerdir ve kan hücresi, cilt hücresi ya da vücuttaki herhangi bir hücreye dönüşebilme kapasitesine sahiptirler [22].

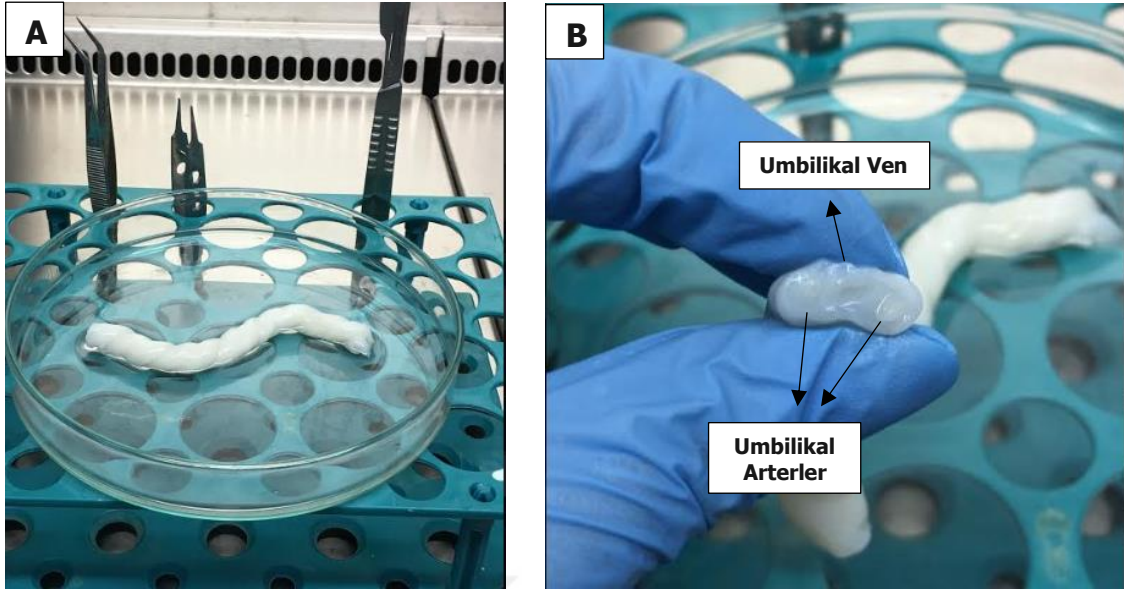
2.1.2.Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH) pek çok yetişkin dokudan elde edilebilirler ve mezoderm tabakasından köken alan adipositler, osteositler, kondrositler ve embriyonik mezoderm tabakasından köken alan diğer hücrelere farklılaşma kapasitesini barındırırlar [23]. MKH'ler multipotent mezenkimal stromal hücreler olarak tanımlanabilirler ve *in vitro* koşullarda çoğaltıldıklarında plastik yüzeye tutunarak fibroblast benzeri morfoloji gösterirler. Bu hücrelerin heterojen populasyonları *in vitro* koşullarda koloniler oluşturarak kemik, kıkırdak ya da yağ hücrelerine farklılaştırılabilir [24].

İnsan mezenkimal hücreleri hematopoetik hücre belirteçleri olan CD45, CD34, CD14, CD19, CD80 ve HLA-DR antijenlerinin gen ekspresyonlarını gerçekleştirmezler. Fakat CD105, CD73, CD44, CD90, CD71, GD2 ve CD271 belirteçlerinin gen ekspresyonlarını farklı düzeylerde gerçekleştirirler, ayrıca monoklonal antikor olan STRO-1 tarafından tanınırlar. Bu belirteçlerin farklı düzeylerde ekspresyonlarının gerçekleşme sebebi tür farklılıklarına, MKH'lerin elde edildiği doku farklılıklarına ve kültür koşullarına bağlanmaktadır [23] [25].

2.1.3.Wharton Jölesi Mezenkimal Kök Hücreleri

İnsan göbek kordonu içerisinde mukoz bağ doku ile çevrelenmiş 2 arter ve bir ven barındırır (Şekil 2). Göbek kordonunda bulunan Wharton jölesi bu mukoz bağ dokuyu ve fibroblast benzeri hücreleri içerir. Umbilikal kord, çevreleyen amniyondan köken alan epitel ile kaplanmıştır [26]. Birbirine geçmiş kolajen fiberler ve küçük örülü demetler umbilikal damarları kaplayan sürekli yumuşak bir iskelet oluşturmak için düzenlidir. Wharton jelinde en çok bulunan glikozaminoglikan olan hiyalüronik asit tarafından oluşturulan nemli jel tarafından çevrelenen fibroblast ve kolajen fiberler umbilikal kordu basınçtan koruyarak doku formunu belirli bir şekilde tutarlar [27].



Şekil 2: İnsan göbek kordonu görünümü (A) ve insan göbek kordonunun iç yapısı (B)

Göbek kordonundan köken alan mezenkimal hücrelerde CD44 ve CD105 yüzey antijenleri, CD29 ve CD51 integrin belirteçleri ve SH2, SH3 mezenkimal kök hücre belirteçlerinin eksprese edildiği fakat CD34 ve CD45 hematopoetik farklılaşma belirteçlerinin eksprese edilmediği gösterilmiştir [28]. Wharton jeli içerisinde bulunan MKH'ler Wharton jölesi mezenkimal kök hücreleri (WJ-MKH) olarak adlandırılmıştır ve WJ-MKH'ler 2006 yılında Uluslararası Hücre Tedavisi Derneği (ISCT) tarafından yayınlanan minimal kök hücre kriterlerini barındırmaktadır [25].

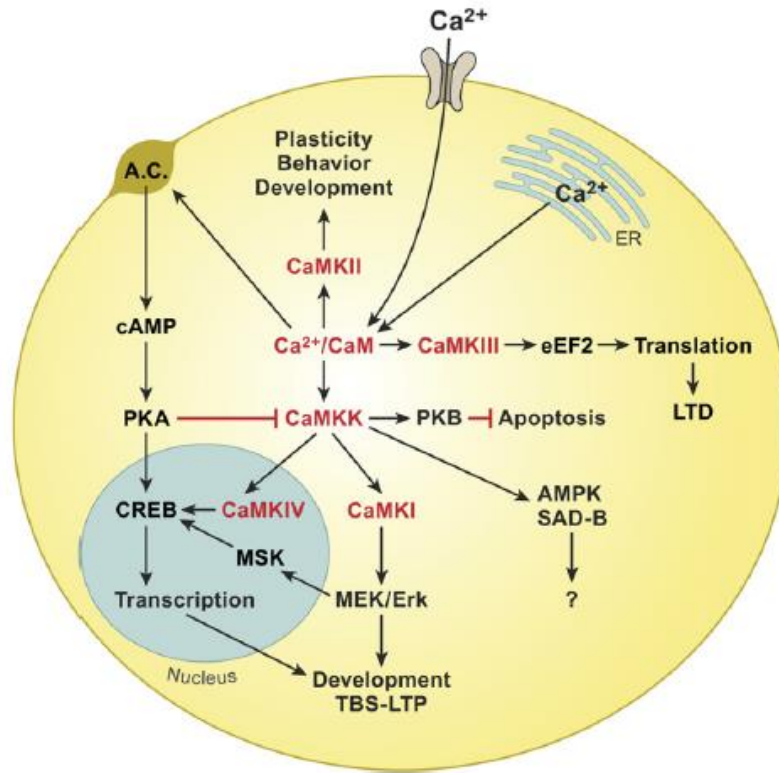
2.2. Kalsiyum Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz Ailesi

Kalsiyum/Kalmodulin-Bağımlı Protein Kinazlar (CaM-kinaz) en iyi karakterize edilmiş kinazlardandır. CaM-kinazlar, gen transkripsiyonu, hücre canlılığı ve apoptozu, sitoskeletal reorganizasyon, öğrenme ve hafıza gibi çeşitli hücresel süreçleri önemli ölçüde etkileyebilirlik fonksiyonları dolayısıyla uygun hücre fonksiyonları için kritik düzeyde önemlidir[2]. CaM-kinazlar hücre içerisinde pek çok sinyal yolağında yer alabilirler (Şekil 3). ATP'nin gama pozisyonundaki fosfatın, protein substratının içindeki Serin, Treonin veya Tirozinin hidroksil grubuna katalizlenmesini büyük bir enzim kategorisi olan kinazlar gerçekleştirir [1]. cAMP-bağımlı protein kinaz (PKA), katalitik domaininin kristal yapısı ilk çözümlenmiş kinazdır. Daha sonra siklin bağımlı kinaz 2 (cdk2) ve ekstraselüler düzenlenen kinase 2'nin (ERK2) X-Ray kristalografik yapısı

çözümlemiş ve böylece bütün protein kinazların ortak bir yapısal motif paylaştığı gösterilmiştir [29][30].

Kalsiyum/Kalmodulin-Bağımlı Protein Kinaz (CaM-kinaz) ailesi CaMKI, CaMKII, CaMKIII, CaMKIV ve CaMKK olarak 5 kinazdan oluşur. CaMK ailesi Serin/Treonine kinazlar olarak sınıflandırılırlar. Kinazların aktive edilmesi kalsiyum ve kalmodulin kompleksinin bağlanması ile gerçekleştirilir fakat bazı aile üyeleri aktivasyon sonrasında tüm aktivitenin gerçekleşebilmesi için ekstra fosforilasyon gerektirirler [2].

CaM-kinazların tüm domain yapısı PKA ile çok benzerdir; iki loblu katalitik domainin ardından regülatör domain gözlemlenir ve bu iki domainin her ikisi de bir otomatik inhibitör domaini içerirler. Otomatik inhibitör domain ve CaM bağlı domain üst üste gelir ve Ca^{2+} /CaM bağlanması ile otomatik inhibitör domainin fonksiyonu düzenlenir [2].



Şekil 3: CaM-Kinazların hücre içi sinyal yolları [8]

2.2.1.CaMKII

CaMKII'nin dodekamerik yapısı protein kinazlar arasında eşsiz olarak bulunur ve evrim süresince korunmuştur. Bu durumun çoklu alt gruplu holoenzim yapısının alışlagelmedik özellikler gösterebilmesi için bir anahtar olduğu ileri sürülmüştür [31]. Holoenzim yapısı için her küme 6'şar domain içermek üzere kinazın 12 fonksiyonel domaini 2 küme ile bir dişli çarkı görünümünde birbirine bağlanır. Buradaki her alt birim bir otoresgülatör, bir katalitik ve bir de yardımcı domain bulundurur. CaMKII yapısında bulunan bu katalitik ve düzenleyici domainlerin CaMKII'nin bazal aktivitesinin Ca^{2+}/CaM yokluğunda nasıl baskılandığına dair önemli rollerinin olduğu düşünülmektedir. Ca^{2+}/CaM kompleksinin holoenzime bağlanması sonucu otoresgülatör domain disinhibe edilerek otofosforilasyon başlatılır. Bu sayede enzimin Ca^{2+}/CaM varlığında Ca^{2+}/CaM -bağımsız aktivitesinin oluşması, CaM yakalama veya CaM kapatma gibi kompleks değişiklikleri gerçekleştirmesine olanak sağlanır. Bağımsız aktivitenin oluşması enzim yapısında sarmal olarak bulunan α -heliks yapısının hem Ca^{2+}/CaM bağlama elementi hem de Thr286 içermesi ve bu yapının fosforlanması ile kinazın Ca^{2+}/CaM bağımsız duruma geçişi ile gerçekleştirilir. Bu durum CaMKII'nin aktivitesi ve otoresgölasyonuna bir çeşit moleküler hafıza kazandırır [8][32].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel, hücre kültürü çalışmasıdır ve *in vitro* araştırma niteliğindedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma Haziran 2018-Haziran 2019 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Tepecik Kadın Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesinde, miad (37-40 haftalık), 18-40 yaş arası sezaryenle doğum yapan gebeler kök hücre eldesi için çalışmaya dahil edilmiştir. İzole edilen kök hücre miktarına ve canlılıklarına bağlı olarak, örneklem sayısı 3 gebeden göbek kordonu alınarak sağlanmıştır ve elde edilen kök hücreler araştırma evrenini oluşturmaktadır.

3.4. Araştırmanın Çalışma Materyali

Araştırmamızda insan göbek kordonundan izole edilen Wharton Jölesi mezenkimal kök hücreleri kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız değişkenler; H₂O₂ uygulaması, CaMKII inhibitör uygulaması

Bağımlı değişkenler: CaMKII enzim aktivitesi, CaMKII izoformları α , β , γ , δ değişimleri, hücre canlılığı ve proliferasyon değişimleri

3.6. Veri Toplama Araçları

Tablo 1: Kullanılan Cihazlar

Derin Dondurucu	Thermo Forma Model 705
Laminar Air Flow Hücre Kültürü Kabini	ThermoFisher Scientific, 2020
Ters Faz Işık Mikroskobu	Nikon Eclipse TS-100
Karbondioksit İnkübatörü	ThermoFisher Scientific, Steri-Cycle i160
Plak Okuyucu (Spektrofotometer)	BioTek ELX 800
Santrifuj	Eppendorf 5810 R
Thermal Cyclers	Qiagen Rotor Gene Q
Floresan Mikroskobu	Olympus DP71
PZR Cihazı	BioRad Thermal Cyclers

Tablo 2: Kullanılan Kimyasallar

Fötal Siğir Serumı	ThermoFisher Scientific (16000-36)
Penisilin/Streptomisin	ThermoFisher Scientific (15140122)
DMEM/F-12	ThermoFisher Scientific (11320)
L-glutamin	PAN Biotech (P0480100)
KN-93	BioVision (1909)
KN-92 Hydrochloride	BioVision (B1643)
Hidrojen Peroksit	Sigma-Aldrich (H1009)
Tripsin-EDTA	ThermoFisher Scientific (25300-054)
CaMKII- α primer antikor	Qiagen (PPH02338A)
CaMKII- β primer antikor	Qiagen (PPH01503E)
CaMKII- γ primer antikor	Qiagen (PPH00525A)
CaMKII- δ primer antikor	Qiagen (PPH11180A)
Agaroz	Sigma (A5093)
CD90 primer antikor	Abcam (ab225)
CD44 primer antikor	Abcam (ab6124)
CD31 primer antikor	ThermoFisher Scientific (MA1-19769)
CD34 primer antikor	Abcam (ab81289)
DAPI	CST (8961S)
Anti-mouse sekonder antikor	Jackson Immüno Research (115-095-003)
Anti-rabbit sekonder antikor	Jackson Immüno Research (111-095-003)

Tablo 3: Kullanılan Kitler

BCA Protein Tayini Kiti	ThermoFisher Scientific (23225)
RNA İzolasyon Kiti	Macherey Nagel (740-955.250)
Qiagen RT ² First Strand Kit	Qiagen (330404)
Qiagen RT ² SYBR Green Mastermix	Qiagen (330600)
CellTiter 96 AQueous One Solution Hücre Proliferasyon Kiti	Promega (G358)
İnsan Mezenkimal Kök Hücre İşlevsel Tanımlama Kiti	R&D Systems (SC006)
Akış Sitometrisi Kiti	BD Biosciences (562245)
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Applchem (A2231)
Cyclex CaM-kinase II Assay Kit	MBL (CY-1173)
Total Oxidant Status Assay Kit	Rel Assay Diagnostics

Tez çalışması süresince yapılan deneylerde kullanılan cihazlar (Tablo 1), kullanılan kimyasallar (Tablo 2) ve kullanılan kitler (Tablo 3) yukarıda verilen tablolarda marka ve katalog numaraları verilerek açıkça belirtilmiştir.

3.6.1. Donör Dışlama Kriterleri

Tepecik Kadın Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesinde, miad (37-40 haftalık), 18–40 yaş arası sezaryenle doğum yapan ve gönüllü olur formunu imzalayan gebeler kök hücre eldesi için çalışmaya dahil edilmiştir.

Bilinen yapısal ve genetik anomali sahibi fetüsler, yardımcı üreme yöntemleri ile olan gebelikler, çoğul gebelikler, annenin tiroit ya da diyabet hastalıkları gibi bilinen ek bir hastalığının olması ve sürekli ilaç kullanımı gerektiren durumlar, intrauterin gelişme geriliği (<2500 gr) gösteren bebekler çalışma dışında tutulmuştur.

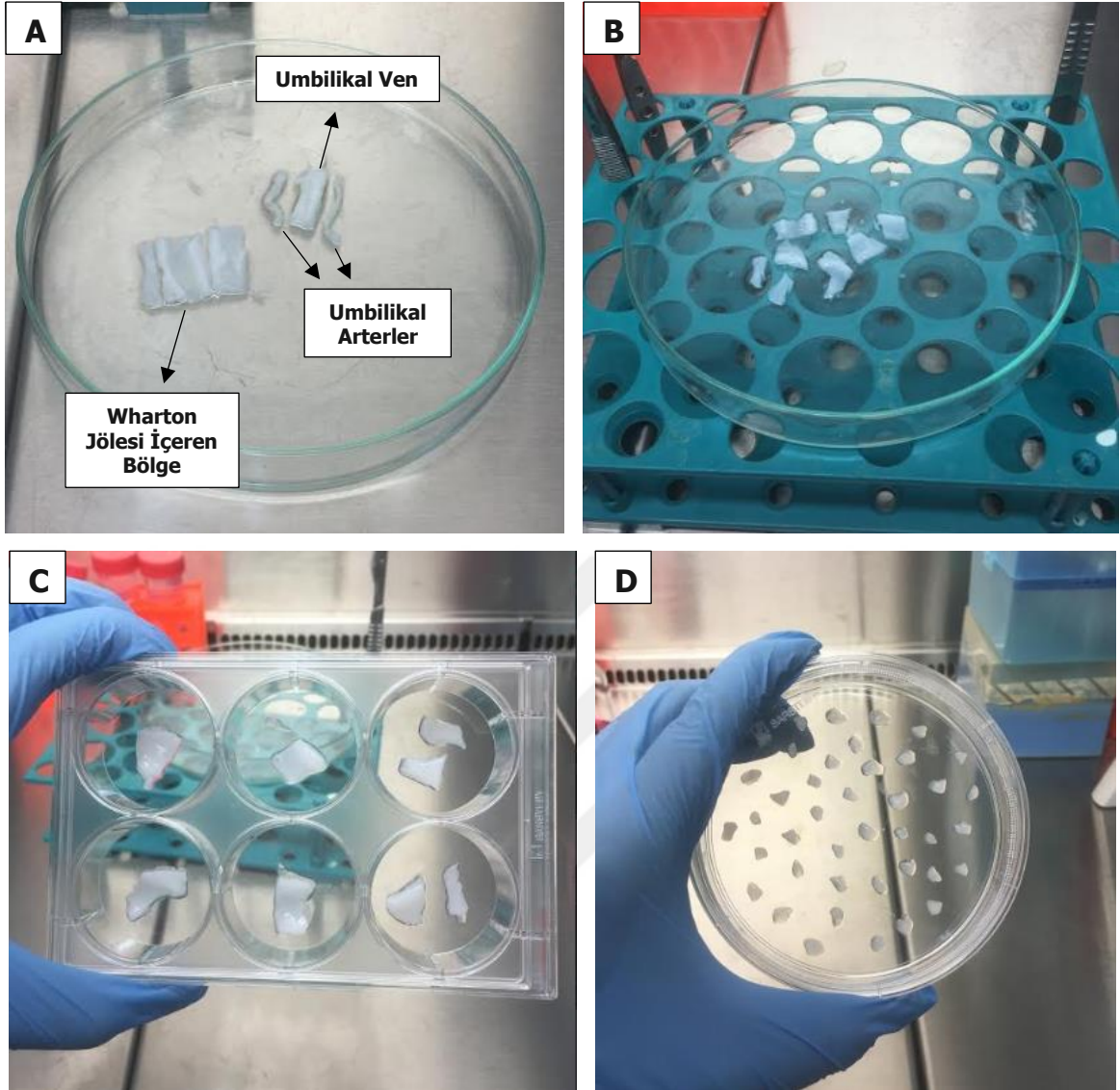
3.6.2. Göbek Kordonu Temini

Doğum zamanı gebeler sezaryene alınarak, bebeğin doğurtulup çocuk doktoruna verilmesinden sonra kordon ile plesenta arasına 3. bir klemp konulup

plasenta uterustan çıkarılmıştır. Kordon ile plesenta, 3. klempin bulunduğu bölgeden plasentaya yakın kısımdan kesilerek alınmıştır. Aseptik koşullarda kordon üzerindeki kan silinip birkaç dakika içinde +4°C'de bekletilen ve içerisine 50 µg/ml gentamisin, 100 U/ml penisilin, 2.5 µg/ml amfoterisin B, 100 µg/ml streptomisin, 5 g/l glikoz eklenmiş, steril fosfat tamponlu fizyolojik solüsyon (Phosphate Buffered Saline; PBS) konulmuştur. Alınan kord yaklaşık iki saat içerisinde, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyokimya hücre kültürü laboratuvarına transfer edilmiş ve bekleme yapılmadan kök hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.6.3.Kök Hücre İzolasyonu

Alınan kordonlardan hücre izolasyonu gerçekleştirileceğinde, göbek kordonu laboratuvara ulaşır ulaşmaz steril ve hazır şekilde olan laminar akımlı hücre kültürü kabinetine transfer edildi. Kordon, steril bir kabın içerisine bir miktar soğuk PBS ile birlikte aktararak üzerlerindeki pıhtı kalıntıları ve kan tamamen temizlendi. Tüm kord 2-3 cm uzunluğunda parçalara ayrılarak kurumaması için PBS içerisine alındı. İzolasyona başlarken kordon içerisinde bulunan Wharton jeli ile sarılı iki arter ve bir ven özenle disekte edilip Wharton jeli bölgesi ortaya çıkarıldı. Wharton jeli içerisinde bulunan mezenkimal doku 0,5 cm²'lik parçalara ayrılarak parçalar altı kuyucuklu plağın her kuyucuğuna bir parça olacak şekilde ve jel bölümü yüzeye temas edecek şekilde yerleştirildi. Parçaların yüzeye tutunmasının 30-40 dk beklenmesinin ardından, yüzeye tutunmuş eksplanlara 10% fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS), 100 µg/mL streptomisin, 100 U/mL penisilin ve 2 mM L-Glutamin içeren komplet DMEM/F-12 kültür ortamı eklendi. Altı kuyucuklu hücre kültür plaklarına örnek adı ve kodu, işlemin yapıldığı tarih yazıldı. Hücreler %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de tutularak ve büyüme ortamı haftada iki kez taze büyüme ortamı ile değiştirilerek hücrelerin dokudan çıkması ve çoğalmaları beklendi. Eksplantlar her gün ışık mikroskobu yardımıyla izlenerek hücre çıkışı gözlemlendi (Şekil 4).



