

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROGLİAL FARKLILAŞMA SÜRECİNDE
AKT -AMP KİNAZ VE MTOR ARACILI
ASETİL KO A VE İLİŞKİLİ METABOLİT
DEĞİŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ**

RAMAZAN UĞUR BORA

TEMEL SİNİRBİLİMLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2015970063

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖROGLİAL FARKLILAŞMA SÜRECİNDE
AKT -AMP KİNAZ VE MTOR ARACILI
ASETİL KO A VE İLİŞKİLİ METABOLİT
DEĞİŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ**

TEMEL SİNİRBİLİMLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

RAMAZAN UĞUR BORA

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Pınar Akan

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube
Müdürlüğü tarafından 2018.KB.SAG.070 kodu ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2015970063

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler Anabilim Dalı,
Yüksek Lisans programı öğrencisi Ramazan Uğur Bora '**NÖROGLİAL
FARKLILAŞMA SÜRECİNDE AKT-AMP KİNAZ VE MTOR ARACILI
ASETİL KOA VE İLİŞKİLİ METABOLİT DEĞİŞİMLERİNİN
BELİRLENMESİ**' konulu Yüksek Lisans tezini 28/01/2019 tarihinde başarılı
olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN

Prof. Dr. Pınar AKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sinirbilimler Anabilim Dalı

ÜYE

Prof. Dr. Şermin GENÇ

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sinirbilimler Anabilim Dalı

ÜYE

Prof. Dr. Aslıhan Büyüköztürk KARUL

Adnan Menderes Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÜYE

Doç. Dr. Yusuf KURTULMUŞ

Adnan Menderes Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÜYE

Doç. Dr. Özlem Gürsoy ÇALAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR	vi
TEŞEKKÜR	vii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	4
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Kök Hücre	7
2.1.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....	7
2.1.2. Mezenkimal Kök Hücreler	8
2.1.3. Wharton Jölesi Mezenkimal Kök Hücreleri.....	9
2.1.4. Kök Hücre Enerji Metabolizması.....	10
2.1.5. Kök hücrelerde enerji sensörleri ve rolleri	12
2.1.6. Nöral Farklılaşma	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. Araştırmanın Tipi	14
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	14
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	14
3.4. Araştırmanın Çalışma Materyali	14
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	14
3.6. Veri Toplama Araçları	14
3.6.1. Göbek Kordonunun Temini	16

3.6.2.	Kök Hücrelerin İzolasyonu	16
3.6.3.	Kök Hücrelerin Kültürü	17
3.6.4.	Canlılık Testi.....	18
3.6.5.	Karakterizasyon Deneyleri.....	18
3.6.6.	Kök Hücrelerin Nöronal Farklılaşması.....	20
3.6.7.	Protein Tayini.....	21
3.6.8.	Nöral Farklılaşmış Hücrelerde Laktat Üretimi	22
3.6.9.	Asetil KoA ve İlişkili Metabolit Değişimlerinin Belirlenmesi	23
3.7.	Araştırma Planı ve Takvimi	28
3.8.	Verilerin Değerlendirilmesi.....	28
3.9.	Araştırmanın Sınırlılıkları	28
3.10.	Etik Kurul Onayı	29
4.	BULGULAR	30
4.1.	WJ-MKH'lerin İzolasyon Süreleri ve Proliferasyon Hızları	30
4.1.1.	Eksplant Yöntemi İle Elde Edilen WJ-MKH'lerin Proliferasyon Hızları	31
4.2.	WJ-MKH Karakterizasyonu	32
4.2.1.	Akış Sitometri Sonuçları.....	32
4.2.2.	WJ-MKH'lerinin İmmünfloresans Mikroskop ile Değerlendirilmesi	35
4.2.3.	WJ-MKH'lerinin PZR ile Değerlendirilmesi.....	35
4.3.	Nöronal Farklılaşma Deney Sonuçları.....	40
4.4.	Nöral Farklılaşmanın İmmünfloresans Yöntem İle Gösterilmesi	40
	40	
4.5.	Nöral Farklılaşan Hücrelerde Protein Tayini.....	42
4.6.	Nöral Farklılaşmış Hücrelerde Laktat Üretimi	43
4.7.	Canlılık Testi.....	43
4.8.	Farklılaşma Sürecinde Metabolit Değişimleri	44
4.8.1.	Asetil-KoA Düzeyi.....	44
4.7.2.	Sitrat Düzeyi.....	47

4.7.3.	Piruvat Düzeyi.....	50
5.	TARTIŞMA.....	56
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
7.	KAYNAKLAR	65
8.	EKLER	74
8.1.	EK-1 GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU.....	74
8.2.	EK-2 ETİK KURUL ONAYI.....	76
8.3.	EK-3 ÖZGEÇMİŞ	77



TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Kullanılan Cihazlar	14
Tablo 2: Kullanılan Kimyasallar	15
Tablo 3: Total protein miktarları. Normal koşullarda farklılaşma (A), Akt inhibisyonu sonrası farklılaşma (B).	42
Tablo 4: WJ-MKH lerin nöronal farklılaşma sürecindeki (a) ve Akt inhibisyonu varlığındaki (b) Asetil KoA değerleri (ort± SEM).....	45
Tablo 5: WJ-MKH lerin nöronal farklılaşma sürecindeki (a) ve Akt inhibisyonu varlığındaki (b) Sitrat değerleri (ort± SEM) olarak verilmiştir.	48
Tablo 6: WJ-MKH lerin nöronal farklılaşma sürecindeki (a) ve Akt inhibisyonu varlığındaki (b) Sitrat değerleri (ort± SEM) olarak verilmiştir.	50

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Göbek kordonu ve Wharton jölesi	9
Şekil 2: Glukoz metabolizması ve oluşan ürünlerin olası akıbetlerinin şematik gösterimi.....	11
Şekil 3: Akt-mTOR-AMPK sinyal yolağı [24].	12
Şekil 4: Protein tayini standart eğrisi.....	22
Şekil 5: Kök hücrelerin elde edilmesi. (A) Hücre kültürü kabına tutudurulan eksplantlar. (B) Eksplanttan (ok ile işaretli) dışarı göç eden hücreler.....	31
Şekil 6: Eksplant ve enzimatik yöntem ile elde edilen WJMKH lerin "doubling time" ları Sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SD}$ olarak verilmiştir. Eksplant ve enzimatik yöntemden elde edilen hücrelerin iki katına çıkma süreleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Genel olarak enzimatik yöntem ile elde edilen hücrelerin 25 cm ² kültür kaplarında konfluent olma süreleri daha yüksek olmakla birlikte, 1-4. Pasaja kadar aralarında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$; $n = 17$).....	31
Şekil 7: Eksplant yöntemi ile elde edilen WJMKH'lerinin ters faz ışık mikroskopik görüntüsü (A) 20x büyütme. (B) 10x büyütme	32
Şekil 8: Örnek bir flow sitometri verisi. Farklılaşmamış bir WJMKH örneğinde hücrelerde CD 90; %86, CD105; %56, CD73; %91 ve CD44; %92 oranında eksprese edilmektedir.....	33
Şekil 9: Eksplant yöntemiyle izole edilen ve aynı kültür koşullarında idame ettirilen WJ-MKH'lerinin CD 44, CD 73, CD 90 ve CD 105 yüzey antijenlerinin 4. pasaja kadar değişimleri (%). Sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SD}$ olarak ifade edilmiştir ($n = 3$).....	34
Şekil 10: A - CD90 işaretli kök hücreler. B. CD44 işaretli kök hücreler. (20X, pasaj 2, A deneyinde FITC işaretli, B deneyinde; Fikoeritrin işaretli antikorlar kullanılmıştır)	35
Şekil 12: Çeşitli cDNA örnekleri ile üç housekeeping gen; (GAPDH), 14-3-3 protein zeta/delta (YWHAZ) ve Hipoksantin phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) ile yapılan Real Time PZR deneyi.	36
Şekil 13: Çeşitli cDNA örnekleri ile üç housekeeping gen; (GAPDH), 14-3-3 protein zeta/delta (YWHAZ) ve Hipoksantin phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) ile yapılan Real Time PZR deneyi. melting curve analizi.....	36
Şekil 14: Çeşitli cDNA örnekleri ile üç housekeeping gen; (GAPDH), 14-3-3 protein zeta/delta (YWHAZ) ve Hipoksantin phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) ile yapılan Real Time PZR deneyi. Her ürünün kendine özgü pikinin çıktığı görülmektedir.	37

Şekil 15: Kök hücrelerde eksprese olan CD 90 ve CD 105, ve farklılaşmış hücrelerde eksprese olması beklenen vWF genlerinin ekspresyon çalışmaları görülmektedir. Üstte melting curve analizi ve altta her ürünün kendine özgü pikinin çıktığı görülmektedir.	38
Şekil 16: CD44, CD90, CD105 Primerleri ile gerçekleştirilen Realtime PCR sonucu	39
Şekil 17: Forskolin uygulaması sonrası hücrelerin faz kontrast ışık mikroskop görüntüleri (A) Kontrol; (B) 3.Gün; (C ve D) 14. Gün (20X)	40
Şekil 18: Farklılaşmış hücrelerin nöral bir markır olan β 3-Tubulin kullanılarak alınmış immünfloresans görüntüsü. (A) 10x Büyütme. (B) 40x Büyütme	41
Şekil 19: Farklılaşma sürecinde toplam protein miktarlarının değişimi.	42
Şekil 20: Nöronal indüksiyon sonrası WJMKH 'lerin laktat düzey değişimleri. Sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir. (* $p < 0.05$)	43
Şekil 21: Akt inhibitörünün hücre canlılığına etkisi.	44
Şekil 22: Nöronal farklılaşma sürecinde Asetil KoA düzeyleri	45
Şekil 23: Akt inhibitörü uygulaması ile birlikte nöronal farklılaşma sürecinde Asetil KoA değişimi.	46
Şekil 24: Normal şartlarda ve Akt inhibisyonu sonrasında nöronal farklılaşma sürecinde Asetil KoA değişimi.	47
Şekil 25: Nöronal farklılaşma sürecinde sitrat düzeyi değişimi.	48
Şekil 26: Akt inhibitörü uygulaması ile birlikte nöronal farklılaşma sürecinde Sitrat değişimi	49
Şekil 27: Normal şartlarda ve Akt inhibisyonu sonrasında nöronal farklılaşma sonucu Sitrat değişimi. .	49
Şekil 28: Nöronal farklılaşma sürecinde Piruvat düzeyi değişimi.	50
Şekil 29: Akt inhibitörü uygulaması ile birlikte nöronal farklılaşma sürecinde Piruvat değişimi.....	51
Şekil 30: Normal şartlarda ve Akt inhibisyonu sonrasında nöronal farklılaşma sürecinde Sitrat değişimi.	52
Şekil 31: Nöronal farklılaşma sonrası hücresel metabolit değişimleri	52
Şekil 32: Akt baskılanmasının nöronal farklılaşma sonunda hücresel metabolit düzeylerine etkisi.....	53
Şekil 33: Akt baskılanmasının WJ-MKH'lerinde Asetil KoA ve Sitrat düzeylerine etkisi	54
Şekil 34: Akt baskılanmasının WJ-MKH'lerinde piruvat düzeyine etkisi	55

KISALTMALAR

ADP: Adenozin Difosfat

AMP: Adenozin Monofosfat

ATP: Adenozin Trifosfat

Akt: Serin Treonin Kinaz (protein kinaz B)

cDNA: Komplementer DNA

CD: Farklılaşma Yüzey Antijen Kümeleri

EE-MKH: Ekstra Embriyonik Mezenkimal Kök Hücre

EGF: Epidermal büyüme faktörü

EKH: Embriyonik kök hücre

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

FBS: Fötal Sığır Serum

GAPDH: Gliseraldehit 3- fosfat dehidrogenaz

HMG CoA redüktaz: Hidroksimetil Gluteril KoA redüktaz

GKK-MKH: Göbek Kordonu kanı mezenkimal kök hücresi

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

MKH: Wharton Jölesi Mezenkimal Kök Hücresi

PBS: Fosfat tamponlu fizyolojik solüsyon

RT-PCR: Kantitatif PCR (Real-Time PCR)

PFKp : Fosfofrukto kinaz

PI3K: Fosfotidil inozitol 3 kinaz

mTOR: memeli rapamisin hedefi

PDH: Piruvat Dehidrogenaz

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca öneri ve yardımlarını hiç esirgemeyen, bilimsel desteğinin yanı sıra manevi olarak desteğini her zaman hissettiğim danışman hocam Sayın Prof. Dr. Pınar AKAN'a,

Tecrübelerini benimle paylaşan, yol gösteren ve desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Murat ÖRMEN ve Sayın Doç. Dr. Özlem Gürsoy ÇALAN'a,

Bizi aydınlatan, iyi bir eğitim almamız için ellerinden geleni yapan değerli Sinirbilimler Anabilim Dalı öğretim üyelerimize,

Göbek kordonların temininde yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Deniz Öztekin'e ve Sayın Uzm. Dr. Mehmet Emin GÜNEŞ'e

Çalışmamıza bilimsel olarak destek olan Sayın Prof. Dr. Kemal BAYSAL'a

Çalışmalarımız boyunca desteklerini sunan laboratuvar ekibimizin mevcut ve geçmiş üyelerine,

Her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen Burcu AÇIKGÖZ'e ve adlarını tek tek sayamadığım tüm dostlarıma,

Hayatım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan annem Melek BORA, babam Hasan BORA ve haylaz kardeşim Ufuk BORA 'ya başta olmak üzere aileme,

Bu araştırmaya destek sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Ramazan Uğur BORA

NÖROGLİAL FARKLILAŞMA SÜRECİNDE AKT -AMP KİNAZ VE MTOR ARACILI ASETİL KO A VE İLİŞKİLİ METABOLİT DEĞİŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ

Ramazan Uğur Bora, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilimler
Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

Rug.bora@gmail.com

ÖZET

Kök hücreler diferansiye hücrelerden fizyolojileri ve enerji kaynağı olarak kullandıkları metabolik yollar bakımından farklılık göstermektedirler. Kök hücrelerdeki bu "metabolik plastisitenin" kök hücre fizyolojisinde etkisi henüz tam olarak açıklanamamıştır. Kök hücrelerde, ana ATP üretim yolağı olarak glikoliz, ortamdaki O₂ düzeyinden bağımsız olarak hızlıdır, pirüvatın mitokondri içinde kullanılması azalmıştır. Nöronal farklılaşma sırasında mitokondrial biyogenezin inhibisyonu nöronal farklılaşmayı bloke etmektedir. Nöroglial farklılaşma esnasında asetil KoA ve ilişkili metabolizma değişiklikleri henüz net olarak tanımlanmamıştır. Bu çalışmada nöronal farklılaşmanın karbonhidrat, kolesterol ve yağ asidi metabolizmasının karşılıklı düzenlenmesinde kilit rol oynayabilecek asetil KoA ve ilişkili metabolit değişimleri üzerine etkisini belirlemek amaçlanmıştır.

İnsan göbek kordonu wharton jölesinden mezenkimal kök hücreler (WJ-MKH) eksplant yöntemi ile izole edildi. Kök hücrelere 21 gün boyunca forskolin, N2B27 supplement ve büyüme faktörleri içeren nöronal farklılaşma ortamı uygulandı. Hücre karakterleri ışık mikroskopi, immunohistokimya, akış sitometri ve Q-PCR yöntemleri ile değerlendirildi. Kök hücrelerin nöronal farklılaşma sürecindeki laktat, pirüvat ve sitrat düzey değişimleri kolorimetrik-florometrik olarak belirlendi. WJ-MKH'lerin nöronal farklılaşma sürecinde ortam laktat, düzeyinin belirgin düştüğü gösterildi. Farklılaşma indüksiyonunun Asetil KoA, pirüvat ve sitrat düzeylerini değiştirdiği belirlendi. Akt inhibitör uygulaması ortam sitrat miktarını artırırken, diğer metabolitler üzerinde anlamlı bir değişiklik meydana getirmedi.

Çalışmamız ile elde edilen verilerin daha sonra planlanabilecek rejeneratif tıp uygulamaları kapsamındaki projeler için temel bir basamak oluşturabilecek kapasitede olduğu düşünülmektedir. Ayrıca çalışmamızda elde edilen veriler ve protokoller nöronal sinyal ileti fonksiyonu için kritik olan miyelin oluşumu ve rejenerasyonuna dair ileride planlanacak yeni çalışmaları destekleyebilir.

Anahtar Sözcükler: Wharton Jölesi, Mezenkimal Kök Hücre, Enerji Metabolizması, Asetil KoA



DETERMINATION OF AKT-AMP KINASE AND MTOR-MEDIATED ACETYL COA AND ACETYL COA RELATED METABOLITE CHANGES IN NEUROGLIAL DIFFERENTIATION PROCESSES

ABSTRACT

Stemcells differ from differentiated cells in terms of their physiology and metabolic pathways they use as energy sources. The effect of the metabolic plasticity in the physiology of stem cells has not yet been elucidated. In stemcells, glycolysis as the main ATP production pathway is rapid, independent of the O₂ level in the medium, the use of pyruvate in the mitochondria is reduced. Inhibition of mitochondrial biogenesis during neuronal differentiation blocks neuronal differentiation. Acetyl CoA and associated metabolism changes during neuroglial differentiation are not clearly defined yet. The aim of this study was to determine the effect of neuronal differentiation on acetyl CoA and related metabolite changes which may play a key role in the mutual regulation of carbohydrate, cholesterol and fatty acid metabolism.

Mesenchymal stem cells from human umbilical cord wharton jelly were isolated by explant method. Stem cells were exposed to neuronal differentiation media 21 days. Cell characteristics were evaluated by light microscopy, immunohistochemistry, flow cytometry and qPCR methods. In the neuronal differentiation process, levels of lactate, pyruvate and citrate of the stem cells were determined as colorimetric and fluorometric method. It was shown that the levels of lactate were significantly decreased during the neuronal differentiation period of WJ-MSCs. The levels of acetyl-CoA, pyruvate and citrate were changed after neuronal induction.

It is thought that the data obtained by our study is capable of forming a basic step for the projects that can be planned later in the regenerative medicine applications. In addition, data and protocols obtained in our study support future studies on myelin formation and regeneration which are critical for neuronal signaling.

Keywords: Wharton's Jelly, Mesenchymal Stem Cell, Energy Metabolism, Acetyl CoA

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kök hücreler özelleşmiş hücrelerden fizyolojileri ve enerji kaynağı olarak kullandıkları metabolik yollar bakımından farklılık gösterirler. Son yıllarda bu farklılığın nedeni ve boyutu üzerinde araştırmalar sürmekle beraber "metabolik plastisitenin" rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır. Kök hücrelerde glikoliz, ortamdaki O₂ düzeyinden bağımsız olarak hızlıdır, pirüvatın mitokondri içinde kullanılması azalmıştır. Nöron ve nöroglia hücrelerinin karbonhidrat ve lipit metabolizması farklıdır. Embriyonel kök hücrelerden nöronal farklılaşma sırasında mitokondrial biyogenez artışı ile beraber hücre içine glukoz alımının ve glikoliz enzim ekspresyonlarının azaldığı görülür.