Şekil 4: Göbek kordonunun açılmış görüntüsü (A), Wharton jelini bulunduran göbek kordonu parçaları (B), göbek kordonundan elde edilen eksplantlar 6 kuyucuklu plak içerisinde (C) ve petri kabında bulunan daha küçük boyutlardaki eksplantlar (D).

3.6.4.Kök Hücre Kültürü

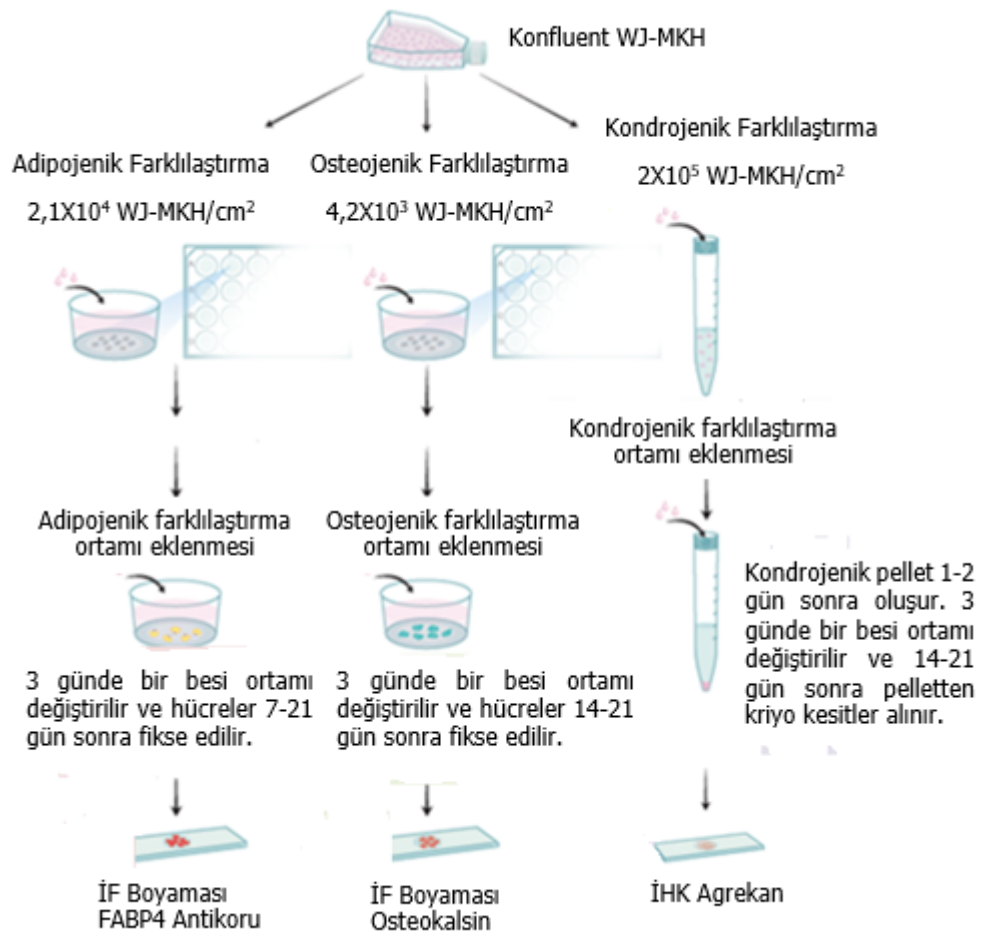
İzole edilmiş kök hücreler 10% FBS, 100 µg/mL streptomisin, 100 U/mL penisilin ve 2 mM L-Glutamin içeren komplet DMEM/F-12 kültür ortamı ile %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de inkübe edildi. Eski büyüme ortamı haftada iki kez çekilip uzaklaştırılarak taze komplet DMEM/F-12 eklendi. Her gün hücreler inkübatörden alınarak ışık mikroskobu yardımıyla gözlemlenerek durumları değerlendirildi. %80 konfluent olan kuyulardan besi ortamı çekilip uzaklaştırıldı ve 1 mL PBS ile kuyucuk

yıkandı. Hücreleri yüzeyden kaldırmak için Tripsin-EDTA solüsyonu kullanıldı. Her kuyuya 500 µL Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 4-5 dk inkübatörde bekletildi. Tüm hücrelerin yüzeyden kalkmasını sağlamak için hücre kültür plağının kenarlarına hafif bir şekilde vuruldu ve mikroskop ile hücrelerin kalkışı gözlemlendi. Tripsin-EDTA enziminin inaktive edilmesi için her kuyuya eklenen enzim miktarının iki katı olan 1 mL komplet DMEM/F-12 eklendi. Tüm hücre/ortam karışımı serolojik pipet yardımıyla 15 mL'lik falkon tüpüne aktarıldı, yüzeyde kalmış olabilecek hücrelerin de toplanabilmesi için 0,5 mL PBS solüsyonu aynı kuyulara eklenerek kuyular yıkanıp elde edilen solüsyon 15 mL'lik falkondaki hücre/ortam karışımının üzerine eklendi. Falkon tüp 5 dakika boyunca 1500 rpm'de uygun karşıt dengeyle birlikte santrifüj edildi. İşlem sonunda süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelleti 1 mL komplet DMEM/F-12 ortamında pipetleme yapılarak çözüldü. Bir miktar hücre solüsyonu tripan mavisi ile seyreltilip Thoma lamı kullanılarak hücre sayımı yapıldı. Hücre süspansiyonundaki sayısı bilinen hücrelerden deney koşullarına uygun miktarda hücre sayısı hesaplanıp ekim yapıldı. Deney yapılmadığı durumlarda elde edilen hücreler 75 cm²'lik hücre kültür kaplarına ekilerek hücre çoğaltımı yapıldı veya hücre dondurma işlemi yapılarak -80°C'de bir-iki ay saklanacak şekilde stok oluşturuldu.

3.6.5.Kök Hücre Karakterizasyon Deneyleri

WJ-MKH'lerin Osteojenik, Kondrojenik ve Adipojenik Hücrelere Farklılaştırılması: Araştırmalarımız boyunca izole edilen WJ-MKH'lerin mezenkimal kök hücre kriterlerini sağladıklarını göstermek amacıyla "insan MKH fonksiyonel tanımlama kiti(R&D Systems, Cat:SC006)" kullanıldı ve WJ-MKH'ler kemik, kıkırdak ve yağ dokusu hücrelerine farklılaştırıldı. Farklılaştırma prosedürü için erken pasaj numarasında (maksimum 3 pasaj sayısı) kültür edilen WJ-MKH'lerden 12 kuyucuklu kültür plaklarında bulunan poli-D-lisin kaplı lameller üzerine ve 15 mL hacim kapasitesine sahip falkon tüplerine kit prosedüründe belirtilen hücre sayıları göre ekim yapıldı. Ekilen hücreler, %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma prosedürleri için kit protokolünde tanımlanan süreler ve koşullara göre inkübe edildi (Şekil 5).

Uygulanan protokollerin bitiminde osteojenik ve adipojenik hücrelere farklılaştırılan gruplara buz üzerinde soğutulmuş saf metanol ile fiksasyon işlemi uygulandı. İşlem sonucunda fikse edilmiş hücrelere oil red ve alizarin red histokimyasal boyamaları ve immünofloresan boyama yapıldı. Sonuçlar ışık mikroskobu ve floresan mikroskobu kullanılarak elde edildi. Süspanse kültür ortamında inkübasyonu gerçekleştirilen ve pellet formunda bulunan kondrojenik farklılaşma grubu hücreleri ise inkübasyon süresi bitiminde fikse edilip agara gömüldü. Gömülen pelletten kriyo kesitler alınarak alcian blue boyaması ile histokimyasal olarak boyandı ve ışık mikroskobu ile veriler elde edildi.



Şekil 5: İnsan MKH fonksiyonel tanımlama kiti protokolü

İmmünoFloresan (İF) Boyama: İzole edilmiş WJ-MKH'lerin kök hücre kriterlerini sağlayıp sağlamadığını belirlemek için CD44 ve CD90 kök hücrelere özgü yüzey antijenleri için antikolar kullanılarak immünoFloresan işaretleme gerçekleştirildi. Öncelikle 12 kuyucuklu hücre plaklarının içerisine steril 18mm çapında lameller yerleştirildi. İşlem sonrasında her kuyucuğa 4×10^3 hücre ekildi ve inkübe edildi. İnkübasyon sonrası fiksasyon için -20°C 'de soğutulmuş metanol kuyucuk başına 1 mL olarak eklendi ve plak 30 dakika boyunca -20°C 'de inkübe edildi. Süre sonunda soğuk PBS kullanılarak yıkama yapıldı. Lameller temiz bir pens yardımıyla hücre fikse edilen yüzeyleri yukarda kalacak şekilde kuyucuklardan alındı. Permeabilizasyon işlemi için her lamel üzerine 80 μL %0,2'lik TritonX-100 içeren PBS eklenip 5 dakika bekletildi. PBS solüsyonu ile 3 kez yıkama yapılmasının ardından her lamel üzerine 80 μL %1 Bovin Serum Albumin (BSA) içeren PBS eklenerek 30 dakika bekletildi böylece bloklama işlemi gerçekleştirildi. Lameller PBS kullanılarak 3 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından 1:100 oranında bloklama tamponu ile dilüe edilmiş CD90 ve CD44 primer antikoları ile 2 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası lameller PBS ile 3 kez yıkandı. Daha sonra primer antikolara uygun 1:100 oranında bloklama tamponuyla seyreltilmiş sekonder antikolarla 1 saat boyunca karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitiminde lameller PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra 6 μL DAPI boyası damlatılmış temiz lamalar üzerine hücre fiksasyonu yapılmış yüzeyler DAPI boyasıyla temas edecek şekilde yerleştirilip 1 gece boyunca karanlıkta bekletilerek kurumaları sağlandı. Olympus DP71 Floresan mikroskopunda DP Controller ve DP Manager programları kullanılarak immünoFloresans görüntüleri 10X, 20X ve 40X büyütmelemler kullanılarak elde edildi.

Akış Sitometri Analizi: WJ-MKH'lerin kök hücre karakterizasyonlarında yüzey belirteçleri bakımından karakterizasyon metodu için akış sitometri analizi yapıldı. BD Accuri C6 Cytometer cihazı ve bu cihazla uyumlu bir şekilde kullanılabilecek BD Stemflow Human MSC Analysis Kiti akış sitometri deneyleri için kullanıldı. Verilen kit prosedürüne uygun olarak WJ-MKh'leri hücre kültür kaplarından scraper kullanılarak kaldırılıp 5 dakika 1300 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 600 μL %2 FBS içeren PBS eklenip hücreler resüspanse edildi. Her tüpe 1×10^6

hücre içeren 100 µL resüspanse edilmiş solüsyon dağıtıldı. 1 tüp izotip kontrol kokteyli içerecek ve 1 tüp de negatif kontrol (sadece hücre süspansiyonu) olacak şekilde ayrıldı ve kalan 4 tüpe MKH yüzey antijenlerine özgü olan CD44, CD73, CD90 ve CD105 antikorları kit prosedürüne uygun şekilde tüpler 3 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildi. İşlem sonunda ortamda bulunan bağlanmamış antikorların uzaklaştırılması için tüpler 5 dakika 1300 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak aynı miktarda PBS ile pellet çözüldü. Daha sonra solüsyonlar son hacim 500 µL olacak şekilde akış sitometri tüplerine aktarıldı ve BD Accuri C6 Cytometer cihazı kullanılarak negatif kontrol ve izotip kontrolüne göre kapılama yapıp her örnek için CD antijen yüzdesi analiz edildi.

Reverse Transkriptaz PZR (RT-PZR) ve Agaroz Jel Elektroforezi: RT-PZR deneyi göbek kordonundan izole edilen WJ-MKH'lerin yüzey antijeni ekspresyonlarını belirleyebilmek için karakterizasyon deneyleri içeriğinde gerçekleştirildi. RT-PZR deneyi için gerekli total RNA, MN Nucleospin II RNA izolasyon kiti aracılığı ile elde edilerek, RNA'ların saflık ve konsantrasyon düzeyleri Thermo Nadodrop 2000 cihazı kullanılarak belirlendi. Bu aşamadan sonra izole edilmiş RNA'lardan her bir örnek için 2µg cDNA sentezlemek amacıyla Qiagen cDNA sentez kiti kullanılarak kit prosedürü takip edildi.

RT-PZR deneyi için kök hücre karakterizasyonunda kullanılmak üzere CD90 ve CDH2 gibi MKH'lere özgü yüzey antijenleri kullanıldı. Buz üzerinde gerçekleştirilen işlemlerde öncelikle 10X PZR tamponu, 25mM dNTP karışımı, 25mM MgCl₂, 0,2 µM reverse ve forward primer çifti, Taq polimeraz enzimi ve nükleaz içermeyen su ile master mix hazırlandı. 0,2 mL'lik PZR tüplerine cDNA'lar eklendikten sonra son hacim 25 µL olacak şekilde master mix karışımı eklendi. Primerlerin T_m değerlerine uygun sıcaklık ayarlamaları ve döngü sayısı ayarlanıp reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon bitiminde tüpler buz üzerine alınarak agaroz jel elektroforez aşamasına geçildi. Primer baz çiftlerinin molekül büyüklükleri baz alınarak agaroz jelin yoğunluğu %1-2 arasında değişecek şekilde oluşturuldu. 10X konsantrasyonda TAE (Tris, Glasial asetik asit, EDTA ve distile su) tamponu hazırlanıp, 1X konsantrasyona distile su ile seyreltildikten sonra karar verilen konsantrasyon için agaroz tartılıp bu tampon içerisinde çözüldü. Hazırlanan solüsyon elektroforez tankına dökülerek içerisine EtBr (Etidyum Bromür)

eklendi. Jelin polimerleşmesi beklendikten sonra tank içerisine jel yüzeyinin tamamı kaplanacak şekilde 1X TAE tamponu eklendi. Jelin kuyucuklarına jel yükleme boyası ile karıştırılmış cDNA örnekleri ve kontrol amacıyla bir tane de house-keeping primeri içeren cDNA örneği yüklendi. Jel tankı güç kaynağına bağlanarak 1 saat boyunca 100 watt kullanılarak BioRad Thermal Cycle cihazında elektroforez deneyi gerçekleştirildi. Süre sonunda tanktan alınan jelin görüntüsü uygun cihaz yardımıyla alındı.

3.6.6.Kök Hücrelere Stres Modeli Olarak Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Uygulaması

Yapılan ön deneylerde öncelikle H₂O₂'in hücrelerde yol açtığı canlılık kaybı istenen düzeye göre belirlendi. Bunun için 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş ve yüzeye tutundurulmuş hücrelerden hücre kültür ortamı çekilerek kuyucuklara 500 µM, 1 mM ve 2 mM konsantrasyonlarında H₂O₂, %1 FBS, %1 penisilin streptomisin solüsyonu ve 2 mM L-Glutamin içeren DMEM/F-12 hücre kültür ortamıyla birlikte totalde son hacim 200 µL olacak şekilde eklendi. %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de inkübasyon süresi her konsantrasyon için 30 dk, 1 saat ve 2 saat olarak denendi. Süre sonunda MTT testi gerçekleştirildi.

3.6.7.KN-93 CaMKII İnhibitör Uygulaması

Ön deneylerde KN-93 CaMKII inhibitörünün dozuna karar vermek için 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş ve yüzeye tutundurulmuş hücrelerden hücre kültür ortamı çekilerek kuyucuklara 1 µM, 5 µM ve 10 µM konsantrasyonlarında KN-93 CaMKII inhibitörü, %1 FBS, %1 penisilin streptomisin solüsyonu ve 2 mM L-Glutamin içeren DMEM/F-12 hücre kültür ortamıyla birlikte totalde son hacim 200 µL olacak şekilde eklendi. İnkübasyon %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de 24 saat olarak gerçekleştirildi. Süre sonunda MTT testi yapıldı.

3.6.8.KN-92 Negatif İnhibitör Uygulaması

Ön deneylerde KN-92 negatif inhibitör dozuna karar vermek için 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş ve yüzeye tutundurulmuş hücrelerden hücre kültür ortamı çekilerek kuyucuklara 1 µM, 5 µM ve 10 µM konsantrasyonlarında KN-92 CaMKII inhibitörü, %1 FBS, %1 penisilin streptomisin solüsyonu ve 2 mM L-Glutamin içeren DMEM/F-12 hücre kültür ortamıyla birlikte totalde son hacim 200 µL olacak şekilde eklendi. İnkübasyon

%5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de 24 saat olarak gerçekleştirildi. Süre sonunda MTT testi yapıldı.

3.6.9.WJ-MKH'lerinde Oksidatif Stres Modeli Ve CaMKII İnhibisyonu İle Oluşturulan Deney Düzenegi

Hücrelerdeki farklı koşullardaki CaMKII düzeylerine karar verebilmek, CaMKII'nin hücre canlılığını ve proliferasyonunu nasıl etkilediğini belirleyebilmek için oluşturulan deney düzenegine göre hücrelere bazı tedavi yöntemleri uygulandı (Tablo 4). Bunun için hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına 8x10³ hücre, komplet DMEM/F-12 hücre kültür ortamıyla birlikte son hacim 200 µL olacak şekilde veya 6 kuyucuklu hücre kültür plaklarına 200x10³ hücre, komplet DMEM/F-12 hücre kültür ortamıyla birlikte son hacim 2 mL olacak olacak şekilde sonrasında kullanılacak deney prosedürüne göre tercih edilerek ekildi. Hücreler yüzeye tutunabilmeleri için 16-18 saat boyunca %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de inkübe edildi.

Yapılan ön çalışmaların sonuçlarına göre deney düzenegi toplamda 6 deney koşulu; kontrol grubu, H₂O₂ grubu, KN-93 inhibitörü ve H₂O₂ grubu, KN-93 inhibitör grubu, KN-92 negatif inhibitörü ve H₂O₂ grubu ve son olarak KN-92 negatif inhibitör grubu olarak karar verildi ve hedeflenen deney uygulamalarının gerçekleştirilebilmesi için hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına 8x10³ hücre, komplet DMEM/F-12 hücre kültür ortamıyla birlikte son hacim 200 µL olacak şekilde veya 6 kuyucuklu hücre kültür plaklarına 200x10³ hücre, komplet DMEM/F-12 hücre kültür ortamıyla birlikte son hacim 2 mL olacak olacak şekilde sonrasında kullanılacak deney prosedürüne göre tercih edilerek ekildi. Hücreler yüzeye tutunabilmeleri için 16-18 saat boyunca %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra KN-93 inhibitör grubuna 1 µM konsantrasyonda KN-93 ve KN-92 negatif inhibitör grubuna 1 µM konsantrasyonda KN-92, %1 FBS, %1 penisilin streptomisin solüsyonu ve 2 mM L-Glutamin içeren DMEM/F-12 hücre kültür ortamıyla birlikte hücrelere verildi. Kontrol grubu ve H₂O₂ grubunun besi ortamı ise %1 FBS, %1 penisilin streptomisin solüsyonu ve 2 mM L-Glutamin içeren DMEM/F-12 hücre kültür ortamıyla değiştirildi. Plak %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda KN-93 inhibitörü ve H₂O₂ grubu ve KN-92 negatif inhibitörü ve H₂O₂ grubuna işlem sonunda kuyucuk içerisinde

1 mM konsantrasyonda H_2O_2 olacak şekilde H_2O_2 uygulaması gerçekleştirildi ve plak 30 dakika daha %5 CO_2 içeren inkübatörde $37^\circ C$ 'de inkübe edildi. Süre sonunda CaMKII düzeylerine karar verebilmek, CaMKII'nin hücre canlılığını ve proliferasyonunu nasıl etkilediğini belirleyebilmek için oluşturulan deney düzeneğine göre belirtilen testler gerçekleştirildi.

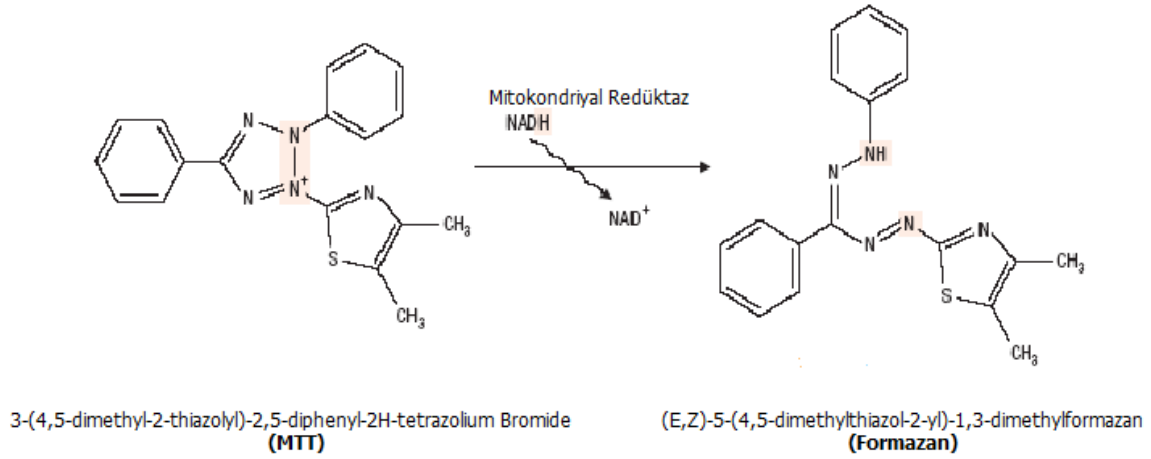
Tablo 4: Deney grupları ve gruplara uygulanan maddeler

Kontrol Grubu	Herhangi bir madde uygulaması yapılmadı.
H_2O_2 Grubu	30 dakika 1mM H_2O_2 uygulaması
KN-93 + H_2O_2 Grubu	24 saat 1 μ M KN-93 ön uygulamasının ardından 30 dakika H_2O_2 uygulaması
KN-93 Grubu	24 saat 1 μ M KN-93 uygulaması
KN-92 + H_2O_2 Grubu	24 saat 1 μ M KN-92 ön uygulamasının ardından 30 dakika H_2O_2 uygulaması
KN-92 Grubu	24 saat 1 μ M KN-92 uygulaması

3.6.10. Canlılık Testi

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide BioChemica (MTT) (AppliChem) kiti hücre canlılığını belirlemek için kullanıldı. 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına 8×10^3 hücre, komplet DMEM/F-12 hücre kültür ortamıyla birlikte son hacim 200 μ L olacak şekilde eklendi. Hücreler yüzeye tutunabilmeleri için 16-18 saat boyunca %5 CO_2 içeren inkübatörde $37^\circ C$ 'de inkübe edildi. Daha önce belirtilen şekilde inhibitör ve hidrojen peroksit uygulamaları yapıldı. Deney süresi sonunda her kuyucukta 200 μ L hacimde hücre ve ortam solüsyonu bulunan kuyulardan 110'ar μ L çekilerek kitin talimatlarına uygun olarak her kuyucuğa 10 μ L MTT solüsyonu eklendi. Böylece MTT solüsyonunun her kuyu içerisindeki konsantrasyonu 0,5 mg/mL olarak ayarlandı. Ayrıca hücre içermeyen 3 kuyuya 90 μ L komplet DMEM/F12 ortamı blank olarak koyulup bu kuyucuklara da 10 μ L MTT solüsyonu eklendi. Plak $37^\circ C$ 'de 3,5 saat inkübe edildi. Hazırlanan plak karşıt denge ile birlikte 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek kuyucuk içerisinde oluşan formazan kristalleri kuyucuk dibine çöktürüldü. Daha sonra

her kuyucuk içerisindeki tüm ortam-solüsyon karışımı pipet yardımıyla çekilerek uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) solüsyonu eklendi. Plak 37°C'de 30 dakika daha inkübe edildikten sonra spektrofotometer yardımıyla 560 nm ve 670 nm dalga boylarında absorbans değerleri okutuldu. 670 nm dalga boyu referans dalga boyu olarak kullanıldı. Sonuçlar kontrol grubuna oranlanarak yüzde canlılık olarak hesaplandı.



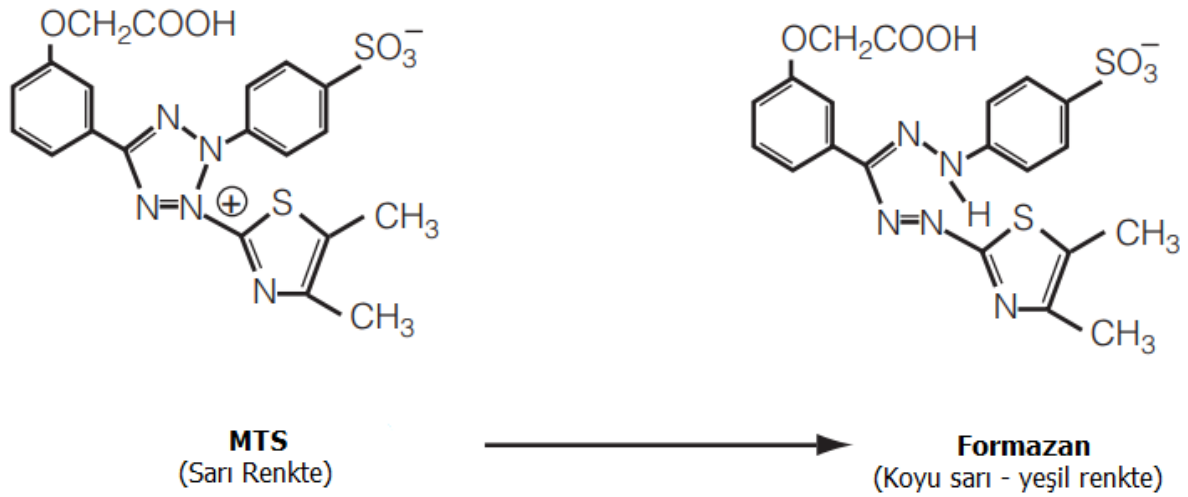
Şekil 6: MTT kit probunun formazan bileşiğine dönüşümü

Kit içerisinde mevcut sarı renkteki MTT tetrazolyum bromide bileşiği metabolik olarak aktif hücreler tarafından mitokondriyal redüktaz enzimi yardımıyla indirgenerek hücre kültür ortamında çözünmeyen mor renkteki kristal formda formazan bileşiğine dönüştürülür (Şekil 6). Bu reaksiyon, metabolik olarak aktif hücrelerde NADH'ın NAD⁺'a indirgenmesiyle gerçekleşir.

3.6.11. Proliferasyon Testi

CellTiter 96® AQueous One Solution Hücre Proliferasyon Kiti (MTS) (Promega) hücre proliferasyonunu belirlemek için kullanıldı. 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına 8x10³ hücre, komplet DMEM/F-12 hücre kültür ortamıyla birlikte son hacim 200 µL olacak şekilde eklendi. Hücreler yüzeye tutunabilmeleri için 16-18 saat boyunca %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de inkübe edildi. Daha önce belirtilen şekilde inhibitör ve hidrojen peroksit uygulamaları yapıldı. Deney süresi sonunda her kuyucukta 200 µL hacimde hücre ve ortam solüsyonu bulunan kuyulardan 100'er µL çekilerek kitin talimatlarına uygun olarak her kuyucuğa 20 µL MTS solüsyonu eklendi. Böylece MTs

solüsyonunun her kuyu içerisindeki final konsantrasyonu 317µg/mL olarak elde edildi. Ayrıca hücre içermeyen 3 kuyuya 100 µL komplet DMEM/F12 ortamı blank olarak koyulup bu kuyucuklara da 20 µL MTS solüsyonu eklendi. Plak 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde 3,5 saat inkübe edildi. Spektrofotometer yardımıyla 490 nm dalga boyunda absorbans değerleri okutuldu. Ayrıca MTS solüsyonu ile DMEM/F-12 içerisinde bulunan fenol kırmızı boyasının oluşabilecek etkileşimi hücre içermeyen boş kuyular kullanılarak ve bu kuyuların absorbans değerleri tüm kuyulardan çıkartılarak arkaplan absorbansı elimine edilmiş oldu. Sonuçlar kontrol grubuna oranlanarak yüzde proliferasyon olarak hesaplandı.



Şekil 7: MTS kit bileşiğinin formazan bileşiğine dönüşümü

Kitte bulunan MTS tetrazolyum bileşiği (Owen reaktifi) hücreler tarafından renkli bir ürün olan ve hücre kültür ortamında çözünebilen formazana dönüştürülür (Şekil 7). Reaksiyon metabolik olarak aktif hücrelerde dehidrojenaz enzimleri tarafından üretilen NADPH veya NADH yardımıyla gerçekleştirilir. Formazan bileşiğinin miktarı kültürdeki hücre sayısı ile direkt olarak orantılıdır.

3.6.12. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR veya qPZR)

Çalışmamızda CaMKII’nin izoformları olan α, β, γ ve δ izoformlarının hücre içerisindeki değişimleri gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile

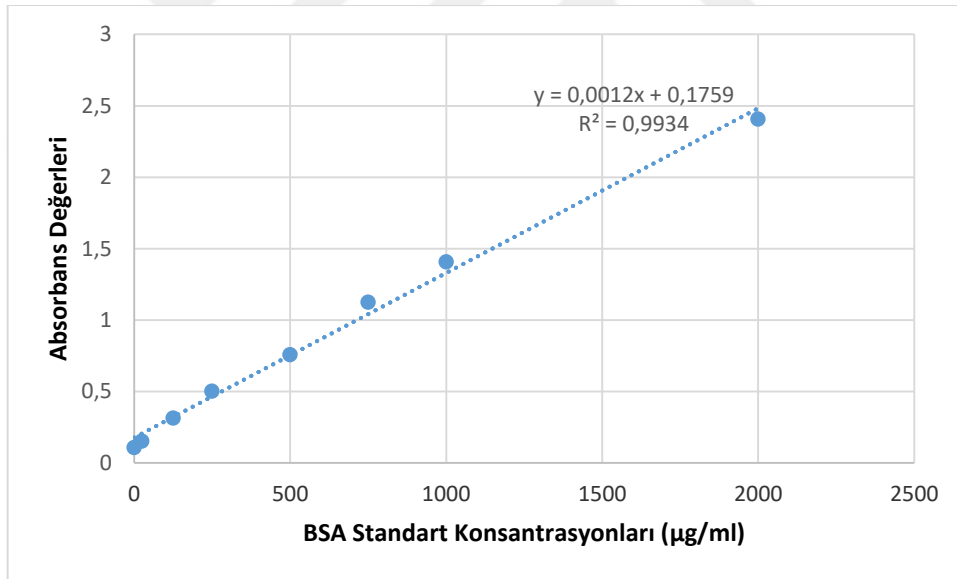
belirlenmiştir. Öncelikle 6 kuyucuklu hücre kültür plaklarına 200×10^3 hücre, komplet DMEM/F-12 hücre kültür ortamıyla birlikte son hacim 2 mL olacak olacak şekilde ekildi. Hücreler yüzeye tutunabilmeleri için 16-18 saat boyunca %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de inkübe edildi. Daha önce belirtilen şekilde inhibitör ve hidrojen peroksit uygulamaları yapıldı. Deney süresi sonunda her kuyucukta 2 mL hacimde hücre bulunan kuyulardan besi ortamı uzaklaştırılarak her kuyuya 400 µL Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 4-5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda hücrelerin tamamen yüzeyden kaldırılabilmesi için hafifçe plaklara vuruldu ve ışık mikroskobu ile tüm hücrelerin kalkışı doğrulandı. Tripsin-EDTA enziminin inaktive edilmesi için her kuyuya eklenen enzim miktarının iki katı olan 800 µL komplet DMEM/F-12 eklendi. Her kuyudaki tüm hücre/ortam karışımı mikro pipet yardımıyla 1,5 mL'lik eppendorf tüplere aktarıldı, yüzeyde kalmış olabilecek hücrelerin de toplanabilmesi için 300 µL PBS solüsyonu aynı kuyulara eklenerek kuyular yıkanıp elde edilen solüsyon 1,5 mL'lik eppendorf tüplerindeki hücre/ortam karışımının üzerine eklendi. Tüpler 5 dakika boyunca 1500 rpm'de uygun karşıt dengeleriyle birlikte santrifüj edildi. İşlem sonunda süpernatant uzaklaştırılarak tüpler buz üzerine alındı.

MN NucleoSpin RNA II kiti, PZR için gerekli olan total RNA'yı izole etmek için kullanılarak kit prosedürü uygulanıp RNA'lar izole edildi. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları Thermo Nanodrop 2000 cihazı kullanılarak belirlendi. cDNA sentezi için gerekli RNA miktarları hesaplanarak Qiagen RT² First Strand Kit'i ile elde edilen RNA'lar cDNA'ya dönüştürüldü. Oluşturulan cDNA'lar ile qPZR reaksiyonu hazırlanırken reaksiyon başına 12,5 µL Qiagen Real Time SYBR Green Mastermix, 5 µL cDNA, 1 µL RT² qPCR Primer Assay (GAPDH, CaMKII- α , β , γ ve δ), 6,5 µL nükleaz içermeyen H₂O kullanıldı. Tüm reaksiyon karanlık ortamda 200 µL'lik PZR tüpleri içerisinde hazırlandı. Tüm aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi. PZR tüpleri Qiagen Rotor Gene Q cihazının içerisine yerleştirilip primerlere uygun Tm sıcaklıkları ve döngü ayarlamaları yapılarak reaksiyon başlatıldı. Süre sonunda alınan sonuçlar bilgisayar ortamında analiz edildi.

3.6.13. BCA Protein Tayini

Çalışmamız kapsamında kullanılan CaMKII aktivite ölçüm kiti sonuçlarını normalize edebilmek için elde edilen hücre lizatlarının protein miktarları BCA kiti kapsamında ölçüldü.

BCA protein ölçümü yapılabilmesi için konsantrasyonu bilinen Bovin Serum Albumin (BSA) standart olarak kullanıldı. Standartlar 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 25 µg/mL ve 0 µg/mL BSA içerecek şekilde seri dilüsyonlar halinde hazırlandı. BCA kitinde bulunan solüsyonlar ile 60°C'de 30 dakika inkübasyon sonrası plak spektrofotometre yardımıyla 562nm dalgaboyunda okutularak absorbans değerleri elde edildi. Absorbans ölçümüne göre bir standart eğri grafiği oluşturuldu (Şekil 8). Grafikte bulunan eğim formülüne göre protein örneklerinin absorbans değerleriyle birlikte hesaplanmasının ardından örneklerin içediği protein miktarları µg/mL protein olarak elde edildi.



Şekil 8: BCA standart eğri grafiği

3.6.14. CaMKII Aktivite Ölçümü

Çalışmamızda CaMKII enziminin aktivitesi MBL Cyclex CaM-kinase II Assay kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle 6 kuyucuklu hücre kültür plaklarına 200×10^3 hücre, komplet DMEM/F-12 hücre kültür ortamıyla birlikte son hacim 2 mL olacak şekilde ekildi. Belirtilen deney koşulları gerçekleştirilerek deney süresi sonunda

her kuyucukta 2 mL hacimde hücre bulunan kuyulardan besi ortamı uzaklaştırıldı. Her kuyuya 400 µL Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 4-5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda hücrelerin tamamen yüzeyden kaldırılabilmesi için hafifçe plaklara vuruldu ve ışık mikroskobu ile tüm hücrelerin kalkışı doğrulandı. Tripsin-EDTA enziminin inaktive edilmesi için her kuyuya eklenen enzim miktarının iki katı olan 800 µL komplet DMEM/F-12 eklendi. Her kuyudaki tüm hücre/ortam karışımı mikro pipet yardımıyla 1,5 mL'lik eppendorf tüplere aktarıldı, yüzeyde kalmış olabilecek hücrelerin de toplanabilmesi için 300 µL PBS solüsyonu aynı kuyulara eklenerek kuyular yıkanıp elde edilen solüsyon 1,5 mL'lik eppendorf tüplerindeki hücre/ortam karışımının üzerine eklendi. Tüpler 5 dakika boyunca 1500 rpm'de uygun karşıt dengeleriyle birlikte santrifüj edildi. İşlem sonunda süpernatant uzaklaştırılarak tüpler buz üzerine alındı.

Oluşan pellete 250 µL buz üzerinde soğutulmuş PBS eklenerek 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant tekrar uzaklaştırılarak pellet üzerine %1 proteaz inhibitör kokteyli içeren 50 µL hücre lizis tamponu eklendi ve tüpler 30 dakika boyunca 5 dakikada bir vortekslenerek buz üzerinde inkübe edildi. Daha sonra 14000 rpm'de +4°C'de 30 dakika santrifüj edilen örneklerin süpernatantı alındı.

Elde edilen süpernatantların protein oranları BCA kiti ile belirlendi. MBL Cyclex CaM-kinase II Assay kiti prosedürü gerçekleştirildi. Plak 450 nm dalgaboyunda okutularak absorbans değerleri elde edildi. Sonuçlar bilgisayar ortamında analiz edilerek BCA kiti ile belirlenen protein miktarlarına oranlanarak elde edildi.

3.6.15. Total Oksidan ölçümü

Çalışmamızda örneklerde bulunan toplam oksidan miktarı Rel Assay Diagnostics Total Oxidant Status kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle 6 kuyucuklu hücre kültür plaklarına 200×10^3 hücre, komplet DMEM/F-12 hücre kültür ortamıyla birlikte son hacim 2 mL olacak olacak şekilde ekildi. Belirtilen deney koşulları gerçekleştirilerek deney süresi sonunda her kuyucukta 2 mL hacimde hücre bulunan kuyulardan besi ortamı uzaklaştırıldı. Her kuyuya 400 µL Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 4-5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda hücrelerin tamamen yüzeyden kaldırılabilmesi için hafifçe plaklara vuruldu ve ışık mikroskobu ile tüm hücrelerin kalkışı doğrulandı. Tripsin-EDTA enziminin inaktive edilmesi için her kuyuya eklenen enzim miktarının iki katı olan 800

μL komplet DMEM/F-12 eklendi. Her kuyudaki tüm hücre/ortam karışımı mikro pipet yardımıyla 1,5 mL'lik eppendorf tüplere aktarıldı, yüzeyde kalmış olabilecek hücrelerin de toplanabilmesi için 300 μL PBS solüsyonu aynı kuyulara eklenerek kuyular yıkanıp elde edilen solüsyon 1,5 mL'lik eppendorf tüplerindeki hücre/ortam karışımının üzerine eklendi. Tüpler 5 dakika boyunca 1500 rpm'de uygun karşıt dengeleriyle birlikte santrifüj edildi. İşlem sonunda süpernatant uzaklaştırılarak tüpler buz üzerine alındı.