Kök hücrelerde Pentoz fosfat yolağı aktiftir; bu yolağın aktivasyonu, nükleotid sentezinde öncü moleküllerin üretimini sağlayarak, hücrenin proliferasyona hazır olmasına ortam sağlar. Differansiye olmuş somatik hücrelerde ise metabolizmanın ortamdaki O₂ düzeyine bağımlı olarak sitrik asit siklusu ve mitokondrial oksidatif fosforilasyon baskın olduğu ileri sürülmektedir. Kök hücrelerden nöroprogenitör hücre ve olgun nöron farklılaşması sırasındaki kritik metabolik değişimler ise henüz net olarak bilinmemektedir. Olgun nöronlarda nörotransmitter sentezinde kullanılmak üzere sitozolik yollar aktif olması beklenir. Aksonları saran miyelin kılıfı oluşturan oligodendroglia hücrelerinde ise gelişim döneminde, kolesterol, fosfolipit ve galaktolipit gibi kompleks lipit sentezi artması olasıdır.

Nöronal farklılaşma sırasında mitokondrial biyogenezin arttığı bununla beraber artmış glukoz alımının, GLUT3 mRNA ekspresyonunun ve phosphofructokinase 1 (PFKp) protein ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Mitokondrial biyogenezin inhibisyonu nöronal farklılaşmayı bloke ettiği gösterilmiştir. Nöronal enerji metabolizmasının düzenlenmesinde PI3K–Akt–mTOR sinyal yolağının kritik düzenleyici rol üstlenebileceği ileri sürülmektedir. Diğer taraftan PI3 ve Akt yolağının uyarılması mTOR aracısız olarak AMPkinaz aktivasyonu sağlayabilir. Düşük glukoz veya hipoksi varlığında hücre içi (AMP+ADP/ATP) oranının değiştiği AMPKinaz aktivasyonu ile glikolizin arttığı ancak steroid ve yağ asidi sentezinin baskılandığı bilinmektedir. Hücrede steroid sentezi, kolesterolün mitokondri içine STAR proteini

aracılı taşınmasından sonra, mitokondrial sitokrom P450 scc enzimi aracılığı ile başlar. Ancak nöronal farklılaşma esnasında, olası mitokondri artışı ile beraber sitrik asit siklusu bağlantılı sitrat ve asetil koA düzey değişimleri henüz net olarak bilinmemektedir. Mitokondride pirüvatdan oluşan ancak mitokondrial membrandan geçemeyen asetil koA, sitrat ve pirüvat nöronal farklılaşma evrelerinin ayırımında kilit rol oynayabilir.

Hücre enerji metabolizmasının düzenlenmesinde AMP kinaz enzim aktivitesi merkezi role sahiptir. Düşük glukoz veya hipoksi varlığında (AMP+ADP/ATP) oranının değişerek AMP kinaz aktivasyonu ile glikolizin ve kök hücre canlılığının arttığı ancak kolesterol ve yağ asidi sentezinin baskılandığı gösterilmiştir. AMP kinaz enziminin kontrol yollarından biri olan PI3K ve Akt yolağının bloke edilmesi ile kök hücrelerin motor nöronlara çevrilmesi tetiklenebilir. Son yıllarda hücre enerji dengesi ve lipid metabolizmasında mTOR'un merkezi bir rolü olduğu ve AMP kinaz enzim yolağı haberleşebileceği tartışılmaktadır. Kök hücreler canlılıklarını koruma veya farklılaşma sürecinde gerekli fenotipik değişiklikleri oluşturma amacı ile enerji metabolizması ile ilişkili farklı metabolik kompartmanlar oluşturabilir.

Çalışmamızda, nöronal farklılaşma esnasında hücrede sentezlenen lipidlerin öncülü olan asetil koA'nın hücresel düzeylerinin değişeceği ve bu değişimin akt-AMP kinaz aracılığı ile kontrol edilebileceği **hipotezi ileri sürülmektedir**. Akt etkisinin inhibe edilmesine eşlenik AMP kinaz aktivite artışı glikoliz artışı yanı sıra hücresel asetil koA artışı ile sonuçlanabilir. Akt-AMP kinaz yolağı asetil koA'nın akıbetini belirlemek üzere pirüvat dehidrogenaz, pirüvat karboksilaz, sitrat liyaz, yağ asidi sentaz ve HMG CoA redüktaz vb glukoz-lipit metabolizması enzimlerini etkileyerek olgun nöron ve oligodendroglia oluşumunu kontrol edebilir.

Çalışmamızda insan mezenkimal kök hücrelerinin nöral farklılaşması esnasında olası laktat, asetil KoA, sitrat ve pirüvat metabolit düzey değişimlerinin indüksiyon zamanına bağlı olarak belirlenmesi **amaçlanmıştır**. Ayrıca farklılaşma esnasındaki olası metabolik değişimlerin enerji bağımlı Akt-AMP kinaz sinyal yolağı ile ilişkisinin değerlendirilmesi **hedeflenmiştir**. Akt inhibitörü X kullanılarak, oluşan metabolik değişimlerin hücre proliferasyon, canlılık ve farklılaşması ile ilişkisi incelenmiştir.

Çalışmamız ile elde edilen veriler sinyal ileti fonksiyonu için kritik olan miyelin oluşumu ve rejenerasyonuna dair ileride planlanacak çalışmalar için temel veriler oluşturabilir. Çalışmamızın kök hücrelerin devamlılığı ve nöroglial farklılaşması esnasındaki metabolik plastisitenin açıklanmasına katkı verebilecek potansiyelde olduğu düşünülmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

Kök hücrelerin keşfedilişi 19. Yüzyıla kadar gitmektedir. Bu kavram kan, deri gibi hücrelerin canlının yaşamı boyunca yenilenmesi gerekliliğinden yola çıkılarak ortaya çıkmıştır[1]. Kök hücreler iki önemli özellik ile diğer hücre tiplerinden ayrılırlar. Birincisi, uzun süre devam eden bölünme yeteneğine sahip ve kendini yenileyebilen hücreler olmaları; ikincisi ise çeşitli uyarımlar aracılığı ile vücutta bulunan farklı karakteristiklere sahip özelleşmiş hücrelere farklılaşabilme kapasiteleridir. Kök hücreler embriyo, göbek kordonu, yetişkin dokular gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilir. Farklılaşma yetenekleri köken aldıkları hücre tiplerine göre farklılık göstermektedir[2].

2.1.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine göre 4 temel sınıfta incelenebilir.

Totipotent Kök Hücreler: Ekstra embriyonik dokular ve plasenta dahil canlıdaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilir ve doku oluşturabilir. Gerekli koşullar sağlandığında totipotent özellikteki hücre yeni bir birey oluşturma potansiyeline sahiptir.

Pluripotent Kök Hücreler: Embriyonun gelişimine devam etmesi ile birlikte üç ana tabaka (endoderm, mezoderm, ektoderm) ortaya çıkar. Blastosistin iç hücre katmanından elde edilen kök hücreler ekstra embriyonik dokular hariç özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler.

Multipotent Kök Hücreler: Dokularda bulunan ve birden fazla sayıda hücre tipine farklılaşma kapasitesine sahip kök hücrelerdir. Mezenkimal hücreler bunlara örnektir. Göbek kordonu ve kanında, yağ

Unipotent Kök Hücreler: Tek hücre tipine farklılaşabilen kök hücrelerdir. Doku yenilenmesi veya hasar durumunda görev alarak destek olurlar.

Kök hücreleri köken aldıkları dokuya göre iki ana başlık altında incelenebilir [3] :

Embriyonik Kök Hücreler: Zigot oluşumundan sonra blastomerdeki hücreler 5.güne kadar vücudun bütün hücrelerine dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Blastosist

meydana gelmesiyle birlikte ve 3 ana kısım oluşur. Bunlar Trofoblast, blastosol ve iç hücre kitlesidir. İç hücre kitlesi, blastosolun ucunda küme halinde bulunan hücre topluluğudur. Bu hücre topluluğu ilerleyen evrelerde canlıyı oluşturacak farklı hücre tiplerine dönüşebilecek pluripotent kök hücrelerdir [4]. Rejeneratif tıp için önemli bir potansiyele sahip olmasına rağmen embriyodan elde ediliyor olması ve kötüye kullanılabilme ihtimali etik kaygılara yol açmıştır [5].

Yetişkin Kök Hücreler: Somatik kök hücreler olarak da bilinen bu kök hücreler kemik iliği, kordon kanı, göbek kordonu, yağ dokusu, kan gibi özelleşmiş organ ve dokularda bulunur, kendini yenileyebilir ve diğer hücre tiplerine farklılaşabilir. Hastalık, yaralanma, doku yenilenmesi gibi durumlarda önemli role sahiptirler [6], [7].

2.1.2.Mezenkimal Kök Hücreler

Friedenstein tarafından fare kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücreler (MKH), kemik iliğinden elde edilmiş, yüzeye tutunup çoğalabilen, multipotent özellik gösteren, stromal hücreler olarak tanımlanmıştır [8]. Bunların plastik zemine tutunabilen, koloni oluşturan ünitelere çoğalabilen fibroblastlar olduğu, belirli koşullarda farklılaşarak, osteojenik, kondrojenik, myojenik, adipojenik ve diğer hücre türlerine dönüşebildiği, çok sayıda çalışmada gösterilmiştir [9]–[11]

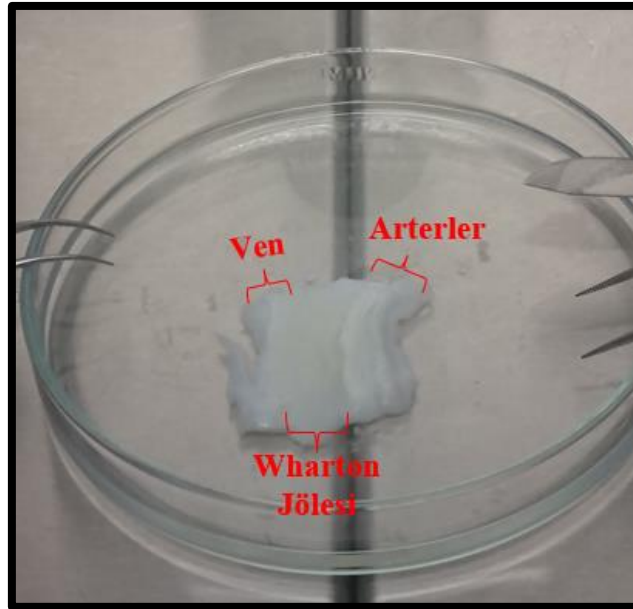
Kendini yenileme ve farklılaşma bir kök hücreyi tanımlayan iki esas kriterdir ve MKH bu özelliklere sahiptir. MKH'ler yağ dokusu, periferik kan, kemik iliği gibi yetişkin dokulardan veya amniyotik sıvı, kordon kanı, göbek kordonu gibi neonatal dokulardan elde edilebilirler [12]. MKH'ler kök hücre olarak belirli proteinleri eksprese ederler, ancak sadece MKH'de eksprese olan bir belirteç protein henüz bulunamamıştır (Handbook of Stem Cells, Volume 2 (Google eBook) 2012). Dominici et. al., 2006 yılında yayınladıkları makale ile minimal MKH kriterinin CD105, CD73, CD44 ve CD90 markırları için pozitif ekspresyon ve CD45, CD34, CD14, CD19 ve HLA-DR yüzey molekülleri için negatif ekspresyon olmasını önermişlerdir. Ayrıca MKH'lerin standart in-vitro kültür koşullarında adiposit, osteosit ve kondrositlere farklılaşma kapasitesine sahip olması gerekmektedir. İmmünsüpresif etkilerinin olması, MKH'lerin hücresel tedavilerde ve rejeneratif tıpta en önemli hücre kaynağı olarak değerlendirilmelerinin önünü açmıştır [13].

İnsan perinatal dokularda multipotent kök hücreler tespit edilmiş ve ekstra embriyonik mezankimal kök hücreler (EE-MKH) olarak tanımlanmışlardır. Bunlar, plasenta, amniotik sıvı, amnion, göbek kordonu kanı ve göbek kordonunda yer alabilmektedirler [14].

2.1.3. Wharton Jölesi Mezenkimal Kök Hücreleri

Göbek kordonu kanı MKH (GKK-MKH), hematopoetik kök hücre gereken tedavilerde kullanılmaktadır, ancak bu hücrelerin klinikteki kullanılmasında en büyük sınırlama, kordondan izole edildiklerinde başlangıç sayının az olması nedeniyle, çoğaltılmaları sonunda transplantasyon için gerekli toplam sayıya ulaşılammama olasılığının büyük olmasıdır [15].

Göbek kordonunda iki arter ve bir ven, bunların çevresinde ise koruyucu görevi olan bir doku; Wharton jölesi bulunur (Şekil 1). Wharton jölesi, mukoid bir bağ dokudur, hyalüronik asitten zengindir ve stromal hücreler içermektedir. Stromal hücreler fibroblast-benzeri hücreler ve miyofibroblastlardır [16]. Wharton jölesi içindeki MKHler, Wharton jölesi MKHleri (WJ-MKH) olarak adlandırılmışlardır.



Şekil 1: Göbek kordonu ve Wharton jölesi

Bu hücreler, embriyolojik gelişim sırasında aort-gonad-mezonefroz bölgesine göç ederken kordon etrafında kalmış olan primitif MKHlerdir [17]. Wharton jölesi ve plasenta, fetal dokulardır, bunlardan elde edilen hücreler genotip ve fenotip olarak fetal özellik göstermektedir.

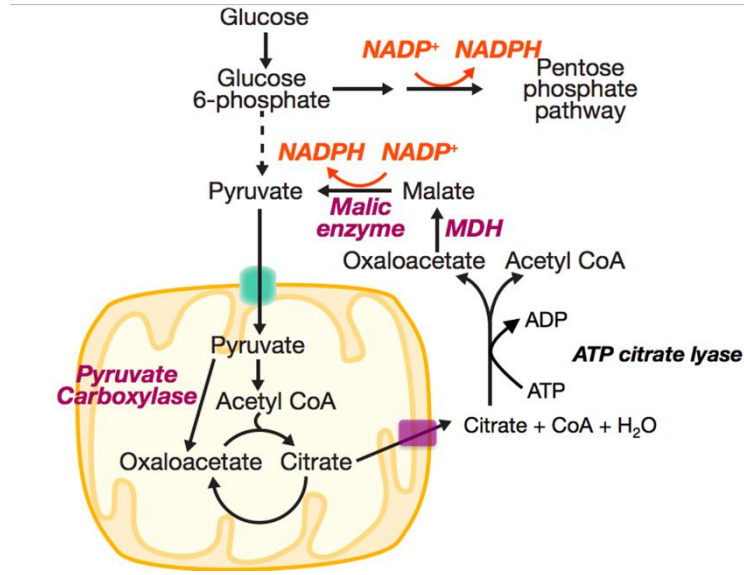
WJ-MKHleri Uluslararası Hücre Tedavisi Derneği (International Society for Cellular Therapy; ICTS)nin 2006'da yayınladığı minimal kök hücre kriterlerini taşımaktadırlar [13].

2.1.4. Kök Hücre Enerji Metabolizması

Kök hücreler diferansiye hücrelerden fizyolojileri ve enerji kaynağı olarak kullandıkları metabolik yollar bakımından farklılık göstermektedirler. Bu farklılığın nedeni ve boyutu üzerinde araştırmalar sürmektedir [18].

Hücrede mitokondrilerin sayısı değişebilmektedir, organellerin füzyon/fisyonu ile artıp azalabilmektedir. Bu organeller gerektiğinde mitokondriyel otofaji = miyofaji ile lizizomlarda degrade edilirler. Farklılaşmış hücrelerin aksine, kök hücrelerinde mitokondriler küçüktür ve az gelişmiştir [19]. Mitokondriyal ağın fragmente ve organel aktivitelerinin düşük olması, bir kök hücreyi belirleyen bir özellik olarak kabul edilmektedir [20]. Kök hücrelerde mitokondrinin sayısının ve şeklinin hücrenin farklılaşma durumuna göre değişkenlik gösterdiği gösterilmiştir. Farklılaşma uyarıları, hücredeki sinyal alıcı farklı proteinler aracılığı ile belirli genlerin ekspresyonunu değiştirmektedirler. Bu genlerin ürünleri olan proteinlerin bir kısmı mitokondride yer almakta ve organelin işlevlerini değiştirmektedirler. Bu sinyal alıcılara örnek, besin düzeyini değerlendirmesini sağlayan sensörler, mitokondri biyogenezi düzenleyen proteinler ve redoks sensörler verilebilir [21], [22].

Hücrede enerji üretiminde en temel yolak, glikolizdir, ancak bu yolla elde edilen enerji miktarı azdır. Glikoliz yolu ile glikozun pirüvata dönüşümünde ATP verimi 2 iken, son pirüvatın mitokondriye girmesi, Krebs siklusu ve solunum zincirindeki reaksiyonlar ile bir glikoz molekülü başına elde edilen enerji miktarı 36 ATP olmaktadır. Çok farklı işlevi olan ve enerji gereksinimleri hızla değişebilen farklılaşmış hücrelerde mitokondriyel fonksiyon, bu ATP miktarını karşılayabilmek üzere gelişmiş durumdadır.



Şekil 2: Glukoz metabolizması ve oluşan ürünlerin olası akıbetlerinin şematik gösterimi.

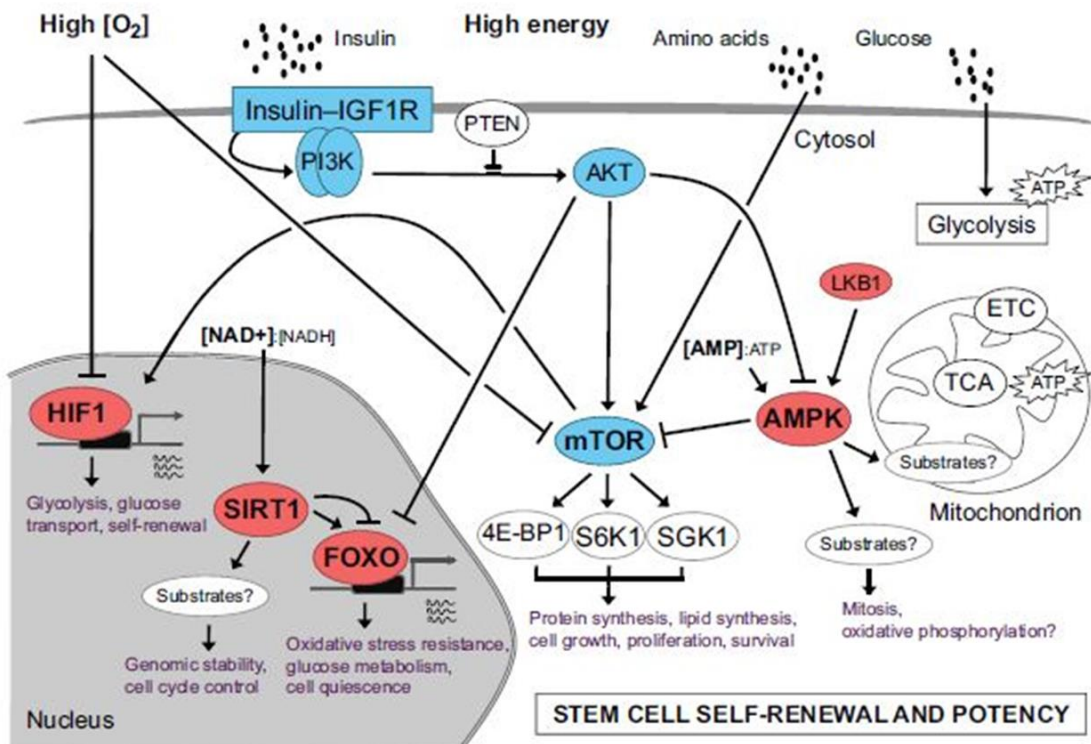
Kök hücrelerde,

- Glikoliz, ortamdaki O₂ düzeyinden bağımsız olarak hızlıdır, bu hücrelerde ana ATP üretim yolağıdır.
- Pirüvatın mitokondri içinde kullanılması azalmıştır. Pirüvatın PDH enzimi ile asetil KoA'ya dönüşmesini inhibe eden PDK böylelikle, bunu izleyen Krebs siklüsü ve oksidatif fosforilasyon ile ATP oluşumunu azaltıcı etki gösterir [19].
- Krebs siklüsünün ara ürünü 4 karbonlu bileşikler sitozole yönlendirilmektedir (UCP altında açıklanmıştır).
- Pentoz fosfat yolağı aktiftir; bu yolağın aktivasyonu, nükleotid sentezinde öncü moleküllerin üretimini sağlayarak, hücrenin proliferasyona hazır olmasına ortam sağlar [19].

Embriyonik kök hücrelerde ve hematopoetik kök hücrelerde glikoliz ile oksidatif fosforilasyon dengesi ile ilgili yakın zamanda yapılan çalışmalar bir derlemede özetlenmiştir [23]. İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerle yapılan yayınlar, bu hücrelerde geri programlamaya paralel olarak glikolizin arttığını göstermektedir [19].

2.1.5.Kök hücrelerde enerji sensörleri ve rolleri

Besin sensörü ve enerji sensörü olarak görev yapan metabolik yollar, kök hücrelerin pluripotent özelliklerinin korunmasında ve farklılaşmalarında rol alırlar [24], [25]. Bunlardan biri olan AMPK, enerji sensörü olarak görev yapan bir Ser/Thr kinazdır. Hücrede AMP/ATP oranının düşmesi veya enerji üretiminin azalması sonucunda AMPK tarafından katabolik yollar aktive ve anabolik yollar inhibe edilerek enerji dengesi korunmaya çalışılır [26]. İnsülin sinyal iletim yolağında yer alan Akt proteini, AMPK'yi inaktive etmektedir.



Şekil 3: Akt-mTOR-AMPK sinyal yolağı [24].

Bir diğer besin durumu sensörü ise, mTOR, Raptor, PRAs40, Deptor ve mLst8 proteinlerinin oluşturduğu bir kompleks olan mTORC1 kompleksidir. mTOR da bir Ser/Thr kinazdır, bir grup substrat proteinini fosforiller ve metabolizmayı kontrol eder. Substratları; S6K, 4E-BP, LIPIN1, TFEB ve Ulk1 olarak gösterilmiştir. mTORC1, lizozom üzerinde yer alarak hücre için besin ve amino asit düzeylerini ölçen bir sensör görevi yapar. Mitokondriyel biyogenezi uyarır. Aktivitesi AMPK üzerinden hücre enerji düzeyleri ile de ilişkilidir [27].

2.1.6.Nöral Farklılaşma

Son on yılda WJ-MKH'den rejeneratif tıp uygulamalarında kullanılma amacı ile fonksiyonel dopaminerjik ve asetilkolinerjik nöronların farklılaşması için gerekli yöntemsel çalışmalar sinir bilimleri araştırmacıların ilgi odağı olmuştur [28]–[31] Ancak Wharton jölesinden fonksiyonel nöronların farklılaşması ve transplantasyonu için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Nöronal hücrelere farklılaştırma için embriyo temelli hat seçimi [32] ve stromal hücrelerle ko-kültür gibi birkaç protokol direkt fare EKH 'lerinin orta beyin dopaminerjik nöronlarına dönüşümünde kullanılmıştır [33]. Parkinsonlu ratlara bu hücrelerin "grafting" ile transferinden sonra fare EKH'lerden türeyen dopaminerjik nöronlar yaşamlarını devam ettirerek ve striatuma entegre olarak fonksiyonel gelişim sağlamışlardır. Benzer şekilde kök hücrelerin farklılaştırılması ile elde edilebilecek asetilkolinerjik nöronların Alzheimer hastalığında oluşan nöronal dejenerasyonu ve fonksiyonel kayıpları yerine koyması olasıdır. Diğer taraftan dolaşım ile beyin dokusunun direkt temasını engelleyen nöron, astrosit ayakları yanı sıra endotel hücreleri tarafından oluşturulan "kan beyin bariyeri"nin bütünlüğü beyin dokusunun fonksiyonu için hayatidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel, *in vitro* hücre kültürü çalışmasıdır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmamız Haziran 2018-Ocak 2018 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Kök hücre eldesi için Tepecik Kadın Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran 18–40 yaş arası miad (37-40 haftalık) sezeryanla doğum yapan gebeler dahil edilmiştir. 25 gebeden alınan göbek kordonundan elde edilen kök hücreler araştırma evrenini oluşturmaktadır.

3.4. Araştırmanın Çalışma Materyali

Araştırmada insan göbek kordonundan elde edilen Wharton Jölesi mezenkimal kök hücreleri ve bu hücrelerden farklılaştırılan nöron-benzeri hücreler kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız değişken; farklılaşma ortamı uygulaması, Akt inhibitör uygulaması

Bağımlı değişkenler: özelleşmiş hücre belirteçleri, asetil koA, sitrat, pirüvat düzeyleri

3.6. Veri Toplama Araçları

Tablo 1: Kullanılan Cihazlar

Laminar Air Flow Hücre Kültürü Kabini	Thermo Sci, 2020
Karbondioksit İnkübatörü	Thermo Sci, Steri-Cycle i160
Ters Faz Işık Mikroskobu	Nikon Eclipse TS-100
Santrifuj	Eppendorf 5810 R
Derin Dondurucu	Thermo Forma Model 705

Plak Okuyucu	BioTek ELX 800
Sonikatör	Sonic Materials
Akış Sitometre	BD Accuri C6
Floresan Mikroskopu	Olympus DP71
Thermal Cycler	Roche Light Cycler 480

Tablo 2: Kullanılan Kimyasallar

DMEM:F12	Thermo Sci. (11320)
Neurobasal Ortam	Thermo Sci. (21103)
Fötal Sığır Serum	Thermo Sci. (16000-36)
Penisilin/Streptomisin	Thermo Sci. (15140122)
Epidermal Büyüme Faktörü	Biovision (7135)
Fibroblast Büyüme Faktörü	Biovision (4037)
Forskolin	Sigma (6886)
N2 Takviyesi	Thermo Sci. (17502001)
B27 Takviyesi	Thermo Sci. (17504044)
CD 44 Primer Antikor	Abcam (ab6124)
CD 90 Primer Antikor	Abcam (ab225)
Nestin Primer Antikor	Cell Signaling (33475S)
β 3 Tubulin Primer Antikor	SantaCruz (sc 80016)
Stempro Accutase	Thermo Sci. (A1110501)
Akt İnhibitörü	Biovision (2338)
DAPI	CST (8961S)

İkincil Antikor (FITC)	Abcam (ab97039)
------------------------	-----------------

Donör Dışlama Kriterleri

Kök hücre eldesi için çalışmaya Tepecik Kadın Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran 18–40 yaş arası miad (37-40 haftalık) sezeryanla doğum yapan ve gönüllü onam veren gebeler dahil edilmiştir.

Çoğul gebelikler, yardımcı üreme teknikleri yoluyla elde edilen gebelikler, bilinen genetik ve yapısal anomalisi olan fetüsler, diyabet, tiroit hastalıkları gibi annenin bilinen ek hastalığı olduğu durumlar ve sürekli ilaç kullanımı gerekli haller, intrauterin gelişme geriliği (fetal ağırlık <2500 gr) olan gebeler çalışma dışı bırakılmıştır.

3.6.1.Göbek Kordonunun Temini

Doğumun gerçekleşip bebeğin doğumunu takiben çocuk doktoruna verilmesinin ardından plasenta ile kordon arasına 3. bir klemp konularak plasenta uterustan alınmıştır. Plasenta ile kord, 3. klempin hizasından plasentaya yakın yerden kesilerek ayrılmıştır. Kordon, üzerindeki kan aseptik koşullarda silinerek birkaç dakika içinde steril, 5 g/l glikoz, 50 µg/ml gentamisin, 2.5 µg/ml amfoterisin B, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin eklenmiş, +4°C de bekletilen fosfat tamponuna (PBS) yerleştirilmiştir. Kordonun yaklaşık olarak 2 saat içinde Dokuz Eylül Üniversitesi T. Biyokimya hücre kültürü laboratuvarına transferi sağlanmış ve bekletilmeden kök hücrelerin izolasyonuna başlanmıştır.

3.6.2.Kök Hücrelerin İzolasyonu

Eksplant Yöntemi

Göbek kordonu laboratuvara ulaştıktan sonra hızlı bir şekilde steril ve hazır şekilde bekleyen laminar akımlı hücre kültürü kabinine alındı. Kordon taşındığı kabin içinden alınarak sağma hareketi ile içinde kalmış olabilecek kandan arındırıldı. 1.5-2 cm'lik uzunluğundaki parçalara ayrıldı ve kurumaması için izolasyon gerçekleşene kadar PBS içinde bekletildi. Her parça, dokuda bulunan iki arter ve bir ven dokudan ayrılarak jöle bölgesi ortaya çıkarıldı. Temizlenen doku parçalara ayrılarak altı kuyucuklu hücre

kültürü kaplarının bir kuyucuğuna jöle altta kalacak şekilde yerleştirildi ve yüzeye tutunması için 1 saat kabin içinde bekletildi. Yüzeye tutunan eksplantlara 10% Fötal Sığır Serum (FBS) ve 2 mM L-Glutamine içeren DMEM:F12 komplet ortam eklenerek 37°C'de ve %5 CO² içeren inkübatöre kaldırıldı. Hücre kültür kaplarına örnek kodu, izolasyon işleminin yapıldığı tarih ve taze kültür ortamı değişiminin yapıldığı tarih yazıldı. Haftada iki kere eski kültür ortamı çekilerek taze komplet ortam ile değiştirildi. Eksplantlar ışık mikroskobu yardımı ile izlenerek hücre çıkışı gözlemlendi.

Enzimatik Yöntem

Araştırmamızda enzimatik yöntem ile Wharton jölesinden mezenkimal kök hücrelerin izolasyonunda kollajenaz ve tripsin enzimleri kullanıldı.

Kadın Doğum Kliniğinden getirilen ve steril soğuk çözeltide bekletilen kordonlar, steril kabin içinde çalışılarak üzerlerindeki pıhtı temizlendi ve içlerindeki damarlar disekte edilerek çıkarıldı. Mezenkimal doku (Wharton jölesi) yaklaşık 0.5 cm³'lük parçalara ayrıldıktan sonra 250g de 5 dakika santrifüj edildi. Ortamdan süpernatant uzaklaştırılarak, mezenkimal dokulardan oluşan pellet serumsuz DMEM/F12 ile yıkandıktan sonra 250 g' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın ortamdan uzaklaştırılmasından sonra , pellet kollajenaz ile 37°C' de 18 saat muamele edildi. İnkübasyon süresi bitiminde doku parçaları PBS' le yıkanarak 2.5% trypsin ile 37°C' de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde ortama %10 FBS' li DMEM/F12 büyüme ortamı eklenerek nötralizasyon sağlanır. Mezenkimal hücrelerin bu % 10' luk FBS' li büyüme ortamı içinde plete yüzeyine tutunarak büyümesi sağlandı.

3.6.3.Kök Hücrelerin Kültürü

İzole edilen kök hücreler %10 FBS ve 2 mM L-glutamin içeren DMEM:F12 bazal ortam kullanılarak 37°C'de ve %5 CO² içinde inkübe edildi. Haftada iki kere eski ortam çekilip atıldı ve taze komplet ortam eklenerek ortam değişimi yapıldı. Hücreler inkübatörden alınıp mikroskop ile gözlenerek durum değerlendirilmesi yapıldı. Konfluent olan hücrelerin ortamı çekilip atıldı ve 2 ml PBS ile yıkama yapıldı. Hücreleri yüzeyden kaldırmak için Accutase solüsyonu kullanıldı. Normal hücre kültürü

koşullarında kullanılan ortamın beşte biri kadar accutase hücre kültürü kabına eklenerek 2-3 dakika inkübatöre kaldırıldı. Yüzeydeki hücrelerin kalkması ve hücre kaybı yaşanmaması için hücre kültürü kabının kenarına hafifçe vuruldu. Mikroskopta tüm hücrelerin kalktığı gözlemlendikten sonra accutase'in inaktive edilmesi için eklenen hacmin iki katı kadar komplet ortam eklendi. Serolojik pipet yardımı ile yüzey yıkandı ve tüm hücre/ortam karışımı 15ml falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Süpernatant atılarak hücre pelleti 1ml komplet ortamda çözüldü ve sayım yapıldı. Elde edilen hücre süspansiyonundan deney koşullarının gerektirdiği kadar hücre sayılarak ekim yapıldı. Eğer deney oluşturulmayacak ise hücreler 1:3 oranında pasajlandı ya da dondurularak stok oluşturuldu.

3.6.4.Canlılık Testi

Hücre canlılığının belirlenmesi için CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega) kiti kullanıldı. 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 1×10^4 hücre son hacim 200 μ l olarak ekildi. Kitin talimatlarına uygun olarak deney sonunda 100 μ l son hacim olarak düzenlendi ve MTS solüsyonundan kuyucuk başına 20 μ l eklendi. 3 saat inkübe edildikten sonra ELISA plak okuyucusunda 490 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Sonuçlar yüzde canlılık olarak hesaplandı.

3.6.5. Karakterizasyon Deneyleri

İmmünfloresan Boyama: Çalışmamızda WJ-MKH'lerinin kök hücre karakteristiğini doğrulamak için mezenkimal kök hücrelere özgü CD44 ve CD90 antikoru kullanıldı. Nöronal farklılaşmayı göstermek için ise Nestin ve β 3-Tubulin antikoru ile işaretleme yapılarak hazırlanan preparatların Olympus DP71 floresan mikroskopunda DP Manager ve DP Controller programları kullanılarak 10X, 20X ve 40X' te görüntüleri alındı.

Deney koşulları sonlanan hücrelerin fiksasyonu için -20 °C'de soğutulmuş metanolden her kuyucuğa 1'er ml eklendi ve -20 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda metanol çekildi ve PBS ile yıkama yapıldı. 2 hafta içinde boyama deneyi yapılmak üzere PBS içinde +4 °C'de saklandı.

Lameller kuyulardan hücre bulunan yüzeyleri yukarı bakacak şekilde alındı ve kurumaması için üzerine PBS damlatıldı. 80 μ L %0,2'lik triton-x 100 ile

permeabilizasyon yapıldı. 30 dakika boyunca 80 uL %1 BSA bulunan PBS ile bloklama yapıldı. CD90 (1:100), CD44 (1:100), β 3 Tubulin (1:100), Nestin (1:1000) primer antikor uygulandı. Hücre çekirdeğini işaretlemesi için DAPI boyası kullanıldı. Hücreler lam ile lamelin arasında kalacak şekilde kapatıldı.

Akış Sitometre Analizi: WJ-MKH'lerin karakterizasyon basamaklarından biri olan akış sitometre deneyleri için BD Accuri C6 Cytometer cihazı ile uyumlu BD Stemflow Human MSC Analysis Kit kullanıldı.

Hücreler tutundukları hücre kültür kaplarının yüzeyinden accutase enzimi yardımıyla kaldırıldı ve santrifüj işlemi ile pellet haline getirildi. Hücre pelleti %2 FBS içeren 1X PBS ile çözülerek 1×10^6 hücre 100 μ L hacimde ependorf tüplere pay edildi. Ependorflara dağıtılan hücre süspansiyonlarına kit protokolünde belirtildiği şekilde MKH yüzey belirteçlerine özgü olan CD44, CD73, CD90 ve CD105 antikorları veya izotip kontrol eklenerek 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol olarak herhangi bir antikor içermeyen hücre çözeltisi kullanıldı. İnkübasyon sonunda ortamdaki bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak için PBS ile yıkama yapıldı. Hücreler akış sitometre tüplerine aktarılarak analiz gerçekleştirildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Çalışmamızda izole edilen WJ-MKH'lerinin karakterizasyonunu doğrulamak amacıyla yapılan immunfloresans boyama ve akış sitometre analiz deneylerinin yanı sıra kullanılan yüzey belirteçlerinin gen ekspresyonunu saptamak için PZR deneyleri de yapıldı. PZR için gerekli olan total RNA, MN Nucleospin RNA izolasyon kiti ile elde edildi. RNA saflığı ve konsantrasyonu Thermo NanoDrop 2000 cihazında belirlendi. cDNA sentezi için Thermo ve Fermentas cDNA sentez kitleri kullanıldı. Elde edilen cDNA' lar hem RT-PZR' de hem de qPZR deneylerinde kullanıldı.

Reverse Transkriptaz PZR (RT-PZR) ve Agaroz Jel Elektroforezi: Çalışmamızda yer alan gen ekspresyonu deneyleri kapsamında ilk olarak reverse transkriptaz PZR deneyleri yapıldı. 10X PZR tamponu, 25 mM $MgCl_2$, 25mM dNTP karışımı, 0,2 μ M reverse ve forward primer çifti, nükleaz free su ve Taq polimeraz enzimi ile PZR master mix hazırlandı. cDNA içeren 0,2 ml'lik PZR tüplerine son hacim 25 μ l olacak şekilde PZR master mix karışımı eklendi. Bu aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Primerlerin belirtilen Tm değerlerine uygun sıcaklık ve döngü

ayarlaması yapıldıktan sonra reaksiyon başlatıldı. PZR deneyi bitiminde tüpler tekrar buz üzerinde tutularak sonraki basamak olan agaroz jel elektroforezine geçildi. Deneylerde kullanılan primerlerin baz çifti olarak molekül büyüklüklerine göre agaroz jelin yoğunluğu %1-2 arasında değişecek şekilde hazırlandı. Elektroforezde kullanmak üzere 10X'lik TAE (Tris base, Glasial asetik asit, EDTA, distile su) tamponu hazırlandı. Belirlenen konsantrasyon için toz halindeki agaroz tartıldıktan sonra 1X'lik TAE tamponu içinde çözüldü ve elektroforez tankına dökülüp, jele EtBr (Etidyum bromür) eklenerek polimerleşmesi beklenildi. Jel polimerleştikten sonra üzerini kaplayacak şekilde tanka 1X'lik TAE tamponu dökülerek, jel kuyucuklarına sırasıyla, jel yükleme boyası ile karıştırılmış house-keeping primeri içeren cDNA örneği ve diğer cDNA örnekleri yüklendi. Jel tankı güç kaynağına bağlandıktan sonra ortalama 100 watt ve 1 saatlik zaman ayarlaması yapılarak elektroforez deneyi yapıldı. Süre bitiminde jel tanktan çıkartılarak, görüntüleme cihazında görüntüsü alındı.

Kantitatif PZR (qPZR) : Reverse Transcriptaz-PZR deneyleri ile ön sonuçlar elde edildikten sonra, gen ekspresyonlarının kantitatif analizi için qPZR deneyleri gerçekleştirildi. Bu deneyler, Roche Light Cycler 480 cihazı ve Thermo Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix kiti kullanılarak yapıldı.