Oluşan pellete 250 μL buz üzerinde soğutulmuş PBS eklenerek 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant tekrar uzaklaştırılarak pellet üzerine %1 proteaz inhibitör kokteyli içeren 50 μL hücre lizis tamponu eklendi ve tüpler 30 dakika boyunca 5 dakikada bir vortekslenerek buz üzerinde inkübe edildi. Daha sonra 14000 rpm'de $+40^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika santrifüj edilen örneklerin süpernatantı alındı.

Rel Assay Diagnostics Total Oxidant Status kiti prosedürü gerçekleştirildi. Alınan süpernatantlar 1:5 oranında seyreltilerek 45 μL süpernatant uygun küvetlere aktarıldı. Kit prosedürü uygulanarak 530nm dalgaboyunda absorbans değerleri elde edildi. Sonuçlar bilgisayar ortamında analiz edilerek $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 miktarları hesaplandı.

3.7. Araştırma Planı ve Takvim



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

SPSS programının 18.0 versiyonu kullanılarak araştırma sonuçlarının istatistik analizi yapıldı. Mann Whitney U testi ve Q-square testi gruplar arası karşılaştırmalarda kullanılarak değerlendirme gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamız in vitro çalışmadır, bu yüzden in vivo çalışmalarla desteklenmelidir. Ayrıca insan göbek kordonundan elde edilen WJ-MKH'lerin farklılaşma yatkınlığı nedeniyle sadece 5. Pasaja kadar kullanılabilmesinden ötürü analiz tekrar sayılarımız

sınırlıdır. Çalışmamızda sadece KN-93 inhibitörü kullanılmış ve henüz keşfedilebilmiş direkt bir CaMKII inhibitörü olmadığından sadece bu inhibitörün etkileri gözlemlenebilmiştir. CaMKII aktivitesini ölçmek için çalışmamızda kullanılan kit diğer CaM-kinazlar üzerinde de etkili olabilir, bu açıdan daha sonraki çalışmalarda aktivite ölçen başka kitlerle değerlendirmeler yapılmalıdır.

3.10. Etik Kurul Onayı

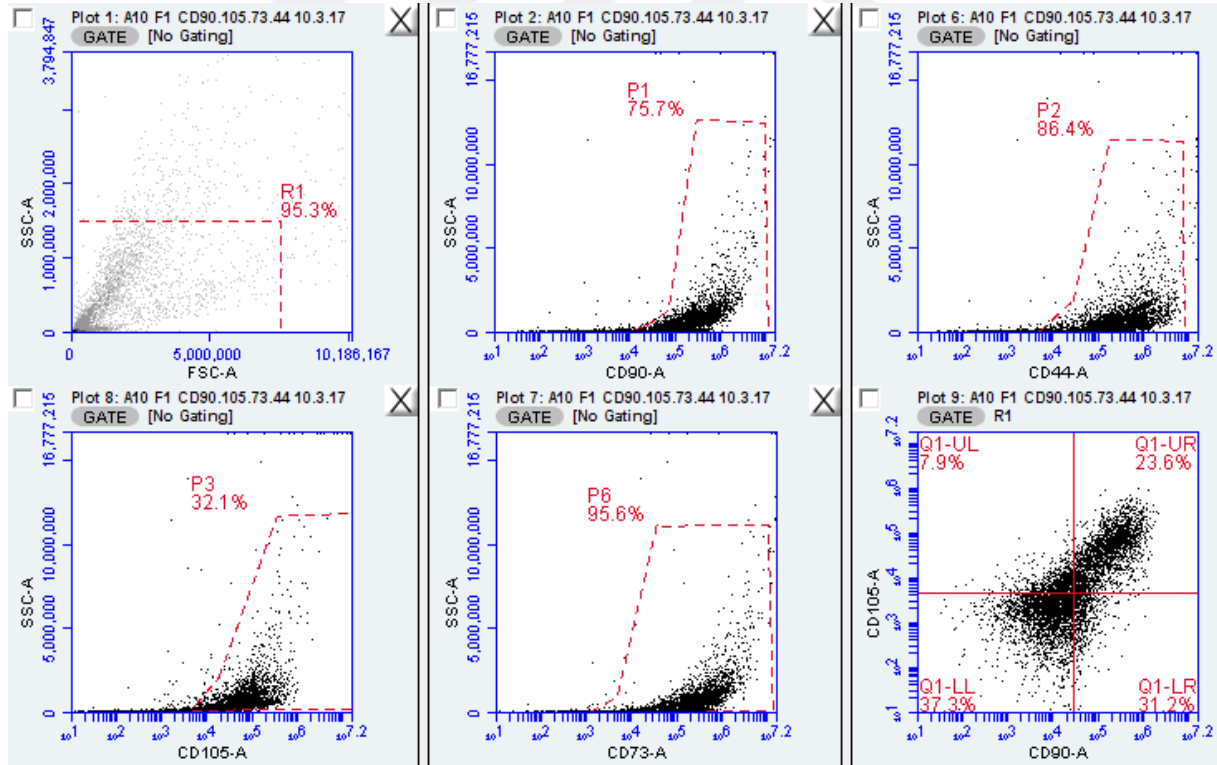
Çalışma DEÜ Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik kurulu tarafından 4061-GOA protokol numarası ve 2018/14-42 karar numarasıyla 07.06.2018 tarihinde uygun bulunmuştur. Çalışmamızdaki değişiklik DEÜ Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik kurulu tarafından 4061-GOA protokol ve 2019/08-35 karar numarasıyla 03.04.2019 tarihinde uygun bulunmuştur.

4. BULGULAR

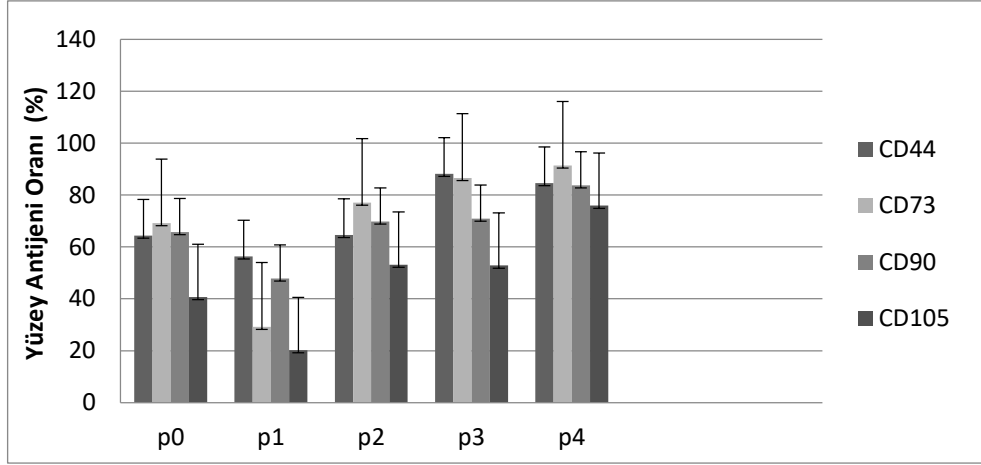
4.1. WJ-MKH'lerin Karakterizasyonu

4.1.1. Akış Sitometri Deneyi Sonuçları

Eksplant yöntemi kullanılarak izole edilmiş WJ-MKH'lerinin karakterizasyonunu gerçekleştirirken WJ-MKH'lerde hangi kök hücre yüzey antijenlerinin bulunduğunu tespit edebilmek için akış sitometrisi deneyi kullanıldı. Farklı zamanlarda farklı gebelerden temin edilmiş göbek kordonlarından eksplant metodu ile izole edilmiş WJ-MKH'lerden farklı deney setleri kurularak karakterizasyonları gerçekleştirildi. Elde edilen verilere göre izole edilmiş WJ-MKH'lerin kök hücre olduklarını teyit edildi. Gerçekleştirilen akış sitometri sonuçları analiz edildiğinde MKH yüzey antijenleri olan CD90 antijeninin oranı ortalama %75-90, CD105 antijeninin oranı ortalama 70-80, CD73 yüzey antijeninin oranı ortalama %85-95 ve CD44 yüzey antijeni oranı ortalama %70-85 olduğu tespit edildi (Şekil 9).



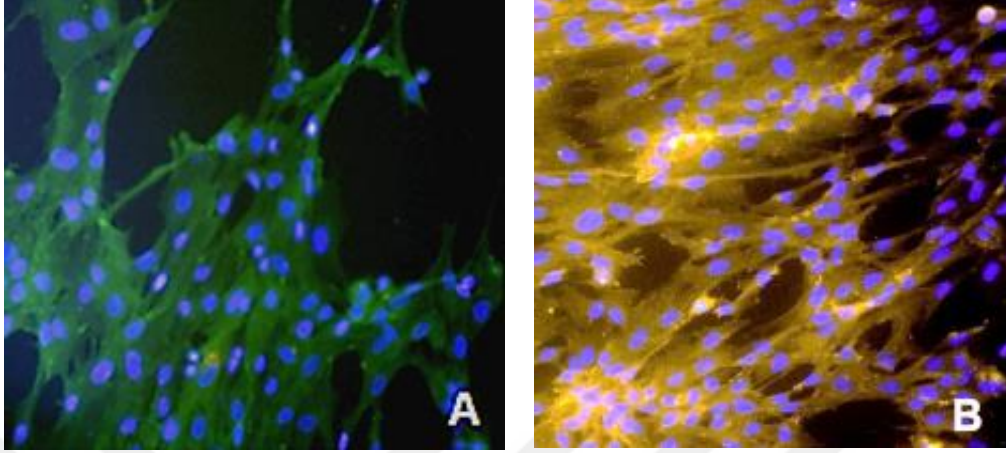
Şekil 9: WJ-MKH'ler ile gerçekleştirilen örnek bir akış sitometri verisinde CD90, CD44, CD105 ve CD73 kök hücrelere özgü yüzey antijenlerinin yüzde oranları.



Şekil 10: Eksplant yöntemi ile izole edilmiş WJ-MKH'lerde kök yüzey antijenleri olan CD44, DC73, CD90 ve CD105 antijenlerinin 4. Pasaja kadar pasaj numarasına göre değişim yüzdeleri (Sonuçlar ortalama $\pm$ standart deviasyon olarak verilmiştir, $n=3$).

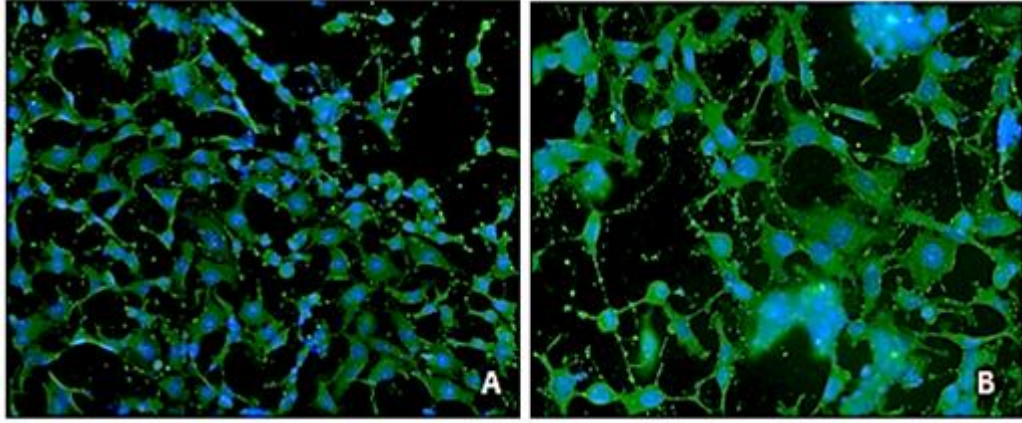
Gerçekleştirilmiş akış sitometri analizleri ile WJ-MKH'lerin kök hücre karakteristiğinin hücre yoğunluğu ve pasajlanma sıklığından önemli ölçüde etkilendiği belirlendi. Hücre yoğunluğunda fazla artış olduğunda MKH'lere özgü yüzey antijenlerinin yüzdelerinde azalma saptandı. Ayrıca pasaj 1 ve 3 aralığındaki erken pasaj dönemi ve pasaj 5 ve 7 aralığındaki geç pasaj döneminde bulunan WJ-MKH'lerde kök hücre belirteçleri değerlendirildiğinde pasaj numarası arttıkça hücrelerin kök hücre karakteristiğinden uzaklaştığı tespit edildi. Bu sebeple deneylerde kullanılan WJ-MKH'ler sadece 4. Pasaja kadar kullanıldı (Şekil 10).

4.1.2.WJ-MKH'lerin İmmünofloresan Yöntemle Değerlendirilmesi



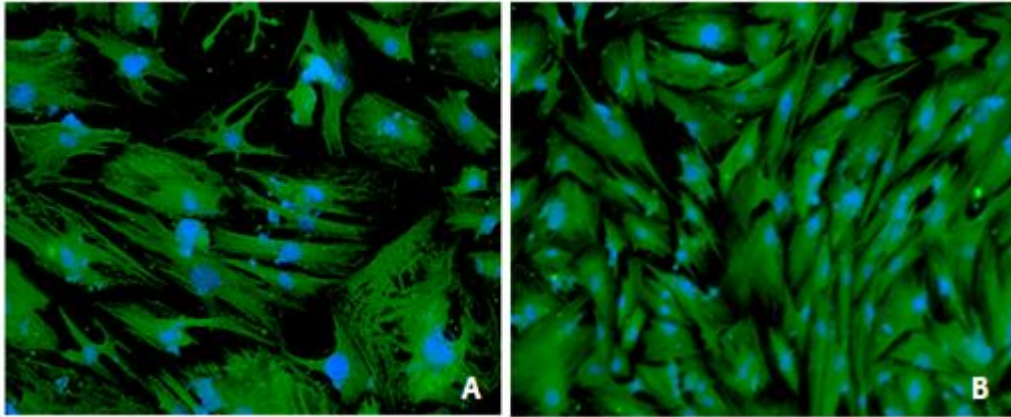
Şekil 11: Kök hücrelere özgü hücre yüzey antijenlerinin İF mikroskop 20X büyütmede görüntüleri. FITC ile işaretlenmiş (yeşil) CD90 antikorunun floresans ışıma görüntüsü (A), Fikoeritrin ile işaretlenmiş (turuncu) CD44 antikorunun floresans ışıma görüntüsü (B) (Hücre çekirdekleri DAPI kullanılarak mavi renkte gösterilmiştir.)

WJ-MKH'lerin kök hücre karakteristiğinin doğrulanabilmesi için yapılan immünofloresan yöntemlerde Olympos İF mikroskop ile görüntü alındı. Hücre nükleusları DAPI ile boyanarak hücreler doğru tanımlama yapılabilmesi için işaretlendi. MKH'lere özgü CD44 ve CD90 yüzey antijenlerinin WJ-MKH'lerinde varlığı floresan işaretleme metoduyla gösterildi (Şekil 11).



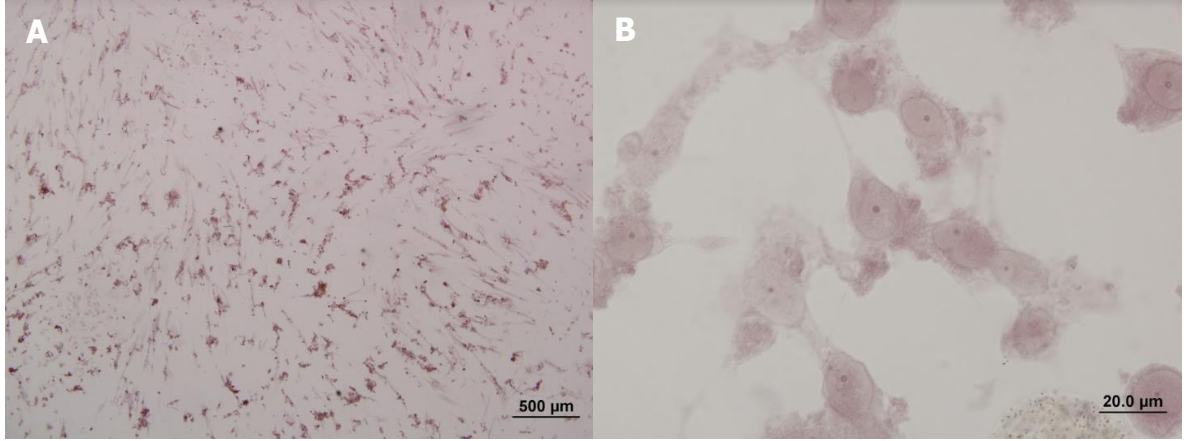
Şekil 12: WJ-MKH'lerin osteojenik hücelere farklılaştırıldıktan sonraki görüntüleri. 10X büyütme (A), 20X büyütme (B) Hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile sitozol FITC (yeşil) ile işaretlenmiştir.

WJ-MKH'leri eksplant yöntemi kullanılarak izole edildi ve MKH karakteristiklerine sahip olduklarının ispat edilmesi için R&D Systems MKH Fonksiyonel Tanımlama Kiti kullanıldı. Gerçekleştirilen deneylerin ardından WJ-MKH'lerin osteojenik hücelere farklılaşması (Şekil 12) ve adipojenik hücelere farklılaşması (Şekil 13) gösterildi.

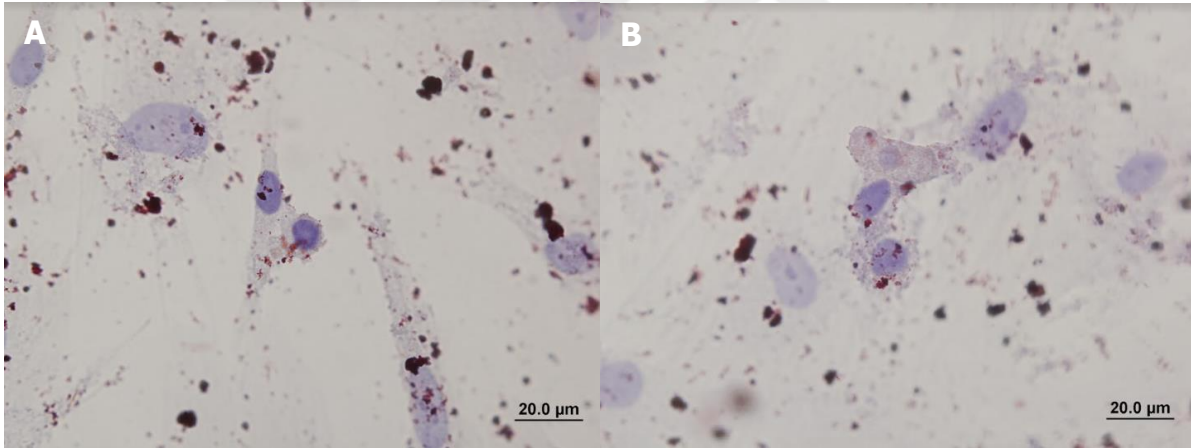


Şekil 13: WJ-MKH'lerin adipojenik hücelere farklılaştırıldıktan sonraki görüntüleri. 10X büyütme (A), 20X büyütme (B) Hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile sitozol FITC (yeşil) ile işaretlenmiştir.