İçeriğinde 2X master mix, 10 µM reverse ve forward primer çifti ve nükleaz free su bulunan qPCR master mix hazırlanarak karanlıkta tutuldu. cDNA örneklerinin bulunduğu 96-well plate kuyucuklarına son hacim 20 µl olacak şekilde qPCR master mix dağıtıldı. Plate yüzeyi saydam bir koruyucu filmle kapatıldıktan sonra, kuyucuklardaki reaksiyon bileşenlerinin birbiriyle karışabilmesi için 10-15 sn kadar santrifüj edildi. Cihaz açılıp bilgisayar programından kullanılan primer çiftlerinin Tm değerlerine uygun sıcaklık ve döngü ayarlaması yapıldıktan sonra reaksiyon başlatıldı. Süre bitiminde sonuçlar bilgisayar ortamına kaydedilerek analiz edildi.

3.6.6.Kök Hücrelerin Nöronal Farklılaşması

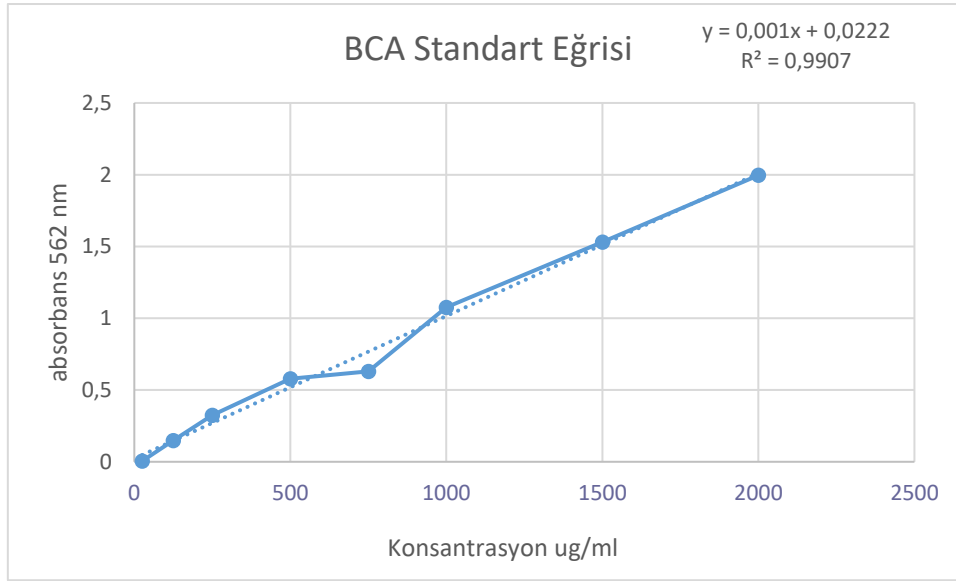
Nöronal farklılaşma deneyleri pasaj sayısı dördü geçmeyen WJ-MKH'ler ile gerçekleştirildi. Bu deneyler için T25 hücre kültürü flasklarına 2×10^5 hücre komplet ortam içinde ekildi ve yüzeye tutunmaları için 24 saat beklenildi. Ortam çekildi ve ileri deneylerde kontrol olarak kullanılmak üzere saklandı. Farklılaşmanın ilk aşaması olarak

WJ-MKH'leri nestin pozitif hücelere farklılaştırmak amacıyla DMEM/F12 ortamına N2-takviyesi ve 10 ng/ml epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor, EGF) eklenerek 2 gün boyunca 37°C'de ve %5 CO₂ içinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültür ortamı analiz yapılmak üzere -80°C'de saklandı. Hücrelerin nöral kök hücre benzeri farklılaşması için 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), B27-takviyesi içeren neurobasal ortam ile 3 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ortam çekilerek analizlerde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı. Nöronal farklılaşmanın tetiklenmesi amacıyla 10 µM Forskolin içeren nörobasal ortam ile 2 gün inkübe edildi.

Akt yolağının nöronal farklılaşmaya olan etkisinin incelenmesi amacıyla Akt İnhibitörü X (Biovision) kullanıldı. Farklılaşma ortamlarının eklenmesinden önce hücreler 5 µM Akt İnhibitörü X ile 3 saat boyunca inkübe edildi ve farklılaşma protokolü aynı şekilde uygulandı.

3.6.7. Protein Tayini

Total protein konsantrasyonları Bisinkoninik Asit (BCA) yöntemi ile kolorimetrik olarak saptandı. Yöntemin prensibi alkali ortamda protein tarafından Cu +2 iyonunun Cu +1 iyonuna indirgenmesine (Biüret reaksiyonu) ve bisinkoninik asit içeren tek bir reaktif kullanarak Cu +1 'in renk değişiminin ölçülmesine dayanır. 2 mg/mL konsantrasyonda olan sığır serum albumin (BSA) kullanılarak 25-2000µg/mL konsantrasyon aralığında standart eğrisi hazırlandı. Bisinkoninik asit ve %4 bakır sülfat içeren çalışma solusyonu ile 30 dakika 37°C'de inkübe edilmesinden sonra absorbanlar 562 nm'de okundu. Standart eğrisine göre her örneğin içerdiği protein miktarı belirlendi. Standart eğrisi aşağıdaki gibidir (Şekil 2)



Şekil 4: Protein tayini standart eğrisi

3.6.8. Nöral Farklılaşmış Hücrelerde Laktat Üretimi

Laktik asit (laktat), karbonhidrat metabolizması ara ürünüdür. Anaerobik glikolizin son ürünüdür. Hücrede esas olarak pirüvatın indirgenmesine bağlı olarak oluşur.

Kök hücrelerin nöral hücrelere farklılaşması sürecinde laktat kullanımını ölçmek için 12 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 3×10^4 hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekim yapıldı. Hücrelerin yüzeye tutunması için 24 saat beklendikten sonra farklılaşma protokolü uygulandı. Ardışık olarak indüksiyonun 1,2,3,4,5,6 ve 7. gününde hücre kültür ortamında L-Laktat, enzimatik kolorimetrik yöntem ile belirlenmiştir (Beckman Coulter, OSR6130 (OSR6193)).

L-laktat, laktat oksidaz (LOD) tarafından pirüvat ve hidrojen perokside oksitlenir. Peroksidaz (POD), hidrojen peroksit, 4-aminoantipirin ve bir hidrojen donörünün (TOOS) reaksiyonu vasıtasıyla renkli bir ürün üretilir. Renkli ürün, fotometrik olarak ölçülür. Renk yoğunluğu, numunedeki laktat konsantrasyonu ile orantılıdır.

Reaksiyon Prensibi :



Reaktif içeriği:

- Laktat oksidaz $\geq 0,2$ kU/L (500 μ L)
- Peroksidaz ≥ 1 kU/L
- Good Tamponu (pH 7,0) 50 mmol/L
- 4-aminoantipirin 0,1 mmol/L
- TOOS* $\geq 0,3$ mmol/L
- N-etil-N-(2-hidroksi-3-sülfopropil)-3-metilanilin

Örnek Volumü 30 μ L Total Reaktif Volumü 3000 μ L oranında karıştırılarak , oluşan renkli kromojenin absorbansı 560 nm de ölçüldü.

3.6.9. Asetil KoA ve İlişkili Metabolit Değişimlerinin Belirlenmesi

Metabolit düzeylerinin belirlemek için hücreler 2×10^4 /kuyucuk olacak şekilde 12' kuyucuklu kaplara ekildi. Farklılaşma ortamı uygulandıktan sonra belirlenen inkübasyon sürelerinin sonunda hücreler sonike edilerek parçalanarak hücre lizatları elde edildi. Kolorimetrik fotometrik yöntem ile asetil koA ve ilişkili metabolit düzeyleri belirlendi.

• Asetil KoA Düzeyinin Belirlenmesi

Asetil CoA merkezi bir metabolizma molekülüdür. Daha büyük moleküllerin oluşumunda ve parçalanmasında kullanılan asetat taşıır. Asetil KoA, seskiterpen, kolesterol ve diğer steroller, flavenoidler ve diğer polipositler, polenler ve uzun zincirli yağ asitlerinin öncülerinin sentez yolaklarında anahtar rol oynar. Histon asetilasyonunda kullanılan asetil grubunun kaynağıdır. Asetil grubu ayrıca asetilkolin, melatonin, hem ve TCA siklüs ara maddeleri gibi çeşitli başka moleküllere de dahil edilir.

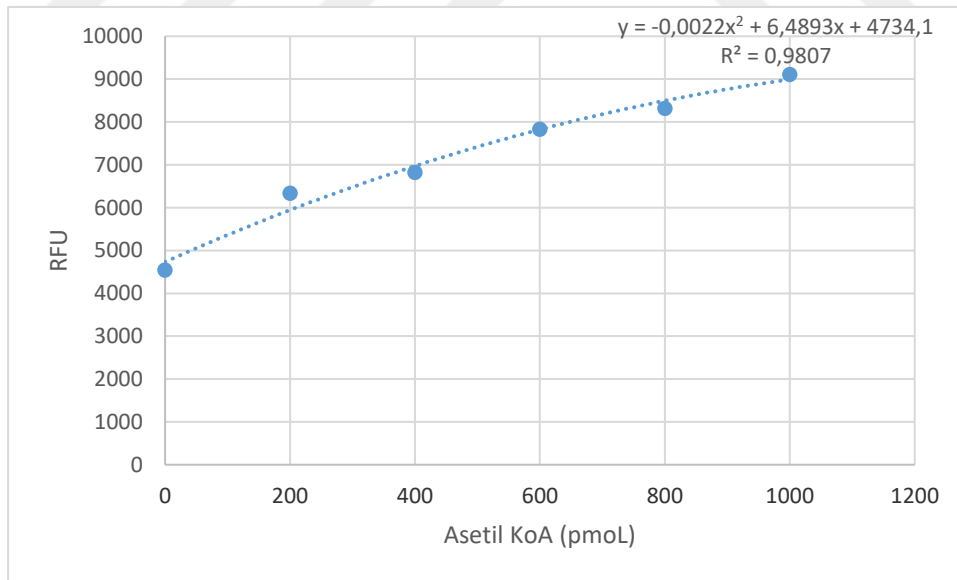
Hücrelerin Asetil KoA düzeyi florometrik ölçüm prensibine dayalı metot ile ölçüldü (Biovision Acetyl CoA Assay Kit K317,CA). Testte, Asetil CoA, CoA'ya dönüştürülür. Serbest CoA, floresan ışımaya üretmek için PicoProbe ile etkileşime giren NADH oluşturmak üzere reaksiyona sokulur. Ex / Em = 535/587 nm dalga boylarında okuma yapılır. Kit 10 ila 1000 pmol Asetil CoA (tespit limiti $\sim 0,4$ 0.4M) tespit edebilir.

Standart Hazırlığı

10 mikromolarlık Asetil KoA Standardı 100 pmol / μ L olacak şekilde 10 uL Standart 990 μ L dH₂O ekleyerek seyreltilir, iyice karıştırılır. Bu solüsyondan 100 μ L alınarak 400 μ L suya eklenir ve 5 kat daha seyreltme sağlanır. 96 kuyucuklu plağa sırası ile 0, 10, 20, 40, 50 μ L eklenir. Test tamponu ile hacmi 50 μ L / kuyucuğa ayarlanır.

Örnek Hazırlığı

Hücreler (10×10^4), perklorik asit/KOH protokolü ile deproteinize edilir. Hücreler tampon ile sonike edildikten sonra 10 dakika boyunca 10,000 g'de santrifüjlenir. Üstte kalan supernatant, 3M KHCO₃ ile nötralize edildi. 5 dakika buz üzerinde bekledikten sonra pH kontrolü yapıldı (6-8). 96 well plağa 10 uL olacak şekilde eklendi ve assay tamponu ile hacim 50 uL'ye tamamlandı. Üzerine 50uL reaktif (40 μ L tampon+2 μ L substrat mix+2 μ L değişim enzimi+ 2 μ L enzim karışımı+ 2uL Picoprobe) eklenerek, 10 dakika 37 derecede bekletildikten sonra Ex/Em=535/587 nm'de florometrik ölçüm yapıldı. Sonuçlar well hücre sayısı başına nmol/uL(mM) olarak verildi. Asetil KoA kalibrasyon eğrisi aşağıda görülmektedir.



- **Piruvat Düzeyinin Belirlenmesi**

Piruvat, metabolizmada şekerlerin sitrik asit döngüsüne girdiği merkezi bir moleküldür. Piruvat, glukoneogenez sırasında karbonhidratlara veya asetil CoA vasıtasıyla yağ asitlerine dönüştürülebilir. Piruvat seviyelerinin yüksek olması karaciğer hastalığı ve genetik bozukluklarla ilişkilidir. Piruvat ayrıca vücut ağırlığının kaybına neden olan metabolizmayı uyarmak için kullanılmıştır.

Kullanılan kit (Biovision Pyruvate Assay Kit, K609,CA) ile piruvat, piruvat oksidaz enzim reaksiyonları yoluyla oksitlenir ve renk değişimi ortaya çıkar. Renk değişimi 570 nm'de okutulur ve absorbans elde edilir ve piruvat düzeyleri hesaplanır. Kit 1 µM ila 10 mM piruvat tespit edebilir.

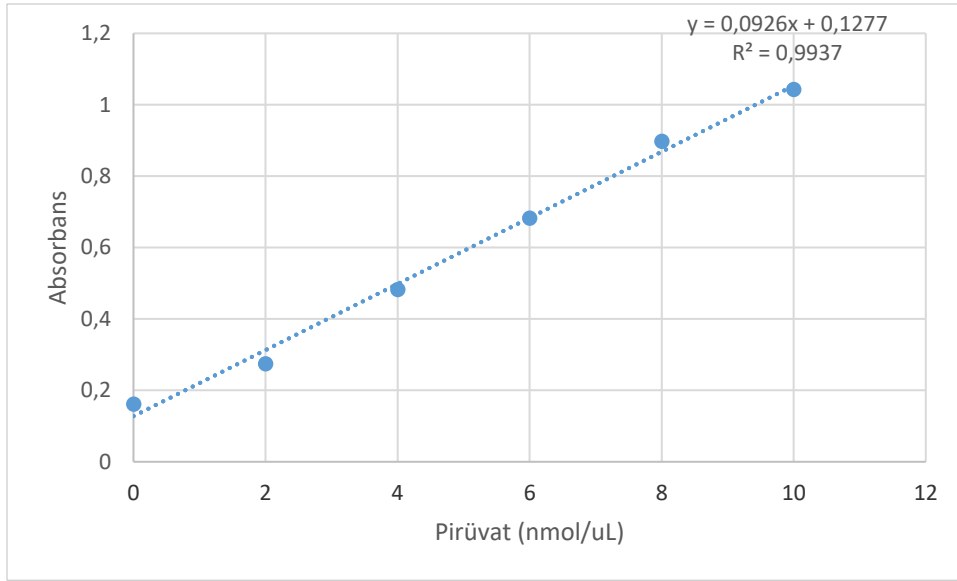
Standart Hazırlığı

10 mikromolarlık Sitrat Standardı 1 nmol /µL olacak şekilde 10 µL Standart 990 µL tampon ekleyerek seyreltilir, iyice karıştırılır. 96 kuyucuklu plağa sırası ile 0, 2, 4, 6, 8, 10 µL eklenir. Test Tamponu ile hacmi 50 µl / kuyucuğa ayarlanır.

Örnek Hazırlığı

Hücreler (10×10^4), dört kat Piruvat Assay Buffer ile hızlı bir şekilde homojenize edildikten sonra hücre kalıntılarını gidermek için 10 dakika boyunca 10,000 g'de santrifüjlendi. Üstte kalan supernatant, 96 well plağa 10-20 µL olacak şekilde eklendi ve assay tamponu ile hacim 50 uL'ye tamamlandı. Üzerine 50uL reaktif (46 µl tampon+ 2 µl Piruvat probe + 2 µl enzim karışımı) eklenerek, 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 570 nm de absorbanslar ölçüldü. Sonuçlar well hücre sayısı başına nmol/uL(mM) olarak verildi.

Piruvat kalibrasyon eğrisi aşağıda görülmektedir.



- **Sitrat Düzeyinin Belirlenmesi**

Sitrik asit ($\text{HOOC-CH}_2\text{-C}(-\text{OH})(-\text{COOH})-\text{CH}_2\text{-COOH}$), mitokondride meydana gelen TCA döngüsünde önemli bir ara maddedir. Glikoliz boyunca oluşmuş asetil koA'nın asetil grubuna oksaloasetat ilavesiyle oluşur. Sitrat, mitokondriden taşınabilir ve yağ asidi sentezi için tekrar asetil KoA'ya dönüştürülebilir. Sitrat, hem yağ asidi sentezi (asetil-koA karboksilaz) hem de glikolizin (föföfruktokinaz) allosterik bir modülatörüdür.

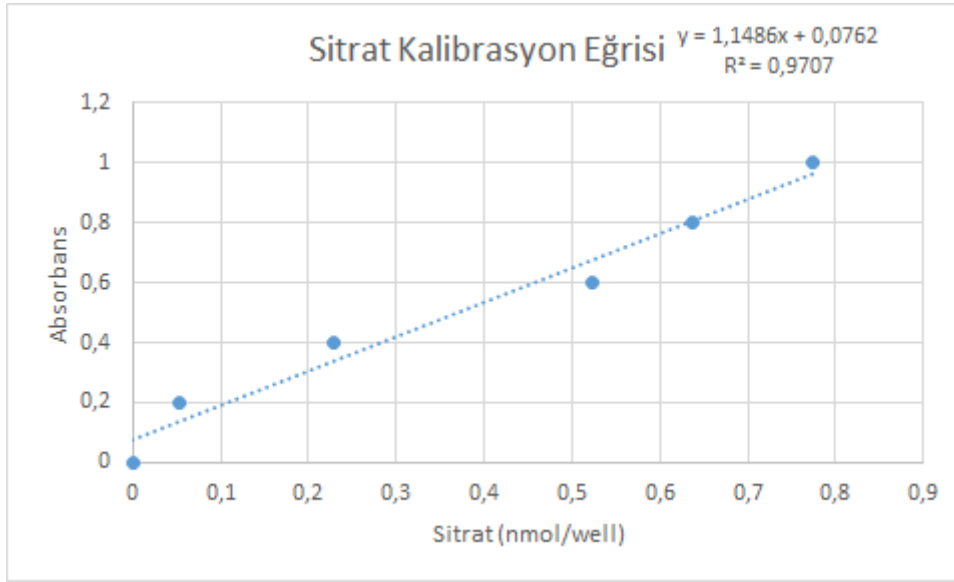
Hücrelerin sitrat düzeyi kolorimetrik ölçüm prensibine dayalı metot ile ölçüldü (Biovision Citrate Assay Kit K655,CA) . Ölçüm esnasında hücre içindeki sitrat enzimatik olarak parçalanarak, oksaloasetat ile piruvat haline dönüştürülür. Oluşan piruvat, neredeyse renksiz olan floresans bir probu yoğun renkli ($\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}$ 'de absorbans veren) bir ürüne dönüştürerek ölçüm yapıldı.

Standart Hazırlığı

10 mikromolarlık Sitrat Standardı 1 nmol /uL olacak şekilde 10 uL Standart 1090 dl dH₂O ekleyerek seyreltilir, iyice karıştırılır. 96 kuyucuklu plağa sırası ile 0, 2, 4, 6, 8, 10 ul eklenir. Test Tamponu ile hacmi 50 µl / kuyucuğa ayarlanır.