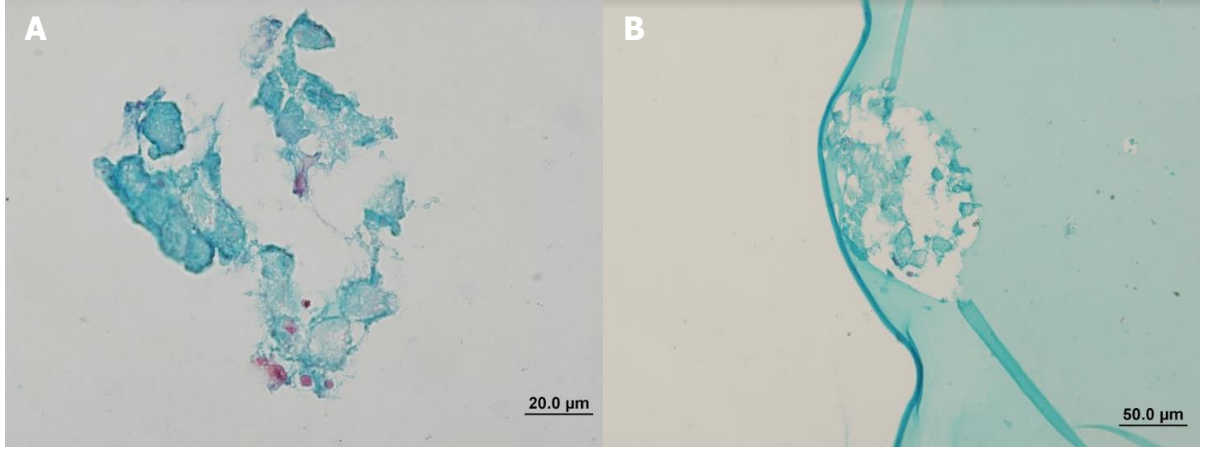
4.1.3.WJ-MKH'lerin Histokimyasal Boyama İle Değerlendirilmesi



Şekil 14: WJ-MKH'lerin osteojenik hücelere farklılaştırıldıktan sonraki görüntüleri. 10X büyütme (A) ve 100X büyütme (B), hüceler Alizarin Red ile boyanmıştır.



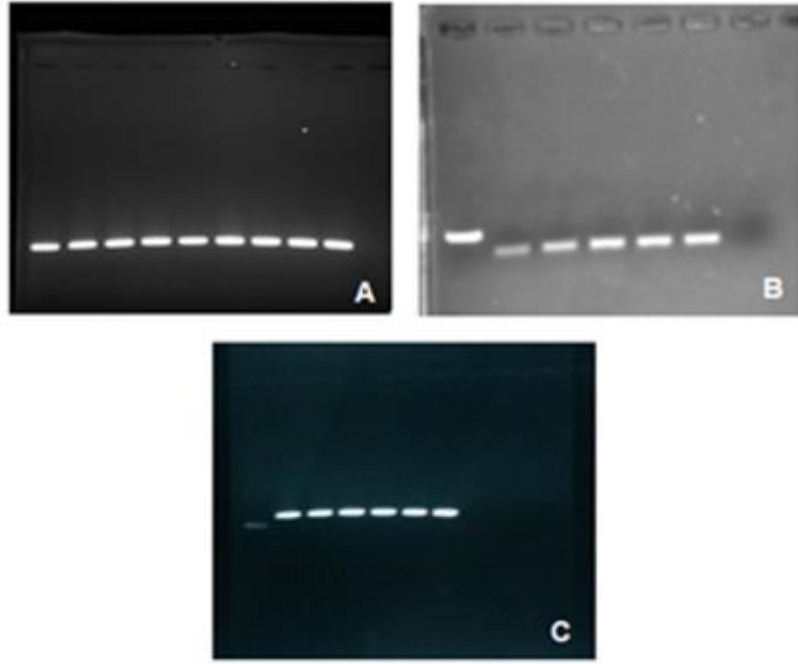
Şekil 15: WJ-MKH'lerin adipojenik hücelere farklılaştırıldıktan sonraki görüntüleri. 100X büyütme (A) ve 100X büyütme (B), hüceler Oil Red ile boyanmıştır.



Şekil 16: WJ-MKH'lerin kondrojenik hücelere farklılaştırıldıktan sonraki görüntüleri. 100X büyütme (A) ve 20X büyütme (B), hücreler Alcian Blue ile boyanmıştır.

Eksplant yöntemi ile izole edilen WJ-MKH'lerinin, MKH karakteristiklerine sahip olduklarının ispat edilmesi için R&D Systems MKH Fonksiyonel Tanımlama Kiti kullanıldı. Gerçekleştirilen kit protoklü sonrasında WJ-MKH'lerin osteojenik hücelere farklılaştırılmaları Alizarin Red boyaması ile gösterildi (Şekil 14), adipojenik hücelere farklılaştırılmaları Oil Red boyaması ile gösterildi (Şekil 15) ve kondrojenik hücelere farklılaştırılmaları Alcian Blue boyaması ile gösterildi (Şekil 16).

4.1.4.WJ-MKH'lerin RT-PZR Yöntemi İle Değerlendirilmesi

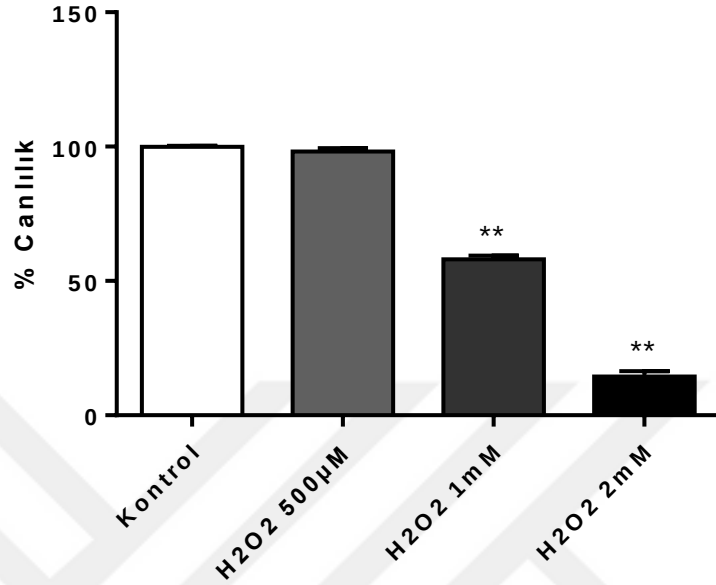


Şekil 17: Agaroz jel elektroforezinde WJ-MKH'lerin karakterizasyonu için kullanılan CD90, CDH2 ve house-keeping gen olan GAPDH genlerinden elde edilen PZR ürünlerinin görüntüleri. Farklı pasaj dönemlerinden elde edilen cDNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda GAPDH geninin PZR ürünleri (A), CD90 geninin PZR ürünleri (B) ve CDH2 geninin PZR ürünleri (C).

WJ-MKH'lerinin karakterizasyonu için kök hücrelere özgü genlerin hedef bölgelerine uygun primer çiftleri kullanılarak RT-PZR deneyleri gerçekleştirildi. Deney sonucu elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile jelde yürütülerek görüntüleri alındı. House-keeping GAPDH geni, kök hücre karakterizasyonu için CD90 ve CDH2 genlerinin PZR ürünlerine ait bantlar WJ-MKH'lerinden elde edilmiş örneklerde gözlemlendi (Şekil 17).

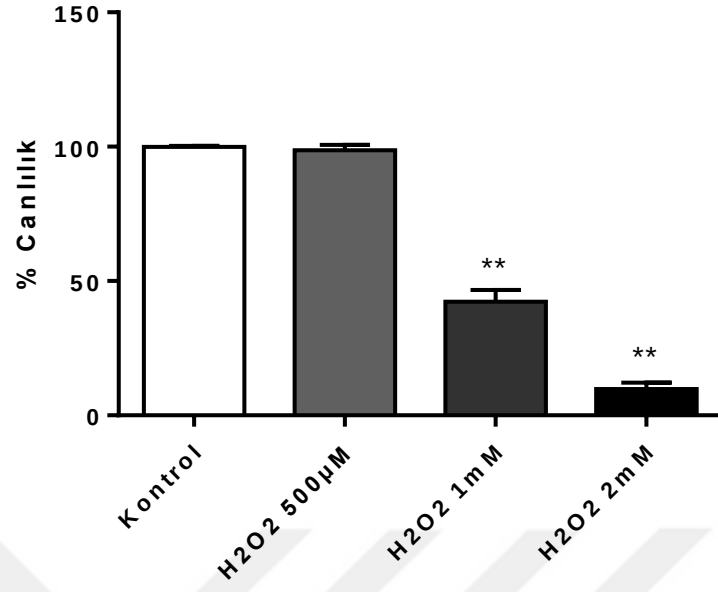
4.2. WJ-MKH'lerin Canlılık Düzeylerinin Belirlenmesi

4.2.1. H₂O₂ Dozunun Belirlenmesi



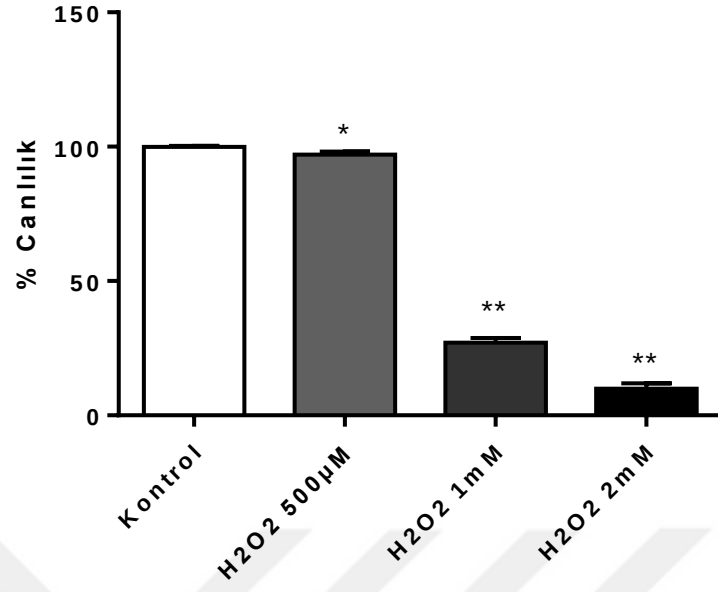
Şekil 18: WJ-MKH'lerde 30 dakika H₂O₂ uygulamasının doza bağlı olarak kök hücre canlılığı üzerine etkisi (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, n=5, * Kontrol grubuna göre p<0,05).

Yapılan MTT ölçümünde 500 µM, 1 mM ve 2 mM H₂O₂ uygulamasının 30 dakika süresince uygulandığı WJ-MKH'lerde hücre canlılığı doza bağımlı olarak azaldı. 500 µM H₂O₂ uygulamasında kontrole göre anlamlı bir azalma saptanmadı. 1 mM ve 2 mM H₂O₂ uygulamasında ise hücre canlılığı kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı. Sonuçlar ortalama±SEM olarak verilmiştir (1 mM ve 2 mM için p=0,0079) (Şekil 18).



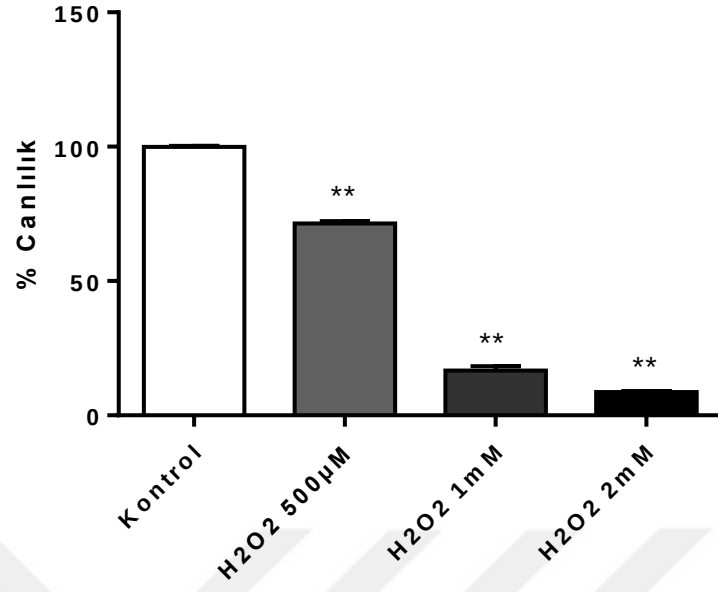
Şekil 19: WJ-MKH’lerde 1 saat H₂O₂ uygulamasının doza bağlı olarak kök hücre canlılığı üzerine etkisi (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, n=5, * Kontrol grubuna göre p<0,05).

MTT ölçümü ile karar verilen absorbans değerlerinden hesaplanan sonuçlara göre 500 µM, 1 mM ve 2 mM H₂O₂ uygulamasının 1 saat boyunca uygulandığı WJ-MKH’lerde hücre canlılığı doza bağımlı olarak azaldı. 500 µM H₂O₂ uygulamasında kontrole göre anlamlı bir azalma saptanmadı fakat 1 mM ve 2 mM H₂O₂ uygulamasında hücre canlılığı kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı. Sonuçlar ortalama±SEM olarak verilmiştir (1 mM ve 2 mM için p=0,0079) (Şekil 19).



Şekil 20: WJ-MKH’lerde 2 saat H_2O_2 uygulamasının doza bağlı olarak kök hücre canlılığı üzerine etkisi (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, $n=5$, * Kontrol grubuna göre $p<0,05$).

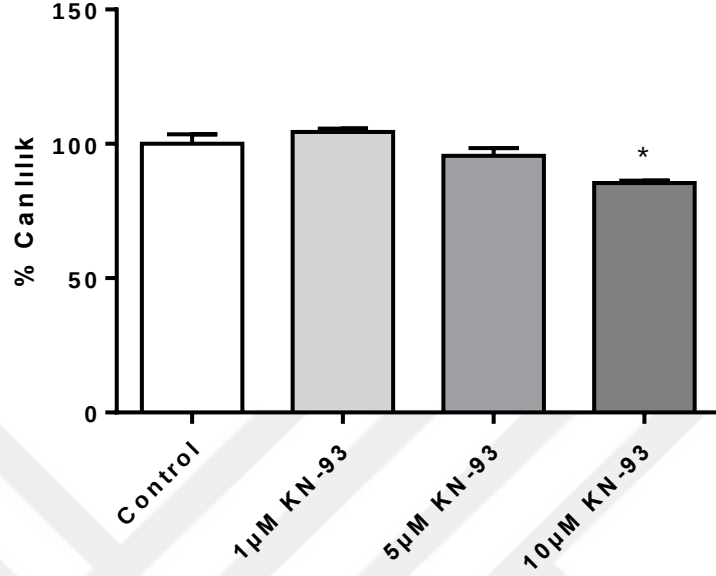
MTT ölçümü ile belirlenen sonuçlara göre 500 μM , 1 mM ve 2 mM H_2O_2 uygulamasının 2 saat boyunca uygulandığı WJ-MKH’lerde hücre canlılığı doza bağımlı olarak azaldı. 500 μM H_2O_2 uygulamasında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p=0,0238$). Ayrıca 1 mM ve 2 mM H_2O_2 uygulamasında hücre canlılığı kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir (1 mM ve 2 mM için $p=0,0079$) (Şekil 20).



Şekil 21: WJ-MKH’lerde 3 saat H₂O₂ uygulamasının doza bağlı olarak kök hücre canlılığı üzerine etkisi (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, n=5, * Kontrol grubuna göre p<0,05).

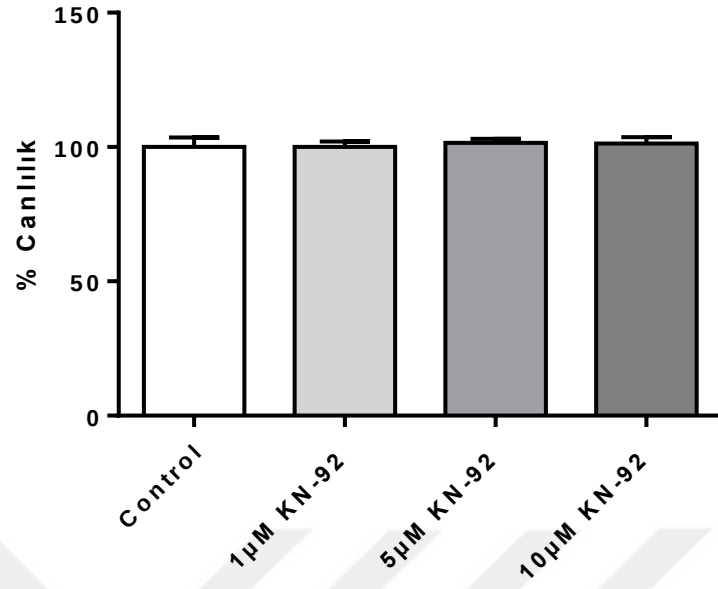
MTT testi ile belirlenmiş sonuçlara göre 500 µM, 1 mM ve 2 mM H₂O₂ uygulamasının 3 saat boyunca uygulandığı WJ-MKH’lerde hücre canlılığı doza bağımlı olarak azaldı. 500 µM, 1 mM ve 2 mM H₂O₂ uygulamasında hücre canlılığı kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı. Sonuçlar ortalama±SEM olarak verilmiştir (500 µM, 1 mM ve 2 mM için p=0,0079) (Şekil 21).

4.2.2.KN-93 İnhibitör ve KN-92 Negatif İnhibitör Dozunun Belirlenmesi



Şekil 22: WJ-MKH'lerde 24 saat KN-93 uygulamasının doza bağlı olarak kök hücre canlılığı üzerine etkisi (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, n=5, * Kontrol grubuna göre $p<0,05$).

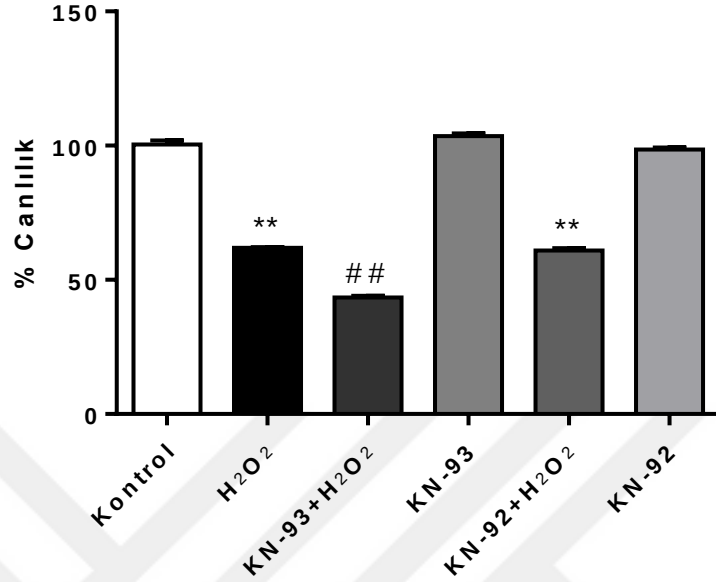
Yapılan MTT ölçümü ile 1 µM, 5 µM ve 10 µM KN-93 uygulamasının 24 saat süresince uygulandığı WJ-MKH'lerde hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı olmayıp 1 µM dozda %4,4 oranında artış gösterirken 5 µM KN-93 dozunda %4,5 azalma gözlemlendi. 10 µM KN-93 dozu uygulandığında ise hücre canlılığı kontrol grubuna oranla %14,6 oranında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı. Sonuçlar ortalama±SEM olarak verilmiştir (10 µM KN-93 dozu için $p=0,0317$) (Şekil 22).



Şekil 23: WJ-MKH'lerde 24 saat KN-92 uygulamasının doza bağlı olarak kök hücre canlılığı üzerine etkisi (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, n=5, * Kontrol grubuna göre $p<0,05$).

MTT testi ile belirlenen sonuçlara göre 1 μ M, 5 μ M ve 10 μ M KN-92 uygulamasının 24 saat süresince uygulandığı WJ-MKH'lerde hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı bir derecede artış ya da azalma göstermemiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir (1 μ M KN-92 dozu için $p=0,6905$, 5 μ M 10 μ M KN-92 dozu için $p=0,5476$) (Şekil 23).