Örnek Hazırlığı

Hücreler (10 x 10⁴), 100 ul Citrate Assay Buffer ile hızlı bir şekilde homojenize edildikten sonra hücre kalıntılarını gidermek için 10 dakika boyunca 15,000 g'de santrifüjlendi. Üstte kalan supernatant, 96 well plağa 1-50 ul olacak şekilde eklendi ve assay tamponu ile hacim 50 uL'ye tamamlandı. Üzerine 50uL reaktif (44uL tampon+2uL enzim mix+2ul developer 2uL sitrat probe) eklenerek, 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 570 nm de absorbanslar ölçüldü. Sonuçlar well hücre sayısı başına nmol/uL(mM) olarak verildi. Sitrat kitinin ölçüm aralığı 0,1- 10 nmol (~ 2µM-10 mM)'dır. Sitrat kalibrasyon eğrisi aşağıda görülmektedir.



3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

	Ocak 2018 – Ocak 2019	şubat 2018 – Mart 2018	Nisan 2018 – Haziran 2018	Haziran 2018 – Eylöl 2018	Eylöl 2018 – Ekim 2018	Kasım 2018 – Aralık 2018	Aralık 2018 – Ocak 2019
Kök Hücre İzolasyonu							
Kök Hücre Karakterizasyonu							
Nöral Farklılaşma							
Nöral Karakterizasyon							
Metabolit Analizleri							
Literatür Okuma							
Tez Yazımı							

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma sonuçları analizleri SPSS 20.0 programı kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata biçiminde verildi. Gruplar arası karşılaştırma yapmak için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi tüm değerlendirmelerde $p < 0.05$ olarak kabul edildi

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmada insan göbek kordonu wharton jölesinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin sadece 5. Pasaja kadar kullanılması kısıtlılığı nedeni ile analiz tekrar sayıları sınırlı kalmıştır. Nöronal farklılaşma süreci erken nöronal dönemi içeren ilk 7 gün boyunca incelenebilmiştir. Çalışmamızda sadece akt inhibitörü kullanılmış, AMP kinaz aktivasyonu ve mTOR yolağı ile ilişkisi ölçülmemiştir. Çalışmamızda sadece akt'ın asetil koA vb. glukoz metabolizma ürünleri üzerine etkisi gösterilmiştir.

3.10. Etik Kurul Onayı

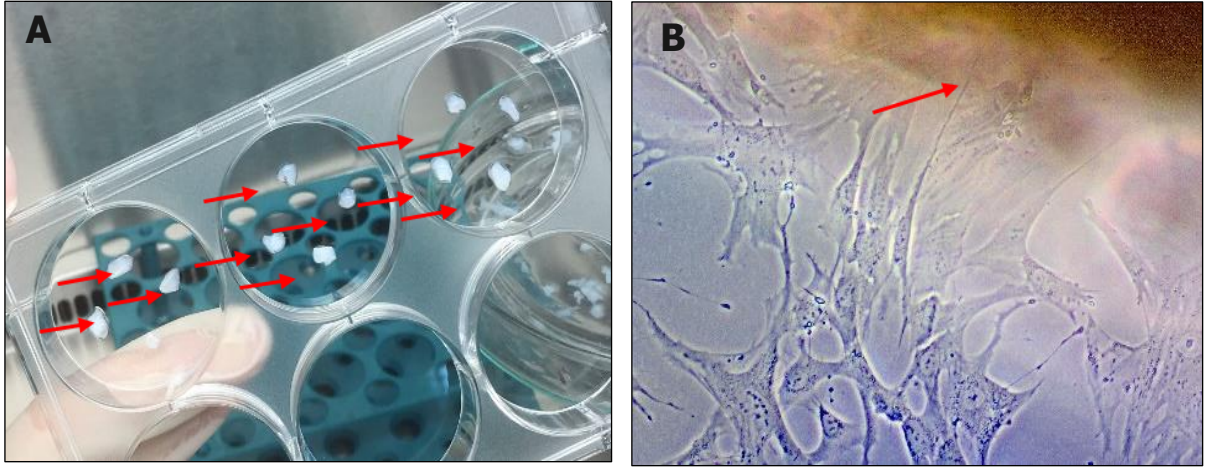
Çalışmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik kurulu tarafından 3266-GOA protokol ve 2017-12-30 karar numarasıyla uygun bulunmuştur.



4. BULGULAR

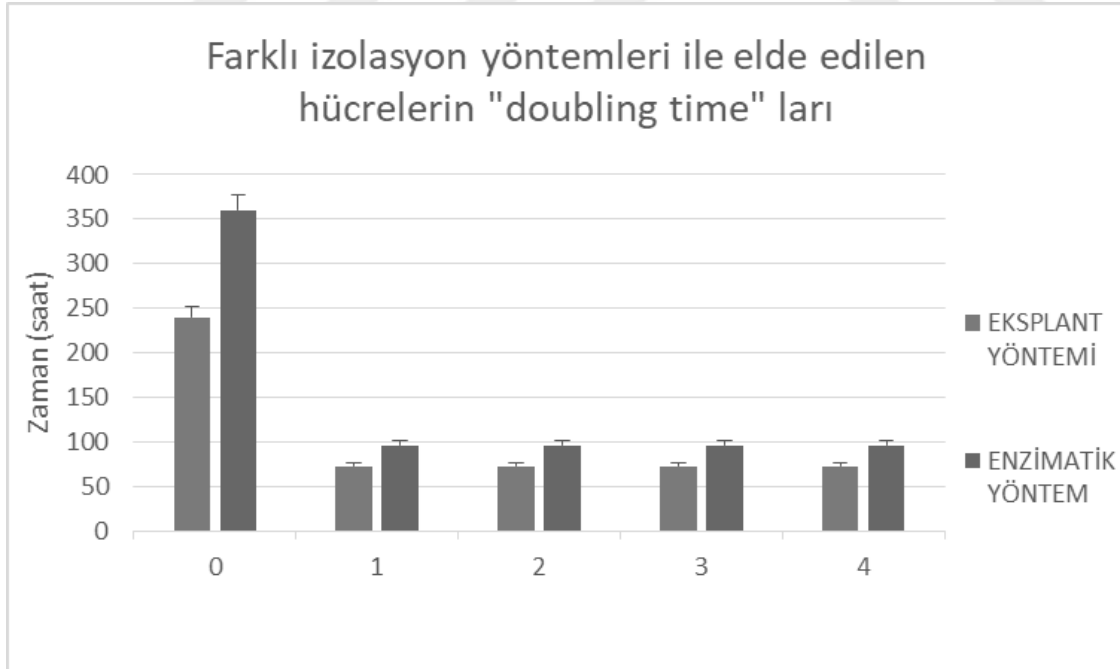
4.1. WJ-MKH'lerin İzolasyon Süreleri ve Proliferasyon Hızları

Çalışmamızda materyal ve metot bölümünde detayları anlatıldığı şekilde eksplant yöntemi ve enzimatik yöntem ile kök hücre izolasyonu gerçekleştirildi ve eksplant yöntemi optimize edildi. Eksplant yönteminde enzimatik yöntemle göre daha yüksek proliferasyon hızı elde edildi. Doubling time eksplant yöntemi ile elde edilen hücrelerde ~3 gün iken, enzimatik yöntem ile elde edilen hücrelerde ~5 günü buldu. Eksplant yöntemi ile yöntemi ile enzimatik yöntem ile kök hücre izolasyonu gerçekleştirildi ve eksplant yöntemi optimize edildi. Eksplant yönteminde enzimatik yöntemle göre daha yüksek proliferasyon hızı elde edildi. Doubling time eksplant yöntemi ile elde edilen hücrelerde ~ 1.250 hücre/saat proliferasyon hızı belirlendi. Eksplant yönteminde enzimatik yöntemle göre daha yüksek proliferasyon hızı elde edildi. Doubling time eksplant yöntemi ile elde edilen hücrelerde ~830 /saat hücre sayısı değerindeydi. Eksplant yöntemi ile kök hücrelerin en az 6 en çok 30 günlük inkübasyon sonucunda dokudan dışarı çıkmaya başladıkları gözlemlendi. Kültür kaplarına ekildikten sonra hücreler ortalama 10.günde dokudan dışarıya göç etmeye başlayıp, 2 hafta sonunda pasajlanabilir hücre sayısı ve yoğunluğa ulaşıldı (**Şekil 5**). 30 gün sonunda hücre vermeyen eksplantların inkübasyonu sonlandırıldı. Bulundukları alanı doldurarak hücre yoğunluğunun arttığı gözlenen eksplantlar yeni 6 kuyucuklu kaplara alınıp komplet ortam içinde inkübasyonlarına devam edildi. Eski hücre kültürü kabında bulunan hücreler ise stok olarak donduruldu veya pasajlanarak daha fazla hücre elde edilmesi sağlandı. Eksplant yöntemi ile wharton jölesinden çıkıp, yaklaşık ortalama $300 \times 10^3/m^2$ ulaşma süresi ortalama ~10 gün olarak bulundu. Eksplant ve enzimatik yöntemden elde edilen hücrelerin iki katına çıkma süreleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Genel olarak enzimatik yöntem ile elde edilen hücrelerin 25 cm² kültür kaplarında konfluent olma süreleri daha yüksek olmakla birlikte, 1-4. Pasaja kadar aralarında anlamlı bir fark gözlenmedi (**Şekil 6**; $p>0.05$, $n=17$). Bu nedenlerle asetil ko A ilişkili metabolit değişimleri için gerekli deneyler eksplant yöntemi ile elde edilen kök hücrelerde gerçekleştirildi. Elde edilen kök hücrelerin ışık mikroskopik görüntüleri **Şekil 7'de** görülebilir.

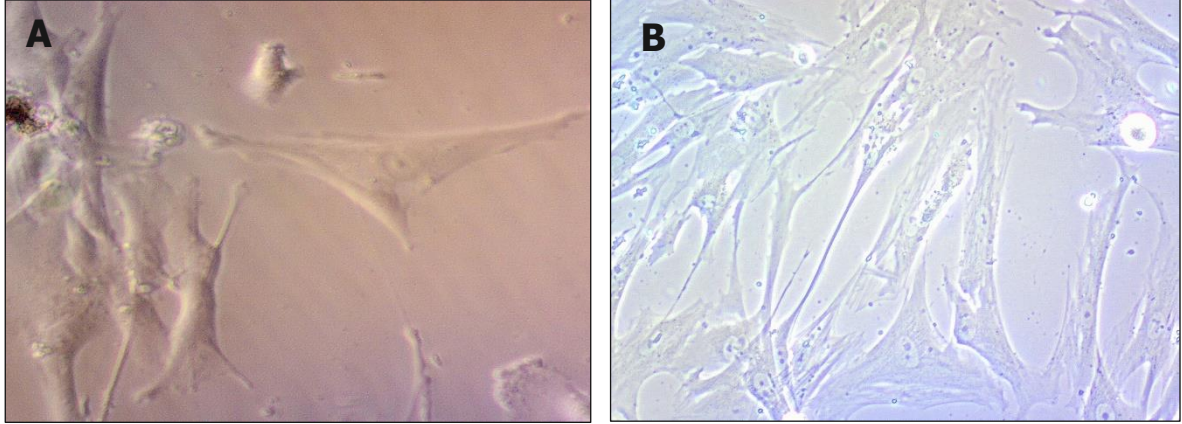


Şekil 5: Kök hücrelerin elde edilmesi. (A) Hücre kültürü kabına tutudurulan eksplantlar. (B) Eksplanttan (ok ile işaretli) dışarı göç eden hücreler

4.1.1.Eksplant Yöntemi İle Elde Edilen WJ-MKH'lerin Proliferasyon Hızları



Şekil 6: Eksplant ve enzimatik yöntem ile elde edilen WJMKH lerin "doubling time" ları Sonuçlar ort±SD olarak verilmiştir. Eksplant ve enzimatik yöntemden elde edilen hücrelerin iki katına çıkma süreleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Genel olarak enzimatik yöntem ile elde edilen hücrelerin 25 cm² kültür kaplarında konfluent olma süreleri daha yüksek olmakla birlikte, 1-4. Pasaja kadar aralarında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$; $n=17$)

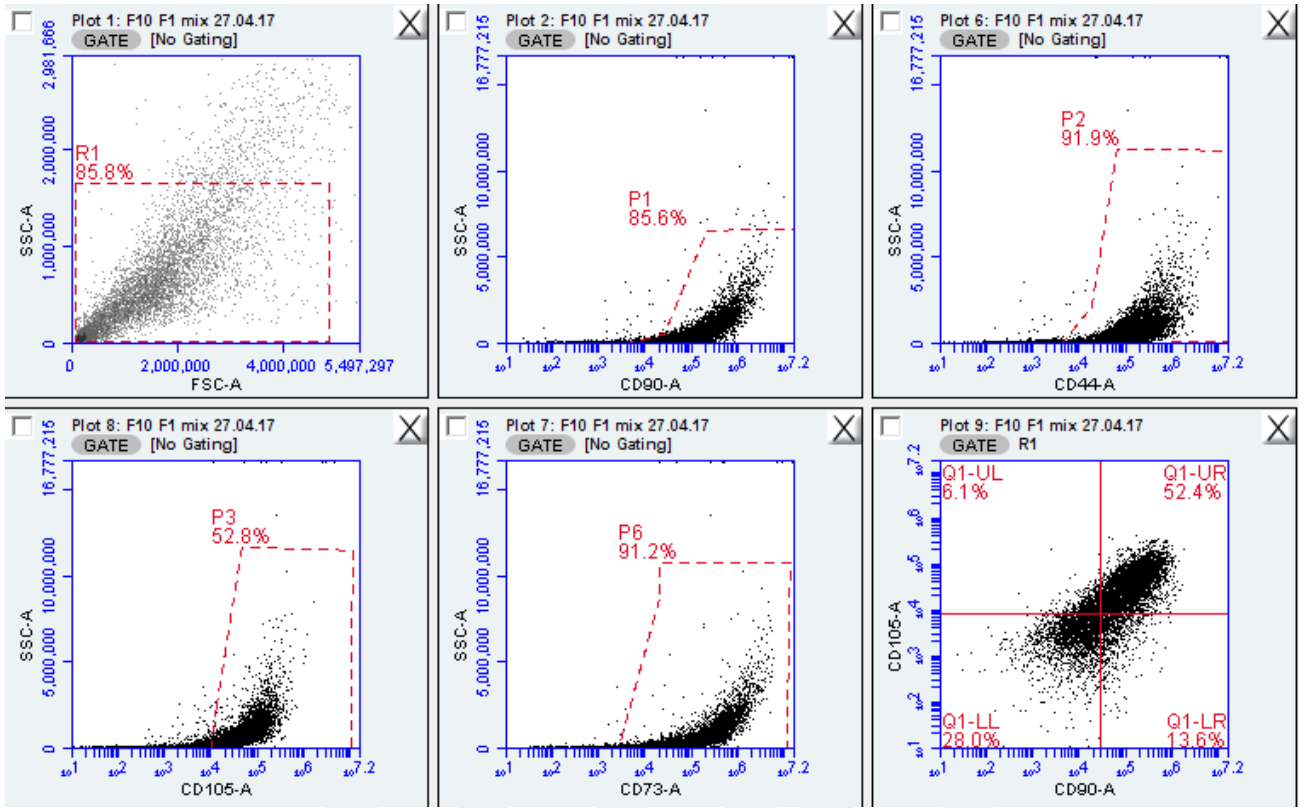


Şekil 7: Eksplant yöntemi ile elde edilen WJMKH'lerinin ters faz ışık mikroskopik görüntüsü (A) 20x büyütme. (B) 10x büyütme

4.2. WJ-MKH Karakterizasyonu

4.2.1. Akış Sitometri Sonuçları

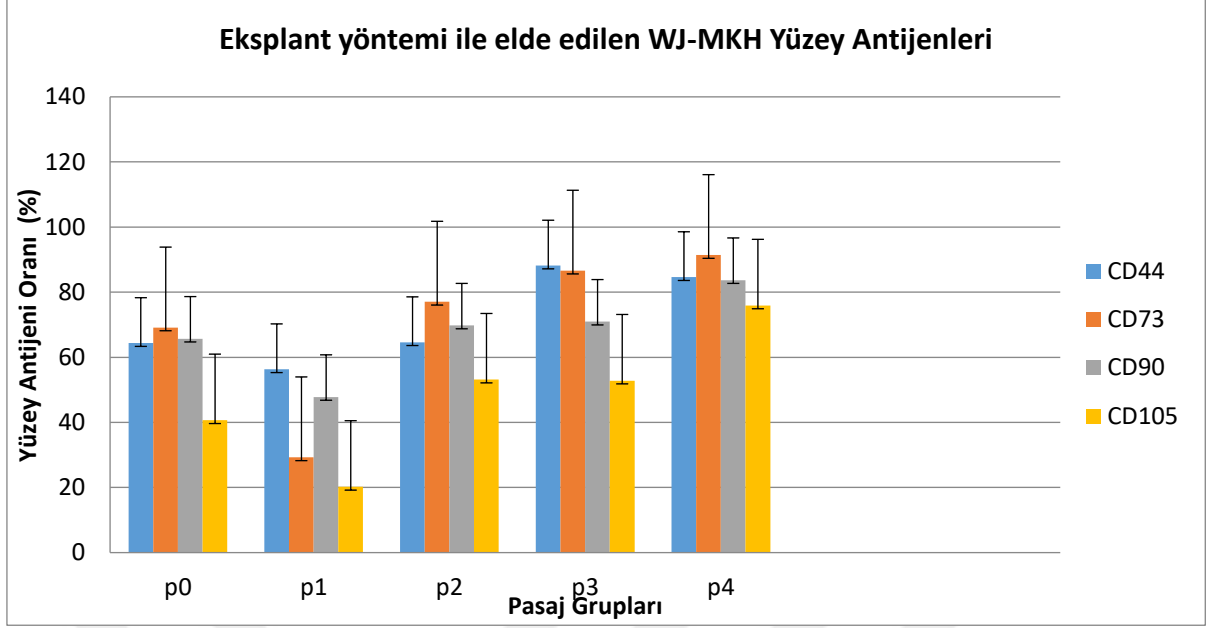
MKH Karakterizasyonu için izole edilen WJ-MKH'leri ile farklılaşma öncesinde eksprese ettikleri antijenlerin belirlenmesi için akış sitometre deneyi yapıldı. Deney sonucunda elde edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre olduklarını doğrular nitelikte olacak şekilde yüzey antijenlerinden CD 90 %86 , CD105 %56, CD73 %91 ,CD44 %92 oranında eksprese ettikleri bulundu (Bakınız **Şekil 8**).



Şekil 8: Örnek bir flow sitometri verisi. Farklılaşmamış bir WJMKH örneğinde hücrelerde CD 90; %86, CD105; %56, CD73; %91 ve CD44; %92 oranında eksprese edilmektedir.

WJ-MKH'lerde kültürde hücre yoğunluğu %90'a ulaştığında, CD90, CD73 ve C105 protein ekspresyonlarının önemli ölçüde azaldığı, daha sonra düşük yoğunluklu pasajlama yapılmasının bu durumu geri döndürmediği gözlemlendi. WJ-MKH'lerde pasaj 4'ün üzerindeki pasajlarda CD90, CD73 ve C105 protein ekspresyonları önemli ölçüde azaldığı belirlendi. Bu nedenlerle pasaj 4'ün üzerindeki hücreler çalışmaya alınmadı.

Hücrelerde CD 90, CD105, CD73, CD44 yüzey antijen ekspresyonlarının varlığının 4. Pasaja kadar devam ettiği gösterildi (**Şekil 9**)

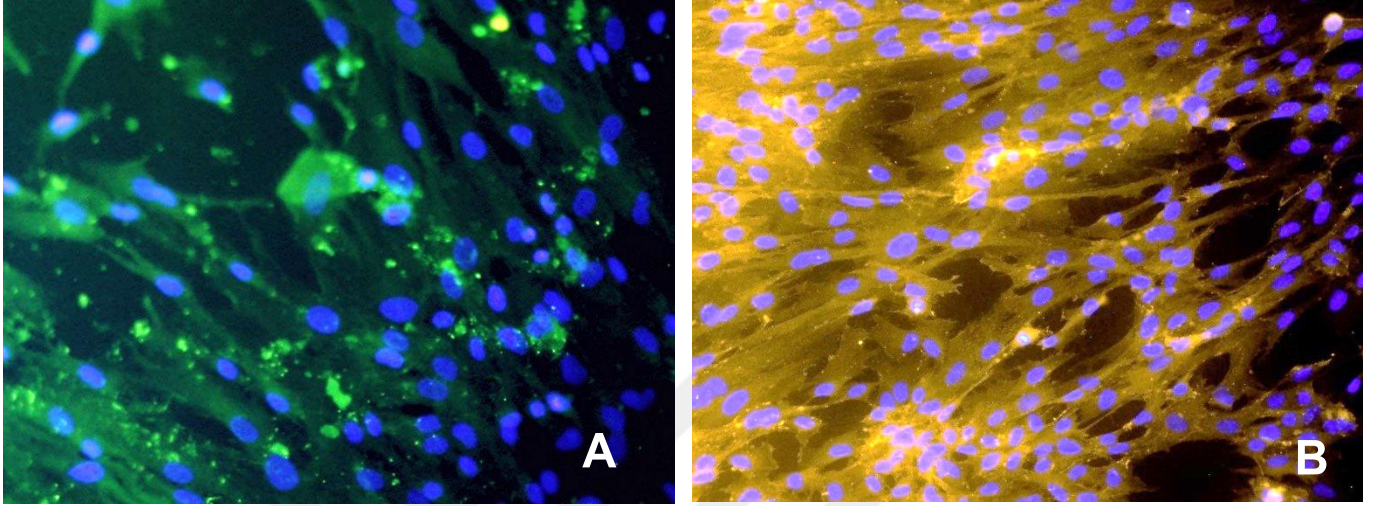


Şekil 9: Eksplant yöntemiyle izole edilen ve aynı kültür koşullarında idame ettirilen WJ-MKH'lerinin CD 44, CD 73, CD 90 ve CD 105 yüzey antijenlerinin 4. pasaja kadar değişimleri (%). Sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SD}$ olarak ifade edilmiştir ($n=3$).

WJ-MKH'lerde farklılaşma ortamı ile on günlük bir inkübasyon sonucunda CD90, CD73 ve C105 protein ekspresyonlarının önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi. Bu azalmanın CD105 ekspresyonunun %1'in altına inmesine yol açtığı belirlendi.

4.2.2. WJ-MKH'lerinin İmmünfloresans Mikroskop ile Değerlendirilmesi

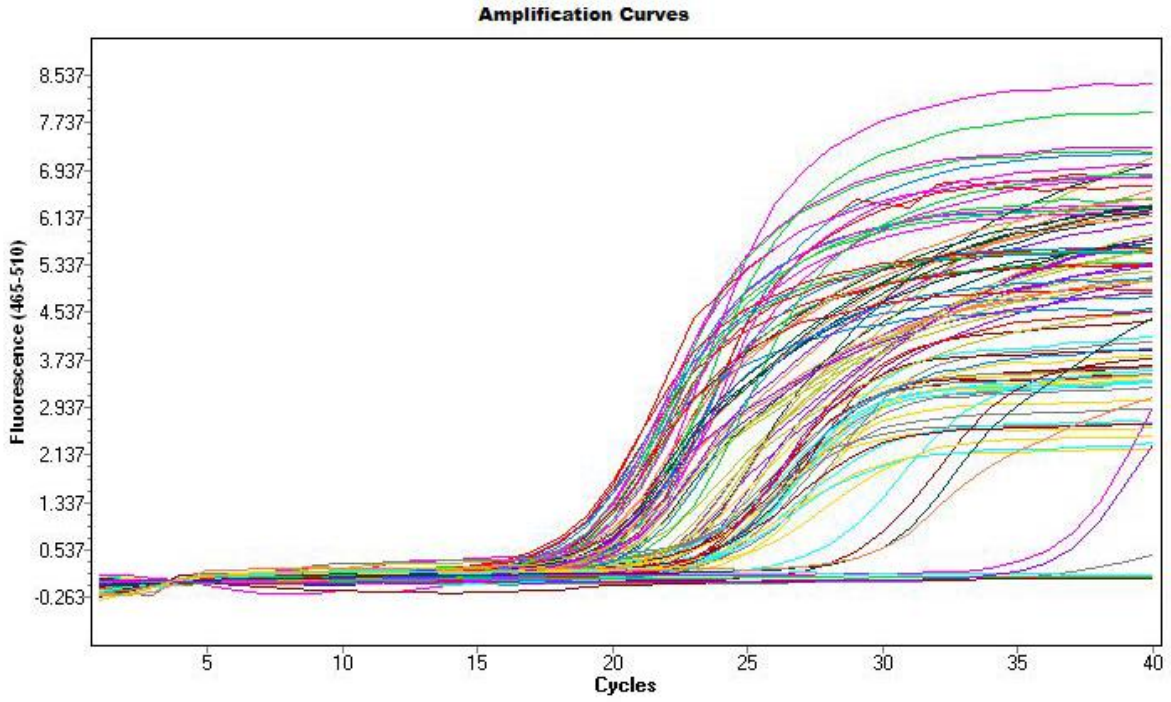
İzole edilen kök hücrelerin, mezenkimal kök hücre belirteci olan CD90 ve CD44 antikorlarını eksprese ettikleri immunfloresans yöntem ile gösterildi (Şekil 10).



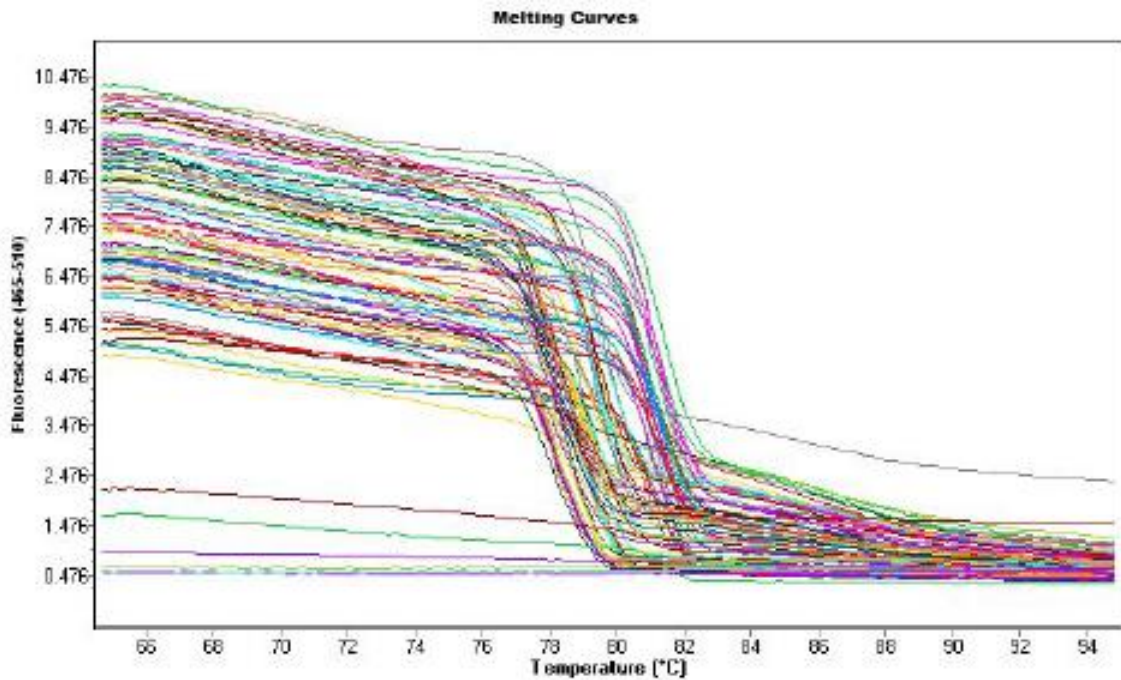
Şekil 10: A - CD90 işaretli kök hücreler. B. CD44 işaretli kök hücreler. (20X, pasaj 2, A deneyinde FITC işaretli, B deneyinde; Fikoeritrin işaretli antikorlar kullanılmıştır)

4.2.3.WJ-MKH'lerinin PZR ile Değerlendirilmesi

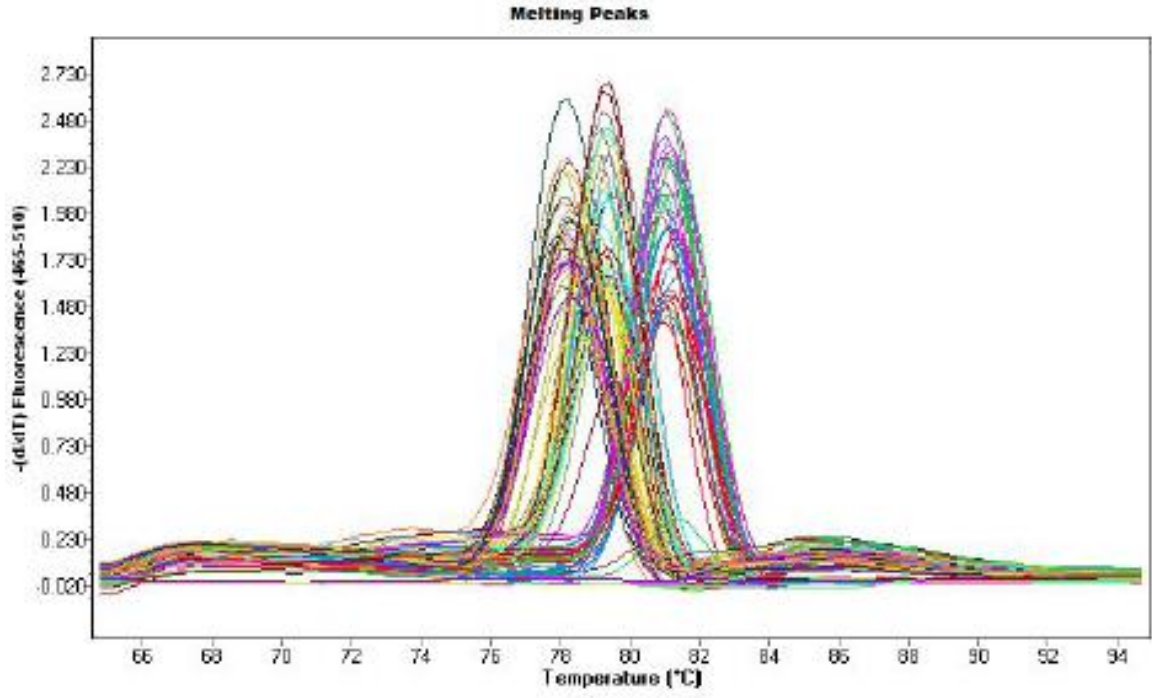
Gen ekspresyonları, insan gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) housekeeping genine normalize edildi. Kök hücre fenotipini araştırmak için CD90, ABCG2 gen ekspresyonları incelendi [34]. ABCG2 geni PZR deneyinde örneklerden bir reaksiyon ürünü elde edilemedi. CD90 genine ait PZR optimizasyonunun yer aldığı RT-PZR deneyleri Şekil 12'de yer almaktadır.



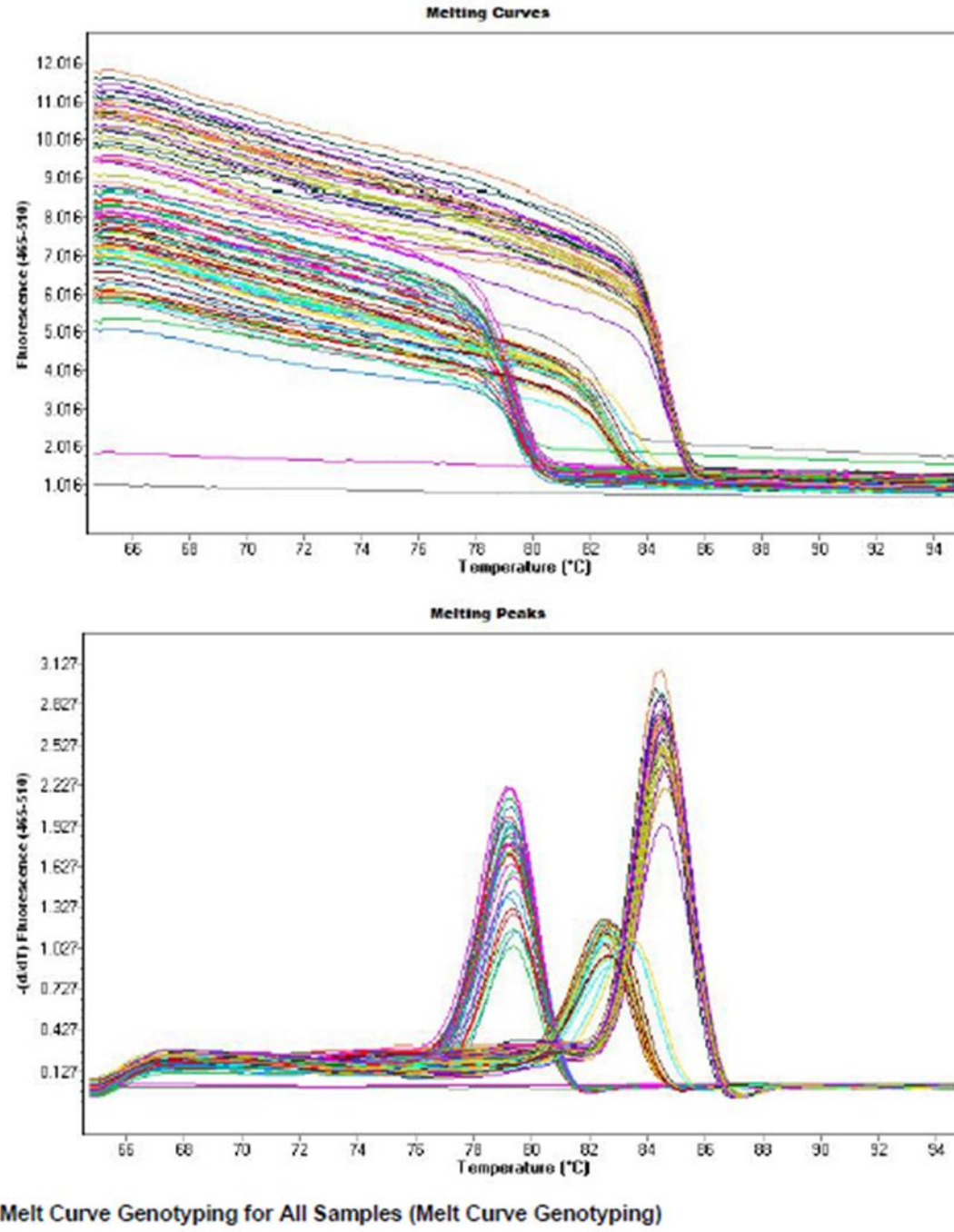
Şekil 11: Çeşitli cDNA örnekleri ile üç housekeeping gen; (GAPDH), 14-3-3 protein zeta/delta (YWHAZ) ve Hipoksantin phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) ile yapılan Real Time PZR deneyi.



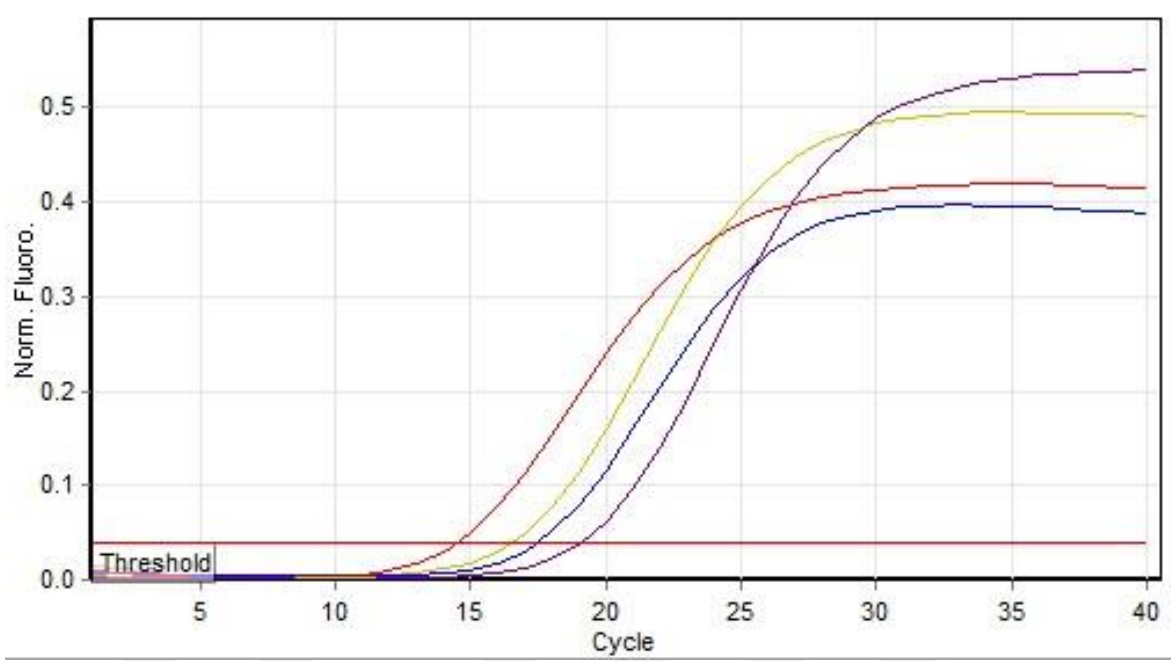
Şekil 12: Çeşitli cDNA örnekleri ile üç housekeeping gen; (GAPDH), 14-3-3 protein zeta/delta (YWHAZ) ve Hipoksantin phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) ile yapılan Real Time PZR deneyi. melting curve analizi



Şekil 13: Çeşitli cDNA örnekleri ile üç housekeeping gen; (GAPDH), 14-3-3 protein zeta/delta (YWHAZ) ve Hipoksantin phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) ile yapılan Real Time PZR deneyi. Her ürünün kendine özgü pikinin çıktığı görülmektedir.



Şekil 14: Kök hücrelerde eksprese olan CD 90 ve CD 105, ve farklılaşmış hücrelerde eksprese olması beklenen vWF genlerinin ekspresyon çalışmaları görülmektedir. Üstte melting curve analizi ve altta her ürünün kendine özgü pikinin çıktığı görülmektedir.