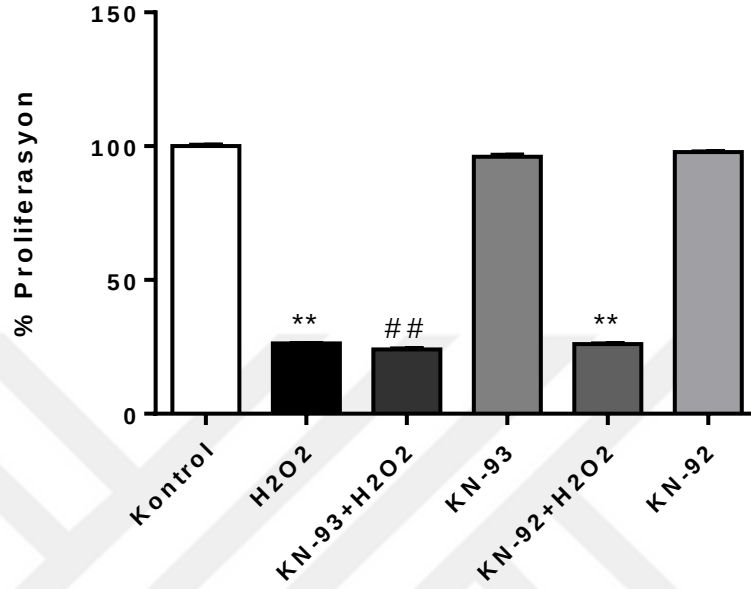
4.2.3.WJ-MKH'lere H₂O₂, KN-93 İnhibitör ve KN-92 Negatif İnhibitör Uygulamasının Canlılık Düzeyine Etkisi



Şekil 24: WJ-MKH'lerde 24 saat 1 μ M KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1 μ M KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1 mM H₂O₂ uygulamalarının kök hücre canlılığı üzerine etkisi (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, n=5, * Kontrol grubuna göre, # H₂O₂ ve KN-92+H₂O₂ grubuna göre, p<0.05).

Yapılan MTT ölçümü ile belirlenen sonuçlara göre sadece 24 saat 1 μ M KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1 μ M KN-92 uygulamasının hücre canlılığı üzerinde kontrole oranla yapılan hesaplamada istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Sadece 30 dakika 1 mM H₂O₂ uygulamasının ise hücre canlılığını kontrole göre %38,1 oranda azaltarak ve 24 saat 1 μ M KN-92 ön uygulamasının yapıp 30 dakika 1 mM H₂O₂ uygulamasının gerçekleştirildiği grupta hücre canlılığı kontrole oranla %39 azalarak istatistiksel olarak anlamlı bir değişme gösterdiği saptanmıştır. 24 saat 1 μ M KN-93 ön uygulamasının yapıp 30 dakika 1 mM H₂O₂ uygulamasının gerçekleştirildiği grupta ise kök hücre canlılığının kontrol grubuna göre %57 oranda azalarak ve sadece H₂O₂ grubu ile birlikte KN-92+H₂O₂ grubuna göre %28 oranda azalarak istatistiksel olarak anlamlı bir değişme gösterdiği belirlenmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir (H₂O₂ grubu, KN-93+H₂O₂ grubu, KN-93+H₂O₂ grubu için p=0,0079) (Şekil 24).

4.3. WJ-MKH'lerin H₂O₂, KN-93 İnhibitör ve KN-92 Negatif İnhibitör Uygulaması Sonucunda Proliferasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

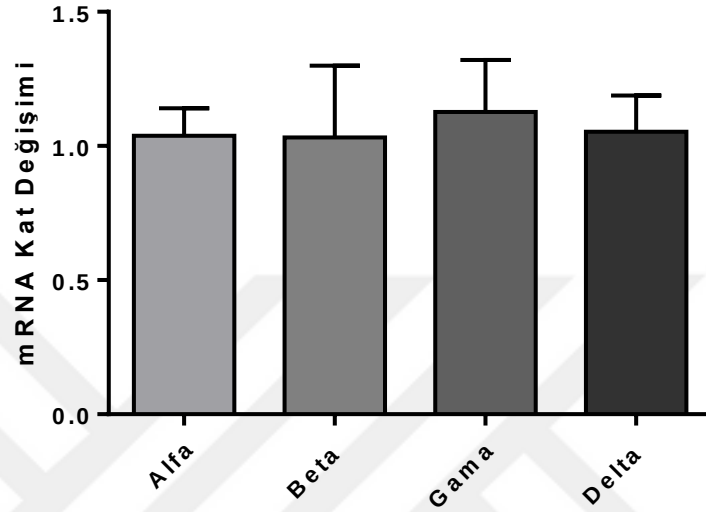


Şekil 25: WJ-MKH'lerde 24 saat 1 µM KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1 µM KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1 mM H₂O₂ uygulamalarının kök hücre proliferasyonu üzerine etkisi (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, n=5, * Kontrol grubuna göre, # H₂O₂ ve KN-92+H₂O₂ grubuna göre, p<0,05).

MTT testi ile belirlenen sonuçlara göre sadece 24 saat 1 µM KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1 µM KN-92 uygulamasının kök hücre proliferasyonu üzerinde kontrole oranla yapılan hesaplamada istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Sadece 30 dakika 1 mM H₂O₂ uygulamasının ise kök hücre proliferasyonunu kontrole göre %73,7 oranda azaltarak ve 24 saat 1 µM KN-92 ön uygulamasının yapıp 30 dakika 1 mM H₂O₂ uygulamasının gerçekleştirildiği grupta hücre proliferasyonu kontrole oranla %73,9 azalarak istatistiksel olarak anlamlı bir değişme gösterdiği saptanmıştır. 24 saat 1 µM KN-93 ön uygulamasının yapıp 30 dakika 1 mM H₂O₂ uygulamasının gerçekleştirildiği grupta ise kök hücre proliferasyonunun kontrol grubuna göre %76 oranda azalarak ve sadece H₂O₂ grubuna göre %2,1 oranda KN-92+H₂O₂ grubuna göre ise %2 oranda azalarak istatistiksel olarak anlamlı bir değişme gösterdiği

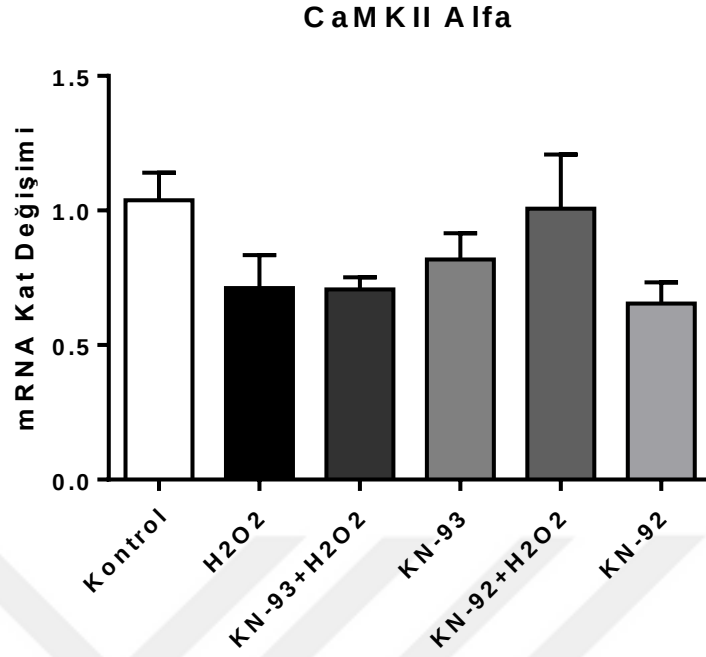
belirlenmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir (H_2O_2 grubu, KN-93+ H_2O_2 grubu, KN-93+ H_2O_2 grubu için $p=0,0079$) (Şekil 25).

4.4. CaMKII Enzimi İzofom Düzeylerinin RT-qPZR İle Değerlendirilmesi



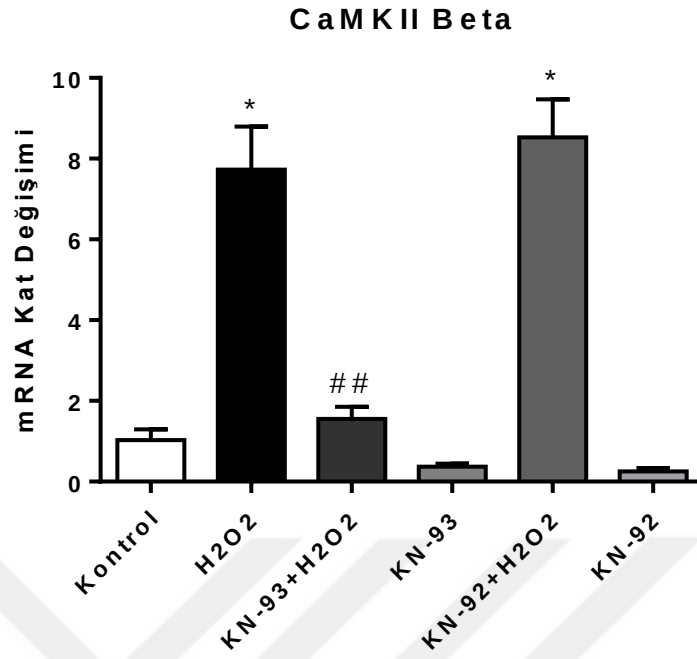
Şekil 26: WJ-MKH'lerinde CaMKII α , β , γ ve δ izofomlarının gen ekspresyon değişimleri (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, $p>0,05$).

RT-qPZR yöntemi ile elde edilmiş sonuçlara göre herhangi bir uygulama yapılmayan WJ-MKH'lerinde CaMKII izofom değişimleri incelenmiş ve CaMKII alfa, beta, gama ve delta izofomlarının gen ekspresyonları arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p>0.05$) Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Şekil 26).

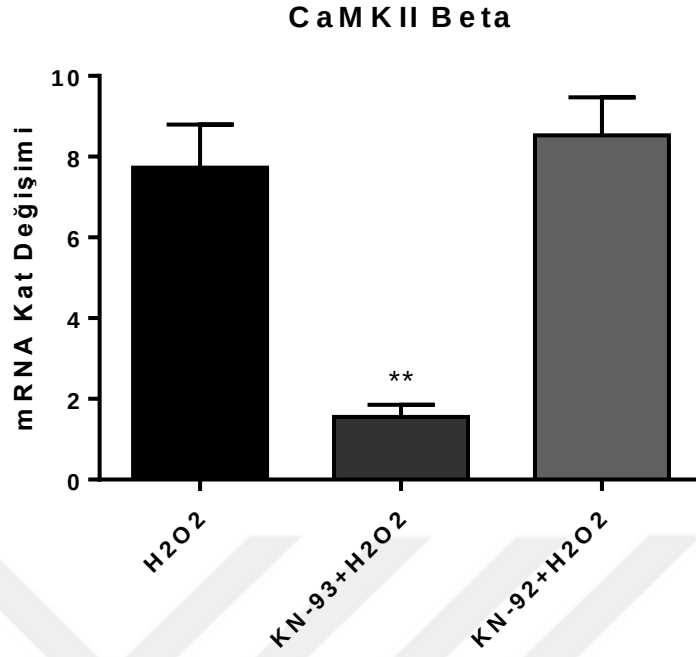


Şekil 27: WJ-MKH’lerde 24 saat 1 μ M KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1 μ M KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1 mM H₂O₂ uygulamalarının kök hücrelerdeki CaMKII Alfa izoformu gen ekspresyon değişimine etkisi (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, n=5, p>0,05).

RT-qPZR ile elde edilen sonuçlara göre 1 mM H₂O₂ stres koşulunda, 24 saat 1 μ M KN-93 ön uygulamasının yapıp 30 dakika 1 mM H₂O₂ stres koşulunun uygulandığı, sadece 24 saat 1 μ M KN-92 uygulaması ve 24 saat 1 μ M KN-93 uygulamasının yapıldığı gruplarda kontrole göre bir azalma olmasına rağmen bu azalma istatistiksel düzeyde anlamlı değildir (p>0.05) 24 saat 1 μ M KN-92 ön uygulamasının yapıp 30 dakika 1 mM H₂O₂ stres koşulunun uygulandığı grupta ise kontrol grubuna göre değişiklik gözlemlenmemiştir (p>0.05) Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Şekil 27).

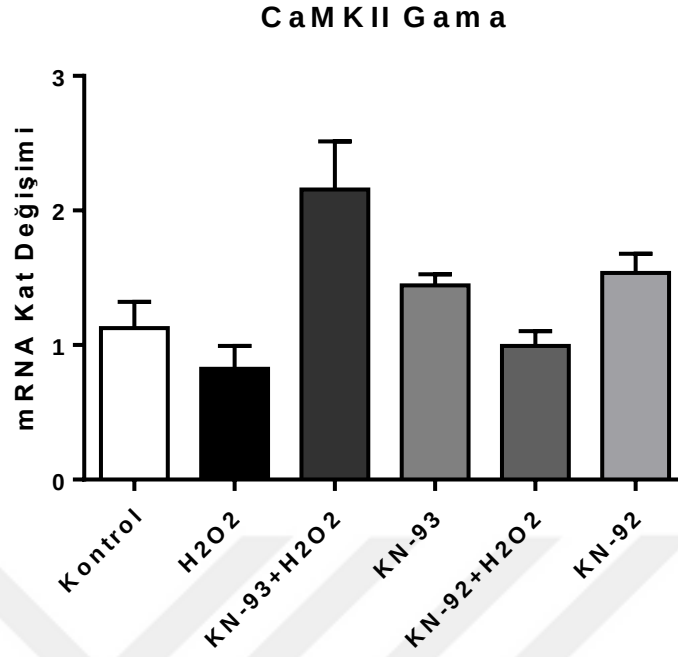


Şekil 28: WJ-MKH'lerde 24 saat 1 μ M KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1 μ M KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1 mM H₂O₂ uygulamalarının kök hücrelerdeki CaMKII Beta izoformu gen ekspresyon değişimine etkisi (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, n=5, * Kontrol grubuna göre, # H₂O₂ ve KN-92+H₂O₂ grubuna göre, p<0,05).



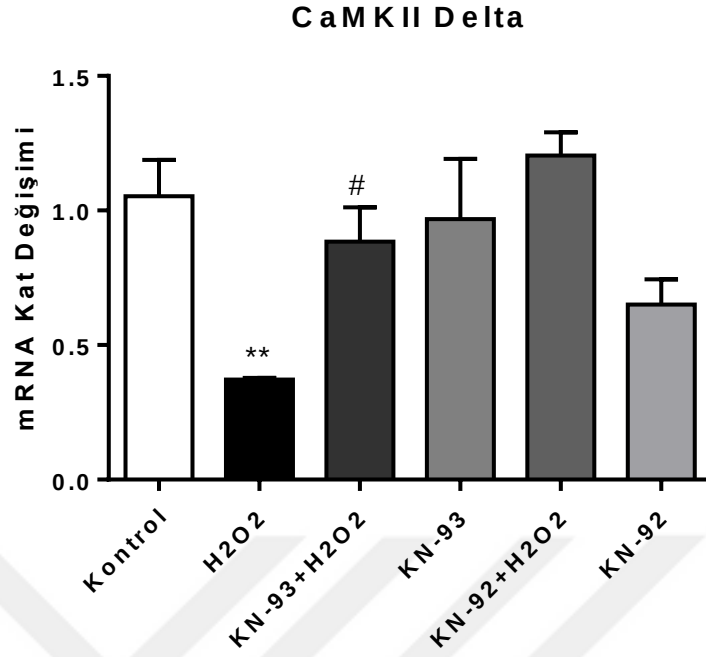
Şekil 29: WJ-MKH’lerde 24 saat 1 μ M KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1 μ M KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1 mM H₂O₂ uygulamalarının gruplar arasındaki CaMKII Beta izoformu gen ekspresyon değişimine etkisi (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, n=5, * H₂O₂ ve KN-92+H₂O₂ grubuna göre, p<0,05).

RT-qPZR ile belirlenen sonuçlara göre 1 mM H₂O₂ stres koşulunda CaMKII Beta izoformu gen ekspresyonu seviyesi kontrole göre 7,7 kat ve 24 saat 1 μ M KN-92 ön uygulamasının yapıp 30 dakika 1 mM H₂O₂ stres koşulunun uygulandığı grupta ise kontrole göre 8,5 kat artarak istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir (p=0,0159). 24 saat 1 μ M KN-93 CaMKII inhibitörü ön uygulamasının yapıp 30 dakika 1 mM H₂O₂ stres koşulunun uygulandığı grupta bu artış kontrol grubu seviyesine gerileyerek sadece H₂O₂ stres koşulu ve KN-92+ H₂O₂ gruplarına göre yaklaşık olarak 8 kat azalma göstererek istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değişmiştir (p=0,0079) (Şekil 29). Ayrıca bu azalma H₂O₂, KN-93+H₂O₂ ve KN-92+ H₂O₂ grupları arasında daha net şekilde gösterilmiştir (Şekil 28) Sadece 1 μ M KN-93 veya 1 μ M KN-92 uygulamalarının ise kök hücrelerdeki CaMKII Beta izoformu gen ekspresyonu üzerinde istatistiksel ölçüde anlamlı olarak bir değişiklik göstermediği saptanmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir(Şekil 29).



Şekil 30: WJ-MKH’lerde 24 saat 1 μ M KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1 μ M KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1 mM H₂O₂ uygulamalarının kök hücrelerdeki CaMKII Gama izoformu gen ekspresyon değişimine etkisi (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, n=5, p>0,05).

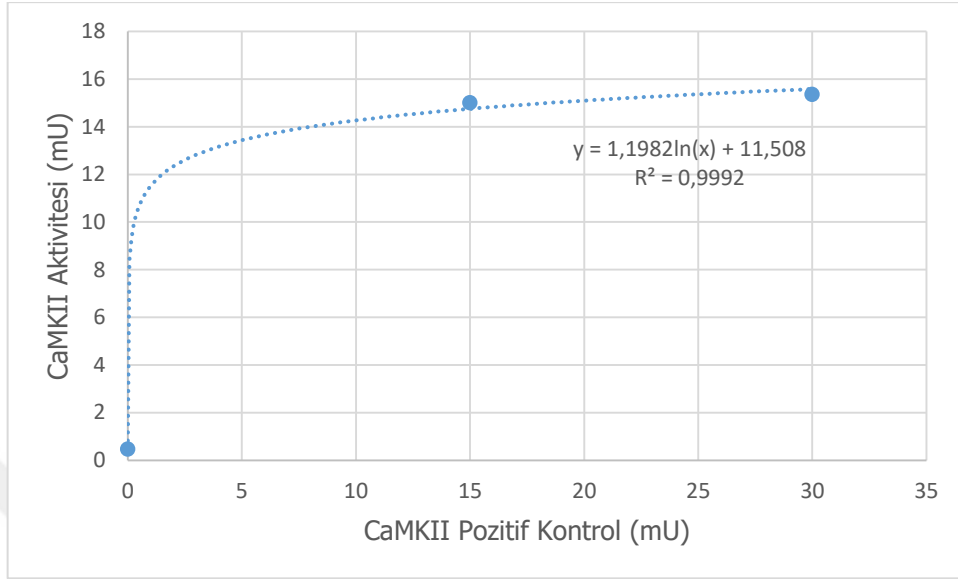
RT-qPZR ile elde edilen sonuçlara göre 1 mM H₂O₂ stres koşulunda ve 24 saat 1 μ M KN-92 ön uygulamasının yapıp 30 dakika 1 mM H₂O₂ stres koşulunun uygulandığı, gruplarda CaMKII Gama izoformu gen ekspresyon seviyesinde kontrole göre bir azalma görülmesine rağmen bu değişiklik istatistiksel düzeyde anlamlı değildir (p>0.05) 24 saat 1 μ M KN-93 ön uygulamasının ardından 30 dakika 1 mM H₂O₂ stres koşulunun uygulandığı grupta ise kontrol grubuna göre CaMKII Gama izoformu gen ekspresyonu seviyesinde yaklaşık 2,5 kat artış gözlemlenmesine rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (p>0,05). Sadece 24 saat 1 μ M KN-93 veya KN-92 uygulamaları ise CaMKII Gama izoformu gen ekspresyonu seviyelerini kontrole göre istatistiksel düzeyde anlamlı derecede arttırmamıştır (p>0,05). Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Şekil 30)



Şekil 31: WJ-MKH’lerde 24 saat 1 μ M KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1 μ M KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1mM H₂O₂ uygulamalarının kök hücrelerdeki CaMKII Delta izoformu gen ekspresyon değişimine etkisi (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, n=5, * Kontrol grubuna göre, # H₂O₂ grubuna göre, p<0,05).