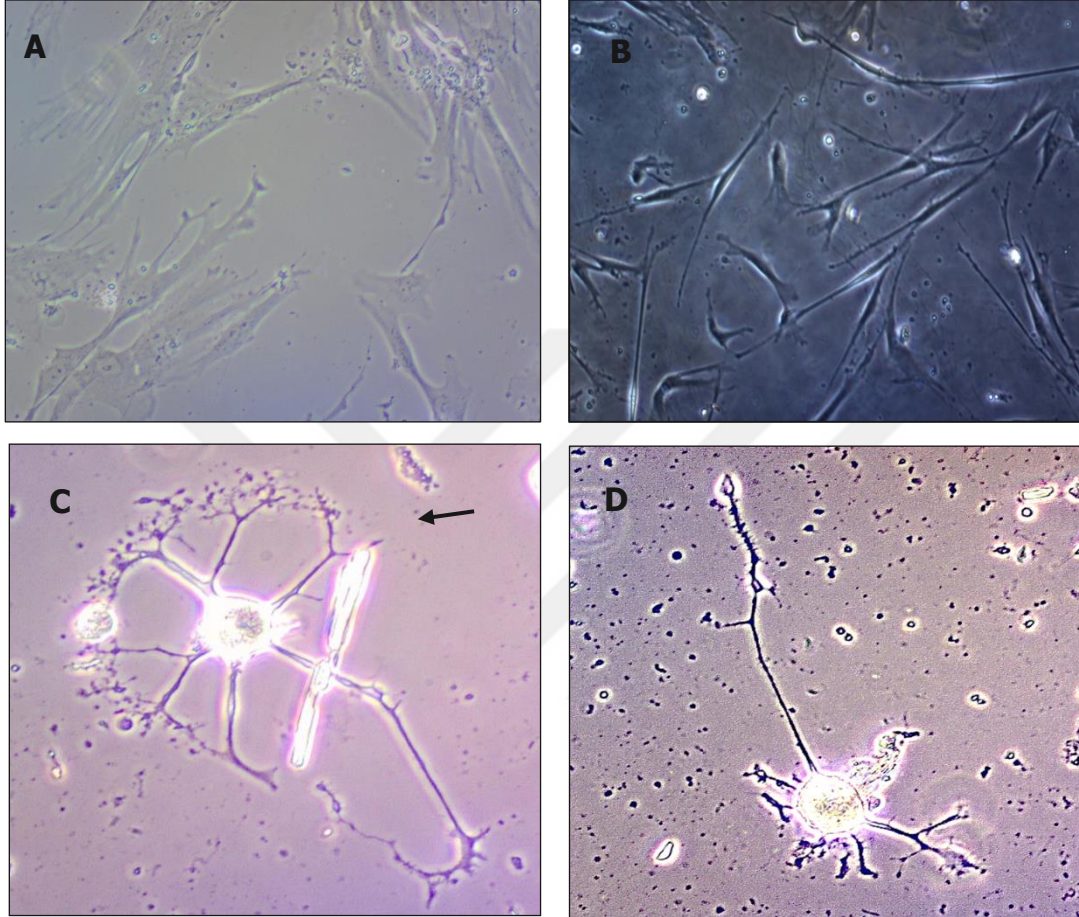
No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment
1	Red	18Ap5 cDNA sının --> GAPDH primerli ekspresyon düzeyi	Unknown	14.54	
2	Yellow	18Ap5 cDNA sının --> CD44 primerli ekspresyon düzeyi	Unknown	16.61	
3	Blue	18Ap5 cDNA sının --> CD90 primerli ekspresyon düzeyi	Unknown	17.53	
4	Purple	18Ap5 cDNA sının --> CD105 primerli ekspresyon düzeyi	Unknown	19.17	
5	Pink	cDNA yerine su içeren --> Negatif kontrol	Unknown		NEG (NTC)

Şekil 15: CD44, CD90, CD105 Primerleri ile gerçekleştirilen Realtime PCR sonucu

WJ-MKH'lerde CD90 ve C105 gen ekspresyonlarının Q-PCR deneyi ile farklılaşma ortamı eklendikten sonra on günlük bir inkübasyon sonucunda önemli ölçüde azaldığı belirlendi.

4.3. Nöronal Farklılaşma Deney Sonuçları

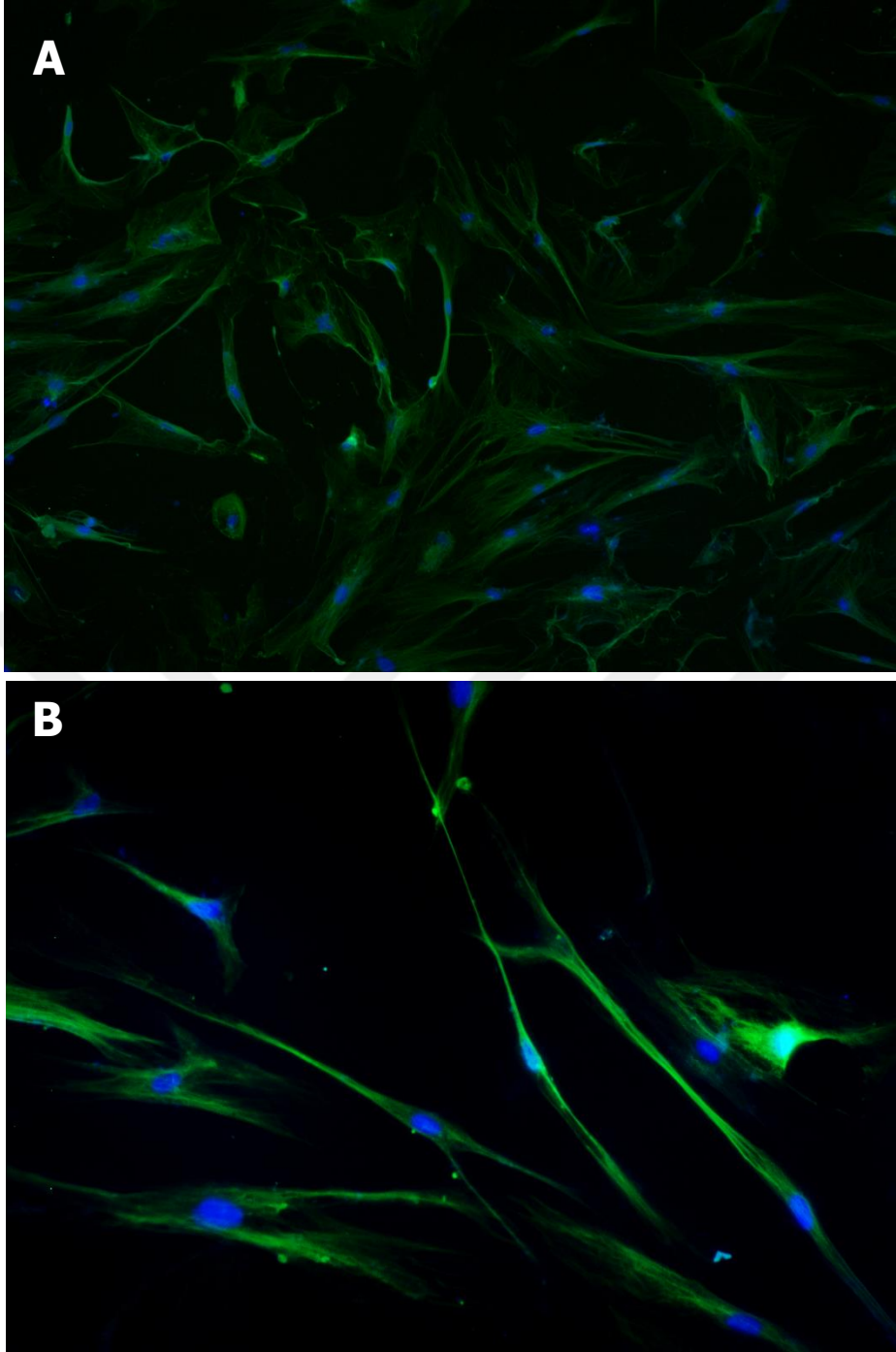
Nöronal farklılaşma protokolü uygulanan hücrelerin ışık mikroskopunda oluşan fenotipik değişiklikleri takip edildi. 14. günün sonunda akson ve dendrit benzeri uzantıların varlığı net olarak gözlemlendi (Şekil 17).



Şekil 16: Forskolin uygulaması sonrası hücrelerin faz kontrast ışık mikroskop görüntüleri (A) Kontrol; (B) 3.Gün; (C ve D) 14. Gün (20X) .

4.4. Nöral Farklılaşmanın İmmüno Floresans Yöntem İle Gösterilmesi

Nöronal farklılaşma protokolü uygulanan hücrelerin, indüksiyonun 7. gününde kök hücrelerde ekspresyonu gösterilemeyen nöron yüzey antijenlerinden β 3-Tubulin eksprese ettikleri immüno floresans mikroskopik görüntüler ile belirlendi (Şekil 15). Nestin pozitifliği gösterilemedi.



Şekil 17: Farklılaşmış hücrelerin nöral bir markır olan $\beta 3$ -Tubulin kullanılarak alınmış immünfloresans görüntüsü. (A) 10x Büyütme. (B) 40x Büyütme

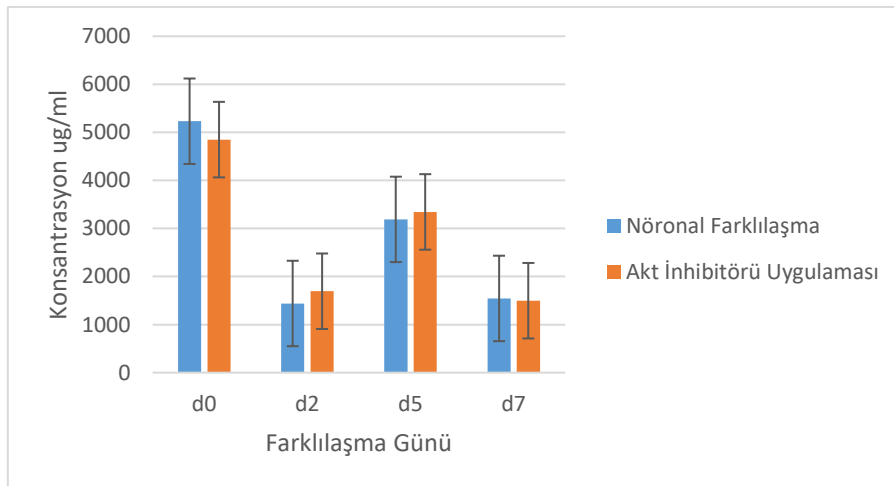
4.5. Nöral Farklılaşan Hücrelerde Protein Tayini

Farklılaşma sürecinde metabolit değişimlerini yorumlayabilmek için toplanan örneklerin toplam protein miktarları BCA Protein tayin kiti (Thermo Sci, USA) kullanılarak belirlendi (Şekil 19). Sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir. Bazal WJ-MKH değerleri ile 7 gün boyunca NF indüksiyonu uygulandıktan sonra elde edilen total protein değerleri görülmektedir. Sonuçlar ortalama $\pm \text{SEM}$ olarak verilmiştir (Tablo 3). (n=3, WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, NF: Nöronal farklılaşma indüksiyonu, * Kontrol grubuna göre $p < 0.05$)

Tablo 3: Total protein miktarları. Normal koşullarda farklılaşma (A), Akt inhibisyonu sonrası farklılaşma (B).

A	Total Protein (ug/ml)			
	N		Mean	
	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error
WJMKH	2	5231,5000	307,50000	
NFd2	2	1439,0000	20,00000	
NFd5	2	3189,0000	65,00000	
NFd7	2	1544,0000	5,00000	

B	Akt (-) Total Protein (ug/ml)			
	N		Mean	
	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error
AktWJMKH	2	4849,0000	55,00000	
AktNFd2	2	1694,0000	35,00000	
AktNFd5	2	3344,0000	25,00000	
AktNFd7	2	1496,5000	27,50000	

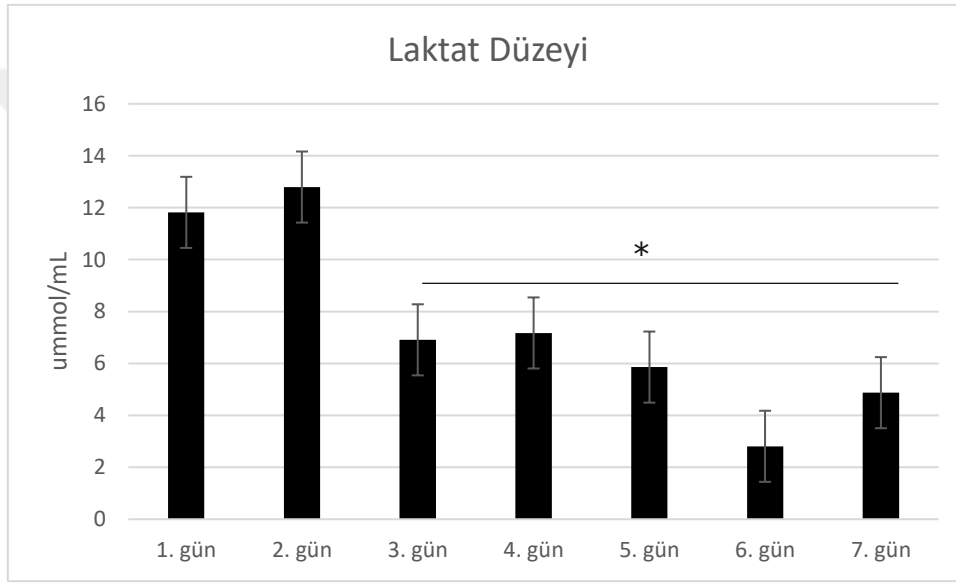


Şekil 18: Farklılaşma sürecinde toplam protein miktarlarının değişimi.

4.6. Nöral Farklılaşmış Hücrelerde Laktat Üretimi

WJ-MKH'lerde enerji metabolizması için hipotezimiz, bu hücrelerde glikolizin ağırlıklı olması, mitokondriyel oksidatif fosforilasyonun daha az etkin olmasıdır. Buna bağlı olarak kök hücrelerde glikoz tüketimi ve laktat üretiminin fazla olması beklenmektedir. Bunu incelemek üzere, WJ-MKH'lerde farklılaşma öncesi ve sonrası alınan örneklerde hücre içi ve ortamda laktat düzeyleri ölçülmüştür.

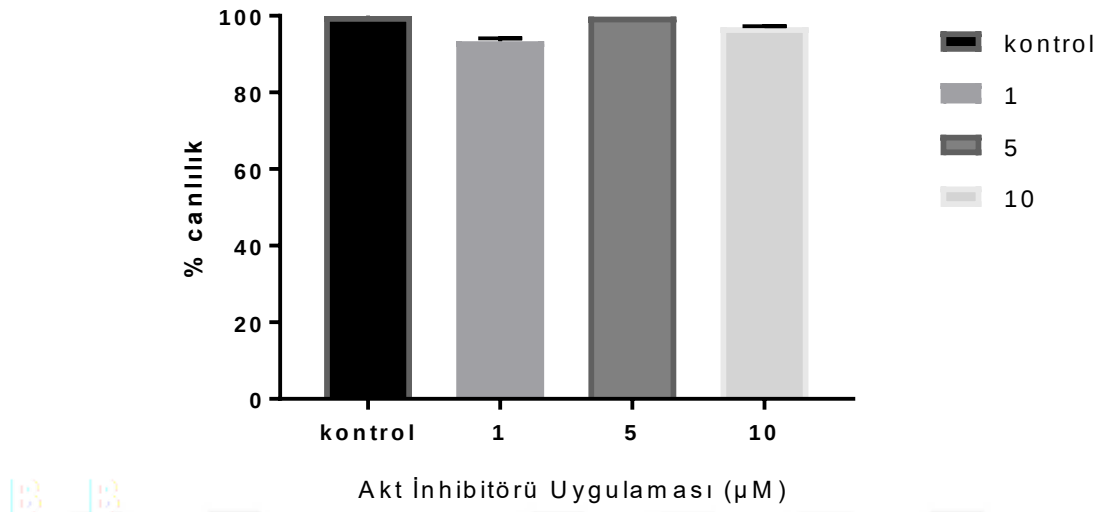
In vitro laktat üretiminin farklılaşma sürecinin 3. gününden itibaren istatistiksel anlamlı olarak azaldığı gösterildi (Şekil 20, $p < 0.05$).



Şekil 19: Nöronal indüksiyon sonrası WJMKH 'lerin laktat düzey değişimleri. Sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir. (* $p < 0.05$)

4.7. Canlılık Testi

Akt inhibitörü uygulamasının hücre canlılığına olan etkisini test etmek için farklı konsantrasyonlarda (1,5 ve 10 μM düzeyde) 3 saatlik uygulanmasının hücre canlılığını anlamlı olarak etkilemediği gösterildi (Şekil 21).



Şekil 20: Akt inhibitörünün hücre canlılığına etkisi.

Sonuçlar kontrol grubuna göre (0. Gün) WJ-MKH MTT absorbansına oranlanarak verilmiştir.