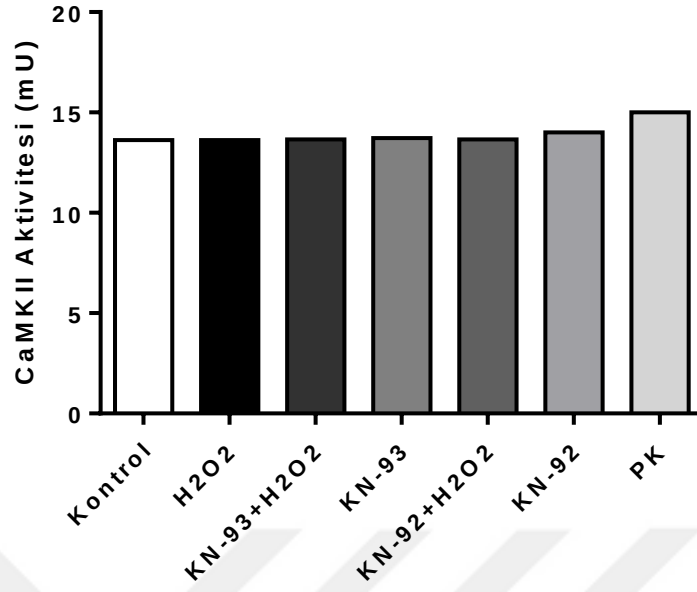
RT-qPZR ile elde edilmiş verilere göre 1mM H₂O₂ stres koşulunda CaMKII Delta izoformu gen ekspresyonu seviyesi kontrole göre yaklaşık 3 kat (p=0,0079) ve 24 saat 1 μ M KN-93 ön uygulamasının ardından 30 dakika 1 mM H₂O₂ stres koşulunun uygulandığı grupta ise kontrole göre 0,2 kat (p=0,0159) azalarak istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir. Diğer gruplarda ise CaMKII Gama izoformu gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişme göstermemiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Şekil 31).

4.5. CaMKII Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi



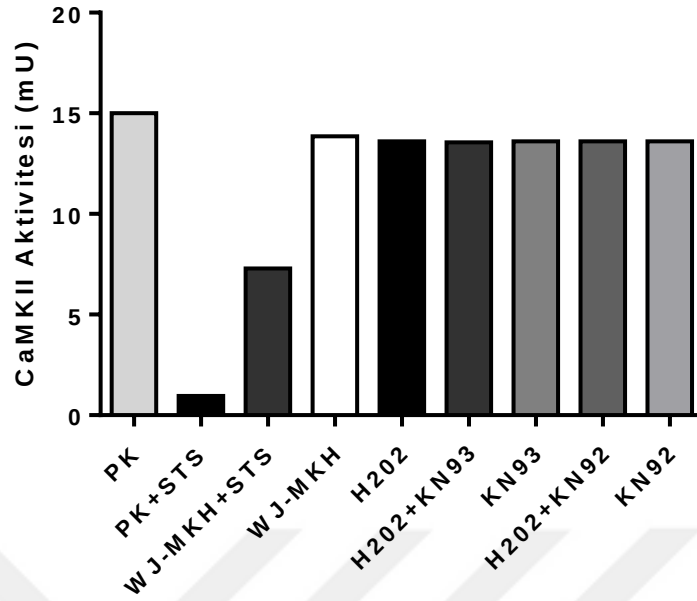
Şekil 32: 0 mU, 15 mU ve 30 mU CaMKII pozitif kontrol dozuna bağlı olarak CaMKII aktivite kiti kullanılarak hesaplanmış CaMKII aktivite düzeyleri (mU).

CaMKII pozitif kontrolü 0 mU, 15 mU ve 30 mU dozlarda kullanılarak Cyclex CaMKII aktivite belirleme kiti ile ölçüm yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre doza bağımlı olarak CaMKII aktivite düzeyi gösterilmiştir. Bu değerler doza paralel olmakla birlikte alınan absorbans değerleri ile hesaplamalar sonucu tam doz karşılıklarını sağlayamamıştır (Şekil 32).



Şekil 33: WJ-MKH’lerde 24 saat 1 μM KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1 μM KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1 mM H_2O_2 uygulamalarının kök hücrelerdeki CaMKII enzim aktivitesine etkisi (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, $p>0,05$).

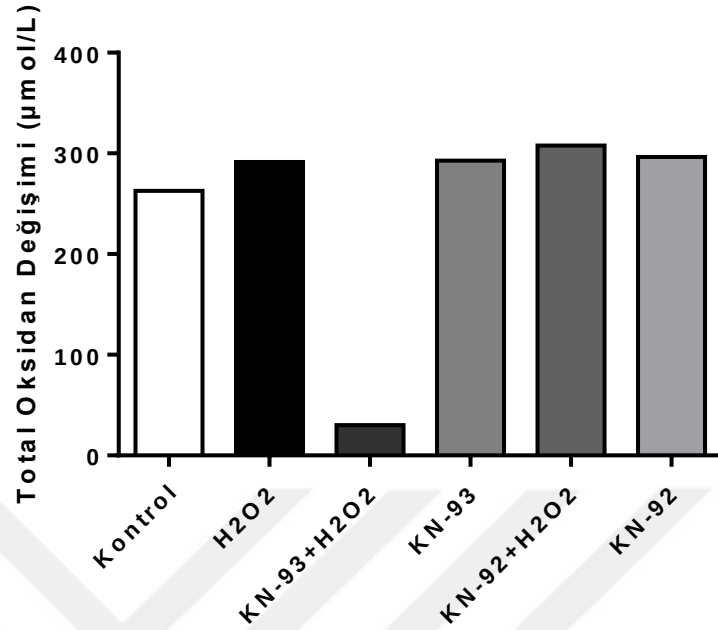
Cyclex CaMKII aktivite belirleme kiti ile elde edilmiş verilere göre WJ-MKH’lerde 24 saat 1 μM KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1 μM KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1 mM H_2O_2 uygulamalarının CaMKII enzimi aktivite düzeyi üzerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişme gözlemlenememiştir. 15 mU pozitif kontrol (PK) baz alınarak gruplar içerisindeki CaMKII mU değişimleri gösterilmiştir. Kontrol grubunda CaMKII aktivite düzeyi 13,61 mU olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Şekil 33).



Şekil 34: WJ-MKH’lerde 24 saat 1 μ M KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1 μ M KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1 mM H_2O_2 uygulamalarının ve aktivite testine başlamadan önce 1 μ M STS veya 1 μ M KN-93 CaMKII inhibitörü uygulamasının kök hücrelerdeki CaMKII enzim aktivitesine etkisi (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, $p>0,05$).

Cyclex CaMKII aktivite belirleme kiti kullanılarak elde edilen verilere göre WJ-MKH’lerde 24 saat 1 μ M KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1 μ M KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1mM H_2O_2 uygulamalarının ardından izole edilmiş protein örneklerine kit prosedürü uygulanarak dışarıdan 1 μ M staurosporin (STS) veya 1 μ M KN-93 CaMKII inhibitörü ilave edilmiş ve CaMKII enzimi aktivite düzeyleri belirlenmiştir. $n=3$ olduğundan CaMKII aktivite düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişme göstermemiştir. 15 mU pozitif kontrol (PK) baz alınarak gruplar içerisindeki CaMKII mU değişimleri gösterilmiştir. Kontrol (WJ-MKH) grubunda CaMKII aktivite düzeyi 13,85 mU olarak hesaplanırken PK+STS grubunda CaMKII aktivite düzeyi 0,95 mU ve kontrol grubuna STS eklendiğinde (WJ-MKH+STS) CaMKII aktivite düzeyi 7,28 mU olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Şekil 34).

4.6. Total Oksidan Durumunun Belirlenmesi



Şekil 35: WJ-MKH’lerde 24 saat 1 µM KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1 µM KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1 mM H₂O₂ uygulamalarının kök hücrelerdeki total antioksidan (H₂O₂) miktarına etkisi (WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, p>0,05).

Rel Assay Diagnostics Total Oksidan Durumu belirleme kiti kullanılarak elde edilen verilere göre WJ-MKH’lerde 24 saat 1 µM KN-93 CaMKII inhibitörü ve 1 µM KN-92 negatif inhibitör ön uygulaması ve 30 dakika 1 mM H₂O₂ uygulamalarının ardından izole edilmiş protein örneklerine kit prosedürü uygulanarak total antioksidan düzeyleri hesaplanmıştır. KN-93+H₂O₂ grubunda, kontrol grubunda 262,85 µmol/L H₂O₂ olan oksidan düzeyi 30,15 µmol/L düzeyine gerilemiştir. 1 mM H₂O₂ uygulanan grupta antioksidan düzeyi 291,55 µmol/L olarak hesaplanarak kontrol antioksidan seviyesine göre arttığı saptanmıştır. Ayrıca 1 µM KN-93 uygulanan grupta antioksidan düzeyi 292,75 µmol/L, KN-92+H₂O₂ grubunda 307,85 µmol/L ve sadece 1 µM KN-92 uygulanan grupta 296,45 µmol/L olarak hesaplanmıştır. n=3 olduğundan total antioksidan düzeyleri gruplar arasında istatistiksel düzeyde anlamlı olarak değişmemiştir. Sonuçlar ortalama±SEM olarak verilmiştir (Şekil 35).

5. TARTIŞMA

Kök hücre eldesi için uygulanan protokoller ve kök hücre kaynakları özellikle dejeneratif ve proliferatif hastalıkların tedavilerinde kullanılabilme potansiyelleri sebebiyle oldukça önemlidir. Günümüzde en çok bilinen ve tedavilerde kullanılan hücreler kemik iliği kök hücreleridir. Son yıllarda perinatal dokularda tespit edilen Wharton Jölesi denilen bölgedeki mezenkimal kök hücrelerin bilinen kök hücre özelliklerini göstermesinin yanı sıra doku reddine sebep olan proteinleri eksprese etmemeleri sebebi ile kemik iliği kök hücrelerine göre doku reddi açısından daha avantajlı oldukları ileri sürülmektedir [33].

Mezenkimal kök hücrelerin özellikleri, özellikle kendi kendilerini yenileme ve farklı hücre hatlarına farklılaşma yetenekleri günümüzde geniş bir şekilde tartışılmıştır. Perinatal dokulardan izole edilen MKH'lerin ise çoğu yetişkin MKH'lerinden daha yüksek farklılaşma kapasitesi gösterdiği ileri sürülmektedir. Musiał-Wysocka ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınladıkları çalışmalarında WJ den izole edilen mezenkimal kök hücreleri pluripotens belirteçlerinin ifadesi açısından incelemişler , WJ-MKH'lerin NANOG, OCT-4 ve SSEA-4 gibi bazı pluripotency belirteçleri ifade ettiğini, ancak indüklenabilir pluripotent kök hücrelerinin (IPS) ekspresyon seviyesine kıyasla anlamlı derecede düşük olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte hipoksik koşullar altında ekspresyon seviyesi yükseltebilmiştir. Yüksek proliferasyon potansiyelleri ve farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneklerine rağmen, WJ-MKH'ler, iPS hücrelerinin ana çekincesi olan in vivo tümör oluşturmazlar. Biyolojik özellikleri, yüksek plastisitesi, çoğalma kapasitesi ve izolasyon ve kültür kolaylığı nedeniyle, WJ-MKH'ler umut verici bir modern rejeneratif tıp aracı olarak görülmektedir [34]. Diğer taraftan günümüzde Wharton jölesinden kök hücre eldesi ile ilgili protokoller ve stres koşullarında hücre yanıtlarına dair bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu tez çalışması ile laboratuvar koşullarında Wharton Jölesi'nden mezenkimal kök hücre izolasyonu gerçekleştirildikten sonra elde edilen hücrelerin minimal kök hücre özelliklerine sahip oldukları gösterilerek, karakterizasyonları yapılmıştır. Elde edilen kök hücrelerdeki canlılık, proliferasyon, CaMKII enzim düzeyi ve CaMKII izoformlarının gen ekspresyon değişiklikleri H₂O₂

tarafından tetiklenen stres koşulu altında değerlendirilmiştir. CaMKII enzim inhibitörü KN-93 uygulaması sonrası kök hücre canlılık ve proliferasyon değişimleri belirlenmiştir.

Karakterizasyon deneyleri ile adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücrelere farklılaştırılan WJ-MKH'lerin kök hücrelere spesifik yüzey antijenlerinde önemli ölçüde azalma olduğu gösterilmiştir. Oluşturulan her deneyde aynı deney protokolleri uygulanıp farklı sonuçların elde edilebilmesinin farklı donörlerden elde edilmiş primer kök hücrelerin kullanılması olduğu düşünülmektedir. Bu sorun rejeneratif tıp uygulamalarında kısıtlayıcı faktörlerden en önemlisidir ve pek çok araştırmacı uygulanan kültür koşullarında primer kök hücrelerin farklı yanıtlar verdiğini saptamıştır [35]. Temelde bu soruna dayanılarak gelecekte oluşturulacak çalışmalarda kök hücre donörlerinin daha detaylı araştırılarak özelliklerinin standart bir şekilde değerlendirilmesi gereklidir.

Oksidatif stresin kök hücreler üzerinde oluşturduğu hücre canlılığı ve proliferasyon kaybı literatür taraması sonucunda elde edilen bilgiler ile paralel olarak, tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneylerin sonucunda da elde edilmiştir. Oksidatif stres ajanı olarak uygulanan H_2O_2 'nin hücre canlılığı ve hücre proliferasyon düzeyini kontrol grubuna oranla yaklaşık %40-50 oranında azalttığı gösterilmiştir.

KN-93 CaMKII inhibitörünün ve KN-92 negatif inhibitörün doz ve süre eğrisi yapılarak WJ-MKH'ler için en uygun doz ve süreye karar verilmiştir. KN-93 CaMKII inhibitörünün $5\mu M$ ve $10\mu M$ dozları hücre canlılığında azalmaya sebep olduğu için bu dozlar kullanılmamıştır. KN-93 CaMKII inhibitörü için $IC_{50}=0,37\mu M$ olduğundan ve $1\mu M$ kullanımı hücre canlılığı üzerinde negatif bir etki göstermediğinden $1\mu M$ KN-93 dozu tüm deneylerde çalışılmıştır. Ayrıca hem KN-93 CaMKII inhibitörü hem de KN-92 negatif inhibitör için $1\mu M$ dozu literatürde benzer çalışmalar için kullanılan dozdur ve bu doz literatüre göre 24 saat uygulanmıştır [36].

KN-92 CaMKII inhibitörünün H_2O_2 ile indüklenen stres koşullarında WJ-MKH'lerinin canlılık ve proliferasyon süreçlerini, CaMKII izoformları gen ekspresyon değişimlerini ve CaMKII enzim aktivitesini nasıl etkilediğini belirlemek için tez projesi kapsamında deneyler gerçekleştirildi. Elde edilen verilere göre KN-93 CaMKII

inhibitörünün H₂O₂ stres koşuluyla beraber uygulanmasının hem hücre canlılığını hem de hücre proliferasyon oranını sadece H₂O₂ stres koşulu uygulanan gruba göre ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığı çalışmalarımızla gösterildi. Bu sonuç CaMKII enziminin hücrede hücre canlılığı ve hücre proliferasyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu gösterir. Tez kapsamında temel dayanak aldığımız hipotez olan yaşayan hücre öğrenir ve öğrenen hücre yaşar hipotezini öğrenmede etkili bir enzim olan CaMKII enzimi aracılığı ile destekler.

Çalışılan CaMKII izoformlarından CaMKII Beta izoformu gen ekspresyonu WJ-MKH'lerde H₂O₂ stres koşulu uygulamasıyla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artıp bu artış hem KN-93 hem de H₂O₂ uygulanan grupta ise kontrol seviyelerine gerilemiştir. Dolayısıyla H₂O₂ stres koşulu uygulamasının hücrede CaMKII Beta izoformu gen ekspresyonunu arttırması bu izoformun hücre canlılık ve proliferasyon testlerinin sonuçlarıyla paralel olarak değerlendirildiğinde enzimin hücre canlılığı ve proliferasyonun sürdürülmesi ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. CaMKII Beta izoformundaki artış hem KN-92 negatif inhibitörünün hem de H₂O₂ stres koşulu uygulanan grupta da sadece H₂O₂ stres koşulu uygulanan grup ile paraleldir. Böylece KN-93 CaMKII inhibitörünün CaMKII Beta izoformu ekspresyonunu önemli ölçüde etkilediğini gösterildi. CaMKII Delta izoformunun ise sadece H₂O₂ stres koşulu uygulanan grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalışını saptandı. Ama KN-93 ve H₂O₂ uygulamalarının beraber yapıldığı grupta bu azalma kontrol seviyelerine doğru tekrar artış göstermiştir. Diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. CaMKII Alfa ve Gama izoformlarının gen ekspresyon değişimlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Bu durum mali sebeplerden ve cihaz yetersizliklerinden ötürü tekrar sayısının azlığı sebebiyle ilişkilendirilebilir. Deneylerin tekrar daha uygun sonuçlarda gerçekleştirilmesi ile ileride yapılacak çalışmalarda daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir.

WJ-MKH'lerde CaMKII enziminin aktivitesinin belirlenmesi için çalışmaya uygun bir CaMKII aktivite kiti ile sonuçlar fotometrik olarak 450nm'de ölçüm alınarak elde edildi. Bu işlem öncesinde elde edilen protein ekspresyon düzeyleri BCA kiti ile belirlendi. Aktivite ölçümü sonrasında elde edilen absorbans değerleri her örneğin

protein miktarları ile oranlanmak istendi, fakat oranlamanın yapılmasının ardından sonuçların anlamsız çıkmasından ötürü elde edilen sonuçlar protein miktarına göre oranlanmadan kontrol grubuna göre % şeklinde oranlanarak $\pm$ ortalama hata olarak verildi. Elde edilen verilere göre CaMKII enzim aktivitesi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değişim göstermedi. Bu durumu düzeltebilmek için yapılan hata giderme metodlarına rağmen aynı sonuçlar gözlemlendi. Bu sonuç kit içeriğinin doğru çalışmaması ile ilişkilendirilebilir. Fakat kit prosedürüne göre 1 μ M Staurosporin kullanılarak tüm kinazların inhibe edilmesi sonucu CaMKII enzim aktivitesinin de pozitif kontrole oranla kıyaslandığında önemli ölçüde azaldığı gösterildi. Elde edilen sonuçların istatistiksel düzeyde anlamlı olmamasının sebebi CaMKII aktivite kitinin kullanılan örnekler içeriğinde sadece saf CaMKII enzimi bulunmadığından örnek içerisinde bulunan diğer kinazlarla etkileşme göstermesi olarak düşünülebilir. Bu açıdan bakıldığında ve gen ekspresyon sonuçlarında en çok değişimin CaMKII Beta enzim izoformunda olduğu baz alınarak ileride gerçekleştirilecek çalışmalarda CaMKII Beta izoformu düzeylerine yoğunlaşılmasının avantajlı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca literatür taramamıza göre belirtilen kitin referansı fazla olmamakla birlikte kit kapsamında bulunan 96 kuyucuklu plakın Syntide-2 ile kaplı olması ve Syntide-2'nin CaMKII için tamamen spesifik olmaması deney kapsamında karşılaşılan sorunlarla ilişkilendirilebilir [37][38]. İleride yapılacak çalışmalarda uygun deney koşullarıyla birlikte CaMKII için tamamen spesifik yeni proteinlerin keşfedilmesiyle farklı koşullarda CaMKII aktivite değişimi tanımlanabilir.

WJ-MKH'lerde total oksidan durumunun belirlenmesi için hücre lizatlarından protein ekstraksiyonu yapılarak fotometrik kit ile sonuçlar elde edildi. Ulaşılan sonuçlara göre 1mM H₂O₂'nin total oksidan miktarını kontrol grubuna göre arttırdığı belirlendi. 1 μ M KN-93 CaMKII inhibitörü ön uygulamasının ardından 1mM H₂O₂ uygulanan grupta ise total oksidan miktarının önemli ölçüde azaldığı saptandı. Bu sonuca göre KN-93 CaMKII inhibitörünün hücre içerisinde oksidatif stres üzerinden hücre canlılığına etki etmediği düşünülmektedir. Hücre canlılık testlerinde KN-93 CaMKII inhibitörünün H₂O₂ ile birlikte uygulandığı grupta sadece H₂O₂ uygulanan gruba göre daha düşük belirlenen hücre canlılığının hücre içerisinde başka bir yolak üzerinden gerçekleştirildiği

düşünülmektedir. Ayrıca daha önce yapılan araştırmalarda H_2O_2 'in hücre içerisinde CaMKII aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir [39]. KN-93 inhibitörün CaMKII için spesifik bir inhibitör olduğu henüz gösterilmemiştir ve KN-93 otofosforile olan CaMKII enzimini inhibe edemediği bilinmektedir. Fakat pek çok çalışmada KN-93 CaMKII inhibitörü olarak kullanılabilmektedir [40]. KN-93 inhibitörün hücre içerisinde direkt olarak Ca^{2+}/CaM kompleksine bağlanarak CaMKII'yi inhibe edebileceği gösterilmiştir [41]. Bu durumda Ca^{2+}/CaM kompleksi hücre içerisinde KN-93 tarafından bağlanmış olsa da H_2O_2 tarafından CaMKII aktivitesinin gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir. Total oksidan miktarının gruplar arasındaki farklılığı ve canlılık testlerinde belirlenen sonuçların farklılığı bu kanıtlara dayandırılabilir ve hücre içerisinde başka yollar üzerinden etkileşim olduğu düşünülmektedir. İlerleyen çalışmalarda deneyler tekrarlanarak, CaMKII'nin tamamen inhibe edileceği koşullar gerçekleştirilip hücre içerisinde CaMKII'nin etkilediği farklı yollar çalışılabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile mezenkimal kök hücre sınıfına giren ve insan göbek kordonundan elde edilen WJ-MKH'lerin oksidatif stres koşulu altında, KN-93 inhibitör varlığında ya da KN-92 negatif inhibitör varlığında hücre canlılığı değişimi, hücre proliferasyonu değişimi, CaMKII izoformlarının gen ekspresyonu düzeyinde değişimi ve CaMKII aktivite değişimlerini belirlemek hedeflendi. Bunlar ek olarak WJ-MKH'lerin göbek kordonundan izolasyonu ve karakterize edilebilmesi için en uygun metodun laboratuvarımız koşullarında elde edilebilmesi amaçlandı.

Çalışmamız ile birlikte eksplant yöntemi kullanılarak Wharton jelinden MKH'ler izole edilip uygun deney düzenekleri kurularak hücrelerin proliferasyon düzeyleri belirlendi. Kök hücreleri karakterize edebilmek için MKH'lere özgü CD44, CD90 ve CD105 yüzey antijenleri gen ekspresyonları ve protein ekspresyonları değişimleri RT-qPCR, İF ve akış sitometrisi metodları kullanılarak belirlendi. MKH'lerin tanımlanmasında Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'ne göre minimal kritlerler olan adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaştırma süreçleri uygun bir kit kullanılarak tez kapsamında gerçekleştirildi ve sonuçlar hem immünofloresan hem de histokimyasal olarak gösterildi.

WJ-MKH'lerin hücre canlılığının ve proliferasyon oranlarının H_2O_2 stres koşulu varlığında ve stres koşulu ile birlikte KN-92 negatif inhibitör varlığına istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalması belirlendi. Ayrıca H_2O_2 stres koşulu ile birlikte KN-93 CaMKII inhibitörü varlığında hücre canlılığı ve proliferasyon oranları, H_2O_2 stres koşulu ve stres koşulu ile birlikte KN-92 negatif inhibitör varlığındaki duruma göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldı.

CaMKII izoformlarının gen ekspresyon düzeyleri RT-qPCR yöntemi ile belirlendi. Elde edilen verilere göre CaMKII Beta izoformunun gen ekspresyon düzeylerinin H_2O_2 stres koşulu ve stres koşulu ile birlikte KN-92 negatif inhibitör varlığında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışı belirlendi. Ayrıca KN-93 CaMKII inhibitörü varlığında bu artışın geri döndürülüp istatistiksel olarak anlamlı derecede kontrol seviyesine azalması gözlemlendi. CaMKII Delta izoformunun gen ekspresyonu değişimlerinde ise H_2O_2 stres koşulu uygulamasının gen ekspresyon seviyesini istatistiksel olarak anlamlı derecede

azalttığı saptandı. KN-93 CaMKII inhibitörü ve H₂O₂ stres koşulu varlığında ise bu azalma sadece H₂O₂ stres koşuluna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi. Diğer CaMKII izoformları olan Alfa ve Gama izoformları gen ekspresyonlarının ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği gözlemlendi.

CaMKII enzimi aktivite düzey değişimleri Cyclex CaMKII aktivite kiti ile belirlendi. Aktivite kiti uygulamasının ardından elde edilen absorbance değerleri BCA kiti ile elde edilmiş protein düzeylerine oranlanmadan sonuçlar değerlendirildi. Yapılan hata düzeltme yöntemlerine rağmen kesin bir sonuç elde edilemedi. İleride gerçekleştirilecek çalışmalarda CaMKII aktivitesi daha uygun bir kit ve yöntemle uygun deney koşullarında değerlendirilebilir.

Bu tez çalışması ile gerçekleştirdiğimiz protokollerin ve elde edilen sonuçların rejeneratif tıp uygulamalarının kapsandığı projeler için bir temel sağlayabileceği düşünülmektedir. Yaptığımız araştırmalar ile elde edilen sonuçların oksidatif stres koşullarında ve CaMKII inhibisyonu varlığında kök hücre canlılığı, proliferasyonu üzerindeki etkileri belirlenmeye çalışılarak CaMKII enziminin hücre canlılığındaki ve proliferasyonundaki rolünün kök hücre tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamakla beraber bu enzimin rolünün farklı hücre türlerinde ve hayvan çalışmalarında da araştırılmasının öğrenme ve hafıza ile ilişkili hastalıkların tedavisinde gelişme sağlayacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak literatür taramamıza göre CaMKII'nin mezenkimal kök hücre canlılığı ve H₂O₂ ile indüklenen stres koşullarındaki değişimleri ilk kez bu tez çalışması ile gösterildi. Çalışmamız ile elde edilen verilerin MKH'lerin stres koşullarına verdiği yanıt mekanizmasının anlaşılmasına, hedefe yönelik kök hücre tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için temel basamak sağlayacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- [1] G. BURNETT and E. P. KENNEDY, "The enzymatic phosphorylation of proteins.," *J. Biol. Chem.*, vol. 211, no. 2, pp. 969–80, 1954.
- [2] M. T. Swulius and M. N. Waxham, "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases," *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008.
- [3] J. E. Lisman, "A mechanism for memory storage insensitive to molecular turnover: A bistable autophosphorylating kinase (long-term memory/nervous system/protein phosphorylation)," 1985.
- [4] S. G. Miller and M. B. Kennedy, "Regulation of brain Type II Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: A Ca²⁺-triggered molecular switch," *Cell*, 1986.
- [5] H. Schulman and P. Greengard, "Stimulation of brain membrane protein phosphorylation by calcium and an endogenous heat-stable protein," *Nature*, 1978.
- [6] N. E. Eröndü and M. B. Kennedy, "Regional distribution of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain.," *J. Neurosci.*, 1985.
- [7] A. Hudmon and H. Schulman, "Neuronal Ca²⁺ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II: The Role of Structure and Autoregulation in Cellular Function," *Annu. Rev. Biochem.*, 2002.
- [8] G. A. Wayman, Y. S. Lee, H. Tokumitsu, A. Silva, and T. R. Soderling, "Calmodulin-Kinases: Modulators of Neuronal Development and Plasticity," *Neuron*. 2008.
- [9] L. C. Griffith, "Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II: An Unforgettable Kinase," *J. Neurosci.*, 2004.
- [10] H. Zhuang, R. Zhang, S. Zhang, Q. Shu, D. Zhang, and G. Xu, "Altered expression of microRNAs in the neuronal differentiation of human Wharton's Jelly mesenchymal stem cells," *Neurosci. Lett.*, 2015.

- [11] L. Y., A. M.J., W. A., L. J., and D. A.T., "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity regulates the proliferative potential of growth plate chondrocytes," *Development*, 2011.
- [12] K. Aji *et al.*, "Differentiation of Human Adipose Derived Stem Cells into Smooth Muscle Cells Is Modulated by CaMKII γ ," *Stem Cells Int.*, 2016.
- [13] A. J. BECKER, E. A. McCULLOCH, and J. E. TILL, "Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.," *Nature*, 1963.
- [14] M. F. Pittenger *et al.*, "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells and Daniel R . Marshak Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/2899157> REFERENCES Linked references are available on JSTOR for," *Science (80-.)*, vol. 284, no. 5411, pp. 143–147, 1999.
- [15] A. I. Caplan, "Bone development and repair," *BioEssays*. 1987.
- [16] A. I. Caplan, "The extracellular matrix is instructive," *BioEssays*, 1986.
- [17] A. I. Caplan, "Mesenchymal stem cells," *J. Orthop. Res.*, 1991.
- [18] D. L. Clarke *et al.*, "Generalized potential of adult neural stem cells," *Science (80-.)*, 2000.
- [19] L. A. Fortier, "Stem cells: Classifications, controversies, and clinical applications," *Veterinary Surgery*. 2005.
- [20] I. L. Weissman, "Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution," *Cell*. 2000.
- [21] A. Nussler and S. O. Sajadian, "Adult Stem Cells," *Stem Cell Nanoeng.*, vol. 102, no. February 2003, pp. 3–23, 2015.
- [22] J. A. Thomson, "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts," *Science (80-.)*, 1998.

- [23] A. Uccelli, L. Moretta, and V. Pistoia, "Mesenchymal stem cells in health and disease," *Nature Reviews Immunology*. 2008.
- [24] E. M. Horwitz *et al.*, "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement," *Cytotherapy*, 2005.
- [25] M. Dominici *et al.*, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.," *Cytotherapy*, 2006.
- [26] F. A. Meyer, Z. Laver-Rudich, and R. Tanenbaum, "Evidence for a mechanical coupling of glycoprotein microfibrils with collagen fibrils in Wharton's jelly," *BBA - Gen. Subj.*, 1983.
- [27] T. Sakamoto, H. Ono, and Y. Saito, "[Electron microscopic histochemical studies on the localization of hyaluronic acid in Wharton's jelly of the human umbilical cord].," *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 1996.
- [28] H.-S. Wang *et al.*, "Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord.," *Stem Cells*, 2004.
- [29] H. L. De Bondt, J. Rosenblatt, J. Jancarik, H. D. Jones, D. O. Morgant, and S. H. Kim, "Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2," *Nature*, 1993.
- [30] F. Zhang, A. Strand, D. Robbins, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith, "Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution," *Nature*, 1994.
- [31] O. S. Rosenberg, S. Deindl, R. J. Sung, A. C. Nairn, and J. Kuriyan, "Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme," *Cell*, 2005.
- [32] T. Hunter and H. Schulman, "CaMKII structure - An elegant design," *Cell*. 2005.
- [33] D. W. Kim, M. Staples, K. Shinozuka, P. Pantcheva, S. D. Kang, and C. V. Borlongan, "Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: Phenotypic characterization and Optimizing their therapeutic potential for clinical applications," *International Journal of Molecular Sciences*. 2013.

- [34] A. Musiał-Wysocka, M. Kot, M. Sułkowski, B. Badyra, and M. Majka, "Molecular and Functional Verification of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) Pluripotency," *Int. J. Mol. Sci.*, 2019.
- [35] R. Hass, C. Kasper, S. Böhm, and R. Jacobs, "Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC," *Cell Communication and Signaling*. 2011.
- [36] P. An *et al.*, "KN-93, a specific inhibitor of CaMKII inhibits human hepatic stellate cell proliferation in vitro," *World J. Gastroenterol.*, 2007.
- [37] Q. Lu, V. A. Harris, X. Sun, Y. Hou, and S. M. Black, "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase ii contributes to hypoxic ischemic cell death in neonatal hippocampal slice cultures," *PLoS One*, 2013.
- [38] Y. Hashimoto and T. R. Soderling, "Calcium · calmodulin-dependent protein kinase II and calcium · phospholipid-dependent protein kinase activities in rat tissues assayed with a synthetic peptide," *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987.
- [39] J. R. Burgoyne, S. Oka, N. Ale-Agha, and P. Eaton, "Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling by Protein Kinases in the Cardiovascular System," *Antioxid. Redox Signal.*, 2012.
- [40] P. Pellicena and H. Schulman, "CaMKII inhibitors: From research tools to therapeutic agents," *Frontiers in Pharmacology*. 2014.
- [41] M. H. Wong *et al.*, "The KN-93 Molecule Inhibits Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) Activity by Binding to Ca²⁺ /CaM," *J. Mol. Biol.*, 2019.

8. EKLER

8.1. Ek-1 Gönüllü Bilgilendirme Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu form **“Mezenkimal Kök Hücrelerin Canlılığı ve Stres Koşulları Altındaki Proliferasyonunda Kalsiyum/Kalmodulin-Bağımlı Protein Kinaz 2 (CaMKII) Enzim Değişiminin Belirlenmesi”** isimli çalışmamıza katılacak gönüllüler için düzenlenmiştir.

İşlevsel olarak farklılaşmamış, vücudun herhangi bir organ ya da dokusunda özel bir görev yapabilmek için tam olarak olgunlaşmamış karmaşık bir yapısı olan öncül hücrelere kök hücre denir. Aynı zamanda kök hücreler bedenin başka hücrelerine dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Bu öncül hücreler, kemik iliğinden elde edilebildiği gibi, göbek kordonundan da elde edilebilir. Bu çalışmadaki amaç Wharton jölesi olarak isimlendirilen ve göbek kordonunu oluşturan dokudan kök hücre elde etmek ve elde edilen bu mezenkimal kök hücrelerin canlılık ve hücre proliferasyon oranlarını ve hipoksi benzeri stres koşullarında CaMKII enzim düzey ve aktivite değişimlerini incelemektir.

Bu çalışmadan elde edilecek özgün bilgiler, ileride, vücuttaki hasarlı bir dokunun yenilenmesi ve hücre canlılığının devam ettirilmesi için tedavi amaçlı kullanılabilecek hücrelerin eldesinde kullanılabilecektir.

Çalışmaya normal gebelik seyri olan, sezaryen ile doğum yapan yaklaşık 20 gebe dahil edilecektir. Sezaryen ile doğumun öncesinde, izin vermeniz durumunda doğumun ardından atılan göbek kordonu alınarak içerisindeki doku kök hücre analizleri için kullanılacaktır. Sonuçlar hiçbir şekilde sizin ve bebeğinizin tedavisini, gebeliğin seyrini ve bakımını etkilemeyecektir. Gönüllülerin uygulama sırasında karşılaşılabileceği rahatsızlıklar ve riskler yoktur.

Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir.

Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Her iki durumda da tedavinin olağan süreci devam edecektir. Araştırma giderleri, hasta veya sosyal güvenlik kurumuna hiçbir şekilde yüklenmeyecektir.

Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra, ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır. Talebiniz halinde analiz sonuçlarınız sizinle paylaşılabilir.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın;

Adı-Soyadı:

Tarih:

İmza:

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin;

Adı-Soyadı:

Tarih:

İmza:

Araştırma Yapan Araştırmacının;

Adı-Soyadı:

Tel:

Tarih:

İmza:

8.2. Ek-2 Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr.Pınar AKAN

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	4061-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Mezenkimal Kök Hücre Proliferasyonu ve Farklılaşmasında Kalsiyum/Kalmodulin - Bağımlı Protein Kinaz 2 (CaMKII) Enziminin Değişiminin Belirlenmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Pınar AKAN Tıbbi Biyokimya A.D
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018/14-42	Tarih:07.06.2018
	Prof.Dr.Pınar AKAN 'ın sorumlusu olduğu "Mezenkimal Kök Hücre Proliferasyonu ve Farklaşmasında Kalsiyum/Kalmodulin - Bağımlı Protein Kinaz 2 (CaMKII) Enziminin Değişiminin Belirlenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Ali Rıza ŞİŞMAN (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Şişman</i>
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Gül Ergör</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr. Mehmet Refik MAS	Geriatri	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Mas</i>
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Ayşe</i>
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Müge</i>
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Abacı</i>
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Arıcı</i>
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Bektaş</i>
Doç.Dr.Yasemin SOYSAL	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Yasemin</i>
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Bilgin</i>
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Özkul</i>

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr.Pınar AKAN

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
ÇAĞIK ADRES	GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
TELEFON	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
FAKS	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
E-POSTA	0 232 412 22 43
	etikkurul@deu.edu.tr

BASVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	4061-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Mezenkimal Kök Hücre Proliferasyonu ve Farklılaşmasında Kalsiyum/Kalmodulin - Bağımlı Protein Kinaz 2 (CaMKII) Enziminin Değişiminin Belirlenmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Pınar AKAN Tıbbi Biyokimya A.D
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

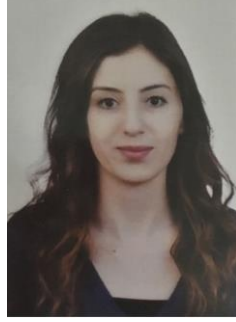
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	Araştırmacı Dilekçesi	28.03.2019		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2019/08-35	Tarih:03.04.2019
	Prof.Dr.Pınar AKAN 'ın sorumlusu olduğu "Mezenkimal Kök Hücre Proliferasyonu ve Farklılaşmasında Kalsiyum/Kalmodulin - Bağımlı Protein Kinaz 2 (CaMKII) Enziminin Değişiminin Belirlenmesi" isimli klinik araştırmaya ait 28.03.2019 tarihli araştırmacı dilekçesine ilişkin; -Çalışma başlığının "Mezenkimal Kök Hücrelerin Canlılığı ve Stres Koşulları Altındaki Proliferasyonunda Kalsiyum/Kalmodulin-Bağımlı Protein Kinaz 2 (CaMKII) Enzim değişiminin Belirlenmesi" olarak değiştirilmesi -Araştırma adına bağlı olarak araştırma özetinde ve araştırmanın hipotezinde değişiklikler, -Araştırma adına bağlı olarak araştırma protokolünden farklılaşma prosedürünün çıkarılması, - Araştırma adına bağlı olarak Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunun düzeltilmesi, -Yardımcı araştırmacılardan Zeynep Yasemin Öntür'ün projeden ayrılması ile ilgili belgeler incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	
	ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Can SEVİNÇ (Başkan)	Göğüs Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sadık Kıvanç METİN (Başkan Yardımcısı)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Arzu GENÇ	Nörolojik Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL	Tıbbi Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Pınar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Serkan YENER	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoglu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGON	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Av.Esra FIRTINA	Avukat	DEU Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

8.3. Ek-3 Özgeçmiş



TUĞBA ŞAN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası: 13786797514

Doğum Tarihi: 19/01/1993

İletişim Adresi: Onur Mahallesi, Çiğdem Sokak, No: 11 Özge Apartmanı,
Kat:4, Daire:4 Balçova/İzmir

Telefon: (537) 3757183

E-posta: ttugbasan@gmail.com
san.tugba@ogr.deu.edu.tr

Web Adresi

Eğitim Bilgileri

01 Eylül 2016 - Şu Anda (2 yıl 8 ay)

Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL

ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ,

TEMEL SİNİRBİLİMLER (YL) (TEZLİ)

Diploma Numarası -

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 4.0 / 4.0

06 Eylül 2011 – 13 Temmuz 2016 (4 yıl 10 ay)

Lisans, Anadal/Normal Öğretim, İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ, TÜRKİYE

FEN FAKÜLTESİ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ

Diploma Numarası: 3218

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.38 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bildiriler

O. TEZCAN, P. AKAN, T. ŞAN, M. E. GÜNEŞ & K. BAYSAL,
The Effects of Antioxidant Molecules on the Oxidative Stress
Induced by Hydrogen Peroxide in the Mesenchymal Stem
Cells and Endothelial Precursor Cells, Poster Sunumu,
The 44th FEBS Congress 2019, 06 Temmuz 2019 - 11

Temmuz 2019.

R. U. BORA, P. AKAN, Ö. TEZCAN, T. ŞAN & K. BAYSAL,
Conditioned Medium From Wharton's Jelly Mesenchymal
Stem Cells Increased The Viability SHSY-5Y Cells, Poster
Sunumu, 11th FENS Forum Of Neuroscience, 07 Temmuz
2018 - 11 Temmuz 2018.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri 215S801, Bipolar Bozuklukta Eksozomal miRNA Değişimlerinin
İncelenmesi, 1001 - Araştırma, Burslu, BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA
PROJELERİNİ DESTEKLEME PROGRAMI, ARDEB, 13.03.2017 – 15.12.2017.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0