4.8. Farklılaşma Sürecinde Metabolit Değişimleri

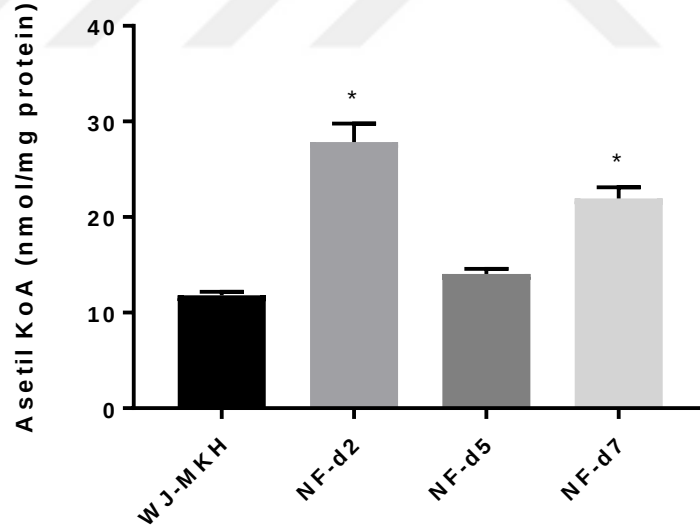
4.8.1. Asetil-KoA Düzeyi

2×10^5 Hücre başına asetil KoA düzeylerinin ortalamaları ve SEM 'leri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4: WJ-MKH lerin nöronal farklılaşma sürecindeki (a) ve Akt inhibisyonu varlığındaki (b) Asetil KoA değerleri (ort± SEM)

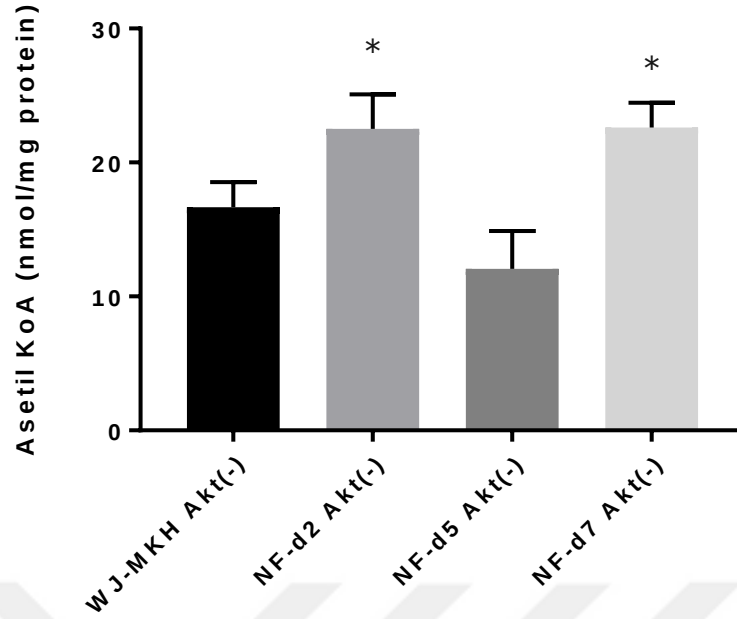
Asetil KoA Düzeyi (nmol/ml)			
	N	Mean	
	Statistic	Statistic	Std. Error
WJMKH	3	61,7505	1,97440
NFd2	3	40,0707	2,79424
NFd5	3	44,8003	1,69568
NFd7	3	33,8867	1,81824

Akt (-) Asetil KoA Düzeyi (nmol/ml)			
	N	Mean	
	Statistic	Statistic	Std. Error
AktWJMKH	3	80,8519	9,02852
AktNFd2	3	38,1484	4,35257
AktNFd5	3	40,3047	9,51874
AktNFd7	3	33,8358	2,75728



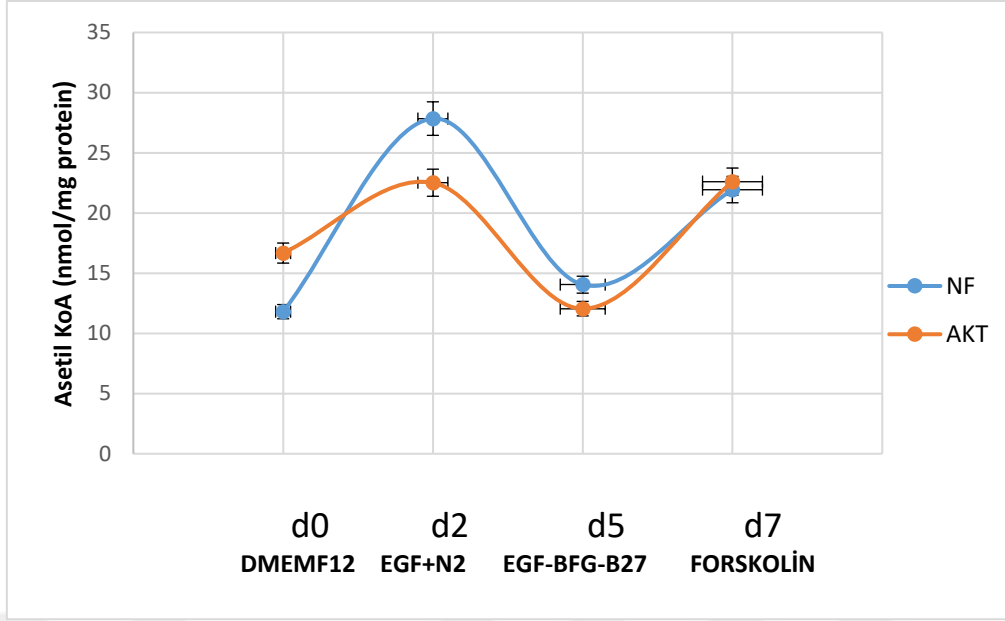
Şekil 21: Nöronal farklılaşma sürecinde Asetil KoA düzeyleri

Tablo 4'te Bazal WJ-MKH değerleri ile 7 gün boyunca NF indüksiyonu uygulandıktan sonra elde edilen hücresel asetil koA değerleri görülmektedir. Sonuçlar ortalama±SEM olarak verilmiştir (Şekil 22). (n=3, WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, NF: Nöronal farklılaşma indüksiyonu, * Kontrol grubuna göre p<0.05)



Şekil 22: Akt inhibitörü uygulaması ile birlikte nöronal farklılaşma sürecinde Asetil KoA değişimi.

Şekil 23’de Akt yolağının baskılanması sonrası bazal WJ-MKH değerleri ile 7 gün boyunca NF indüksiyonu uygulandıktan sonra elde edilen hücresel asetil koA değerleri görülmektedir (Şekil 21). Sonuçlar ortalama±SEM olarak verilmiştir (Şekil 20). (n=3, WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, NF: Nöronal farklılaşma indüksiyonu, * p<0.05)



Şekil 23: Normal şartlarda ve Akt inhibisyonu sonrasında nöronal farklılaşma sürecinde Asetil KoA değişimi.

4.7.2.Sitrat Düzeyi

2x 10⁵ Hücre başına sitrat düzeylerinin ortalamaları ve SEM 'leri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5: WJ-MKH lerin nöronal farklılaşma sürecindeki (a) ve Akt inhibisyonu varlığındaki (b) Sitrat değerleri (ort± SEM) olarak verilmiştir.

Sitrat Düzeyi (nmol/ml)

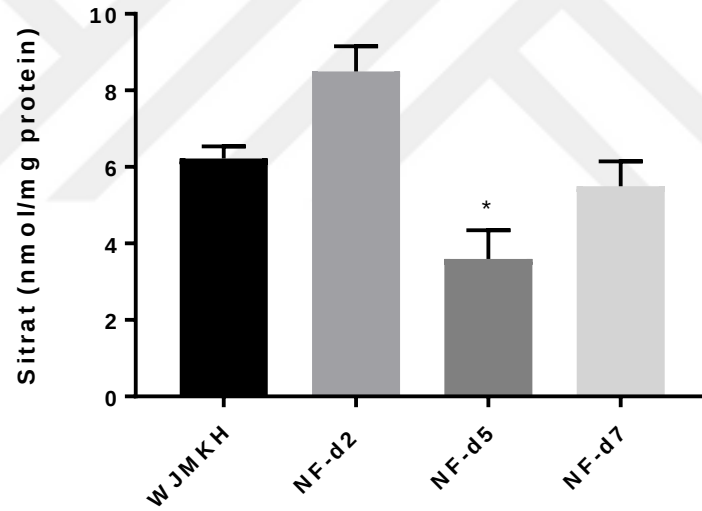
A

	N	Mean	
	Statistic	Statistic	Std. Error
WJMKH	3	33,2381	,45632
NFd2	3	12,3664	,19101
NFd5	3	12,5463	,69157
NFd7	3	8,6169	,04185

Akt (-)Sitrat Düzeyi (nmol/ml)

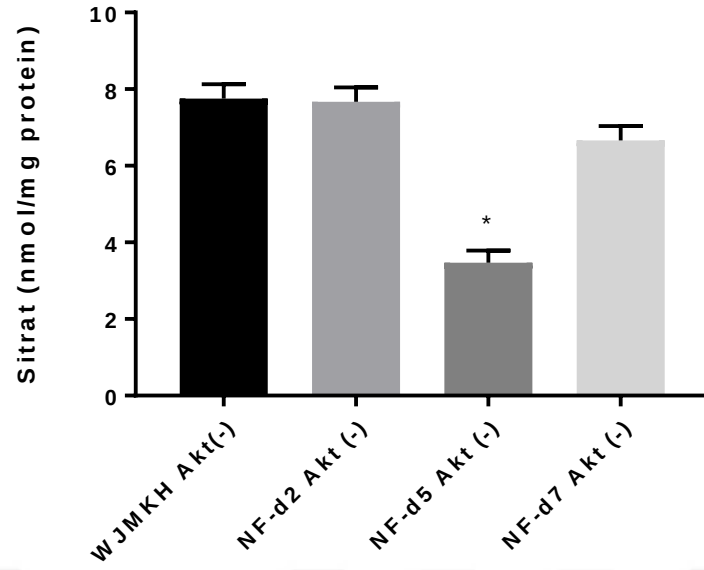
B

	N	Mean	
	Statistic	Statistic	Std. Error
AktWJMKH	3	37,6435	,58363
AktNFd2	3	13,0513	,44215
AktNFd5	3	11,6002	,21748
AktNFd7	3	9,9983	,24148

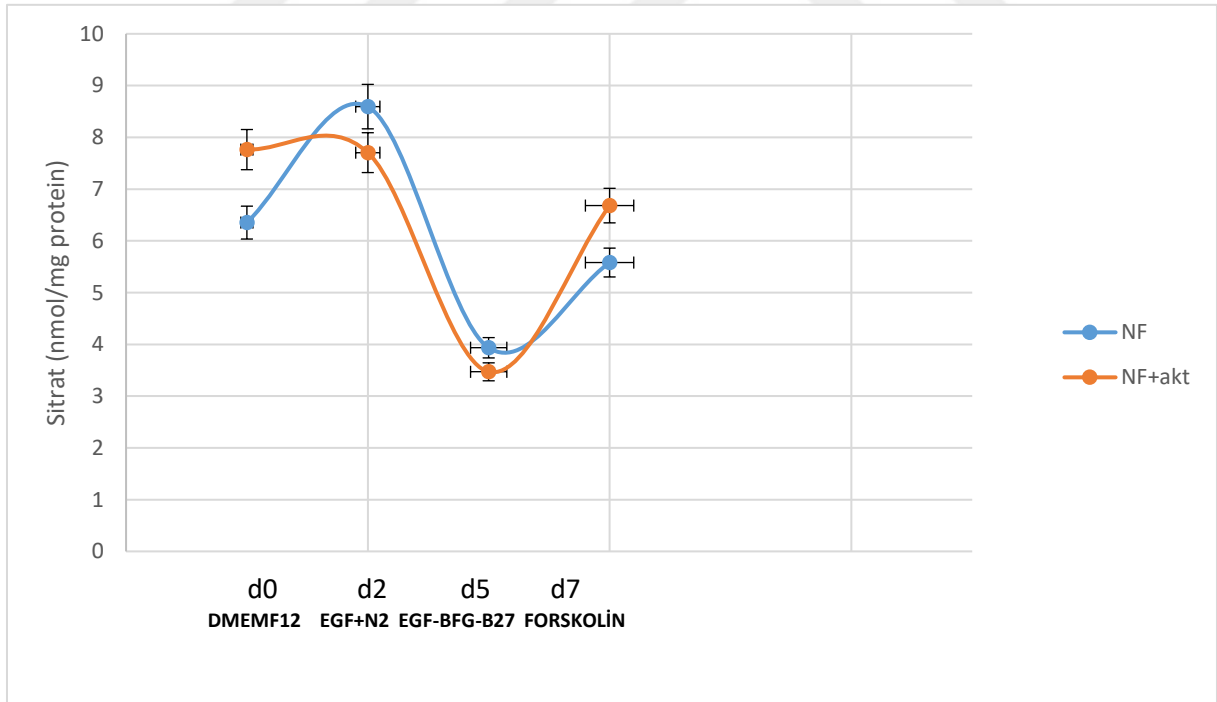


Şekil 24: Nöronal farklılaşma sürecinde sitrat düzeyi değişimi.

Sonuçlar ortalama±SEM olarak verilmiştir. (n=3, WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, NF: Nöronal farklılaşma indüksiyonu, * Kontrol grubuna göre p<0.05)



Şekil 25: Akt inhibitörü uygulaması ile birlikte nöronal farklılaşma sürecinde Sitrat değişimi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. (n=3, WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, NF: Nöronal farklılaşma indüksiyonu, * Kontrol grubuna göre $p<0.05$)



Şekil 26: Normal şartlarda ve Akt inhibisyonu sonrasında nöronal farklılaşma sonucu Sitrat değişimi.

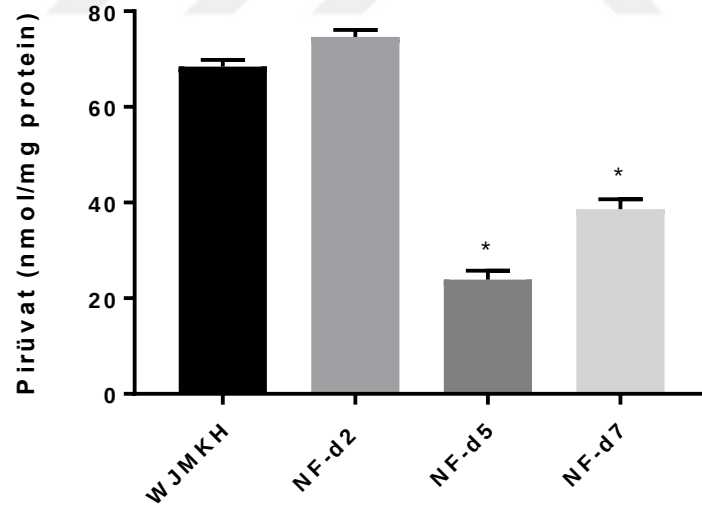
4.7.3. Piruvat Düzeyi

2x 10⁵ Hücre başına piruvat düzeylerinin ortalamaları ve SEM 'leri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6: WJ-MKH lerin nöronal farklılaşma sürecindeki (a) ve Akt inhibisyonu varlığındaki (b) Sitrat değerleri (ort± SEM) olarak verilmiştir.

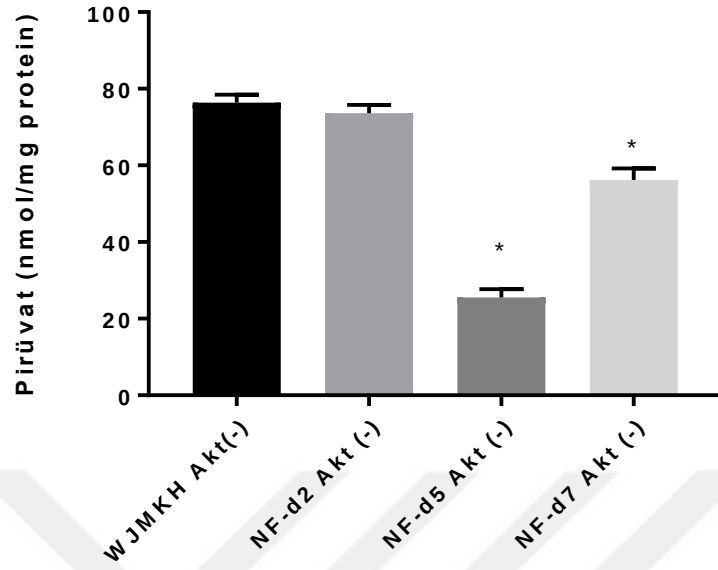
Piruvat Düzeyi (nmol/ml)			
A	N	Mean	
	Statistic	Statistic	Std. Error
WJMKH	3	352,4766	4,20350
NFd2	3	107,6962	,76192
NFd5	3	81,9942	3,63410
NFd7	3	63,2037	4,37391

Akt (-) Piruvat Düzeyi (nmol/ml)			
B	N	Mean	
	Statistic	Statistic	Std. Error
AktWJMKH	3	373,7869	29,66399
AktNFd2	3	126,6307	10,34089
AktNFd5	3	88,6177	5,83686
AktNFd7	3	89,1937	7,05874

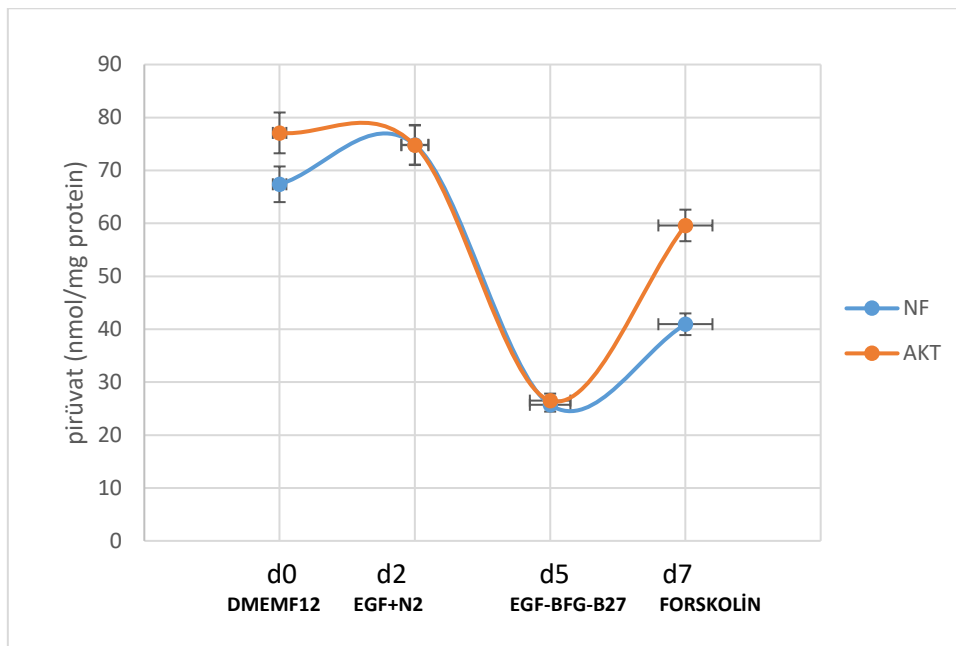


Şekil 27: Nöronal farklılaşma sürecinde Piruvat düzeyi değişimi.

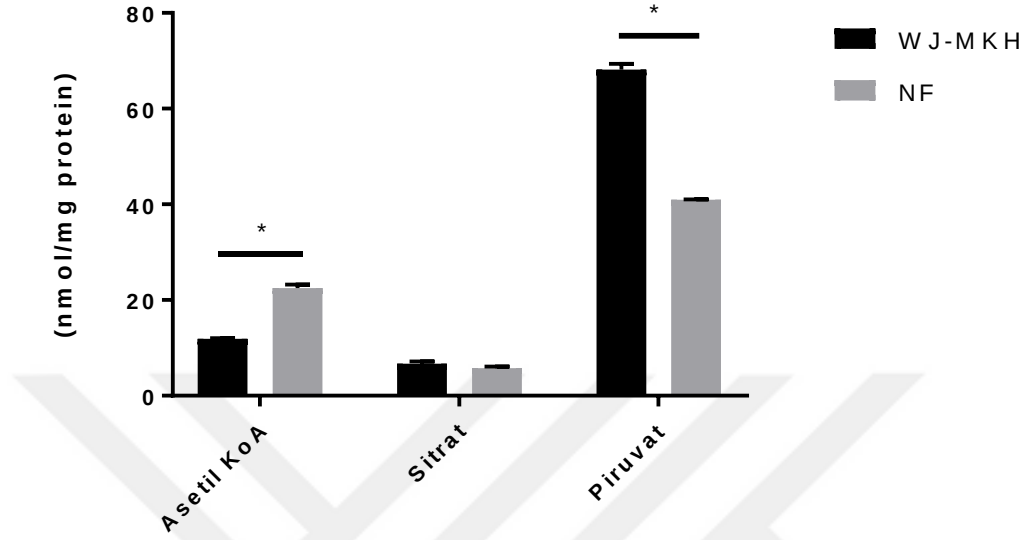
Sonuçlar ortalama±SEM olarak verilmiştir. (n=3, WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, NF: Nöronal farklılaşma indüksiyonu, * Kontrol grubuna göre p<0.05)



Şekil 28: Akt inhibitörü uygulaması ile birlikte nöronal farklılaşma sürecinde Piruvat değişimi. Sonuçlar ortalama±SEM olarak verilmiştir. (n=3, WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, NF: Nöronal farklılaşma indüksiyonu, * Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık $p<0.05$)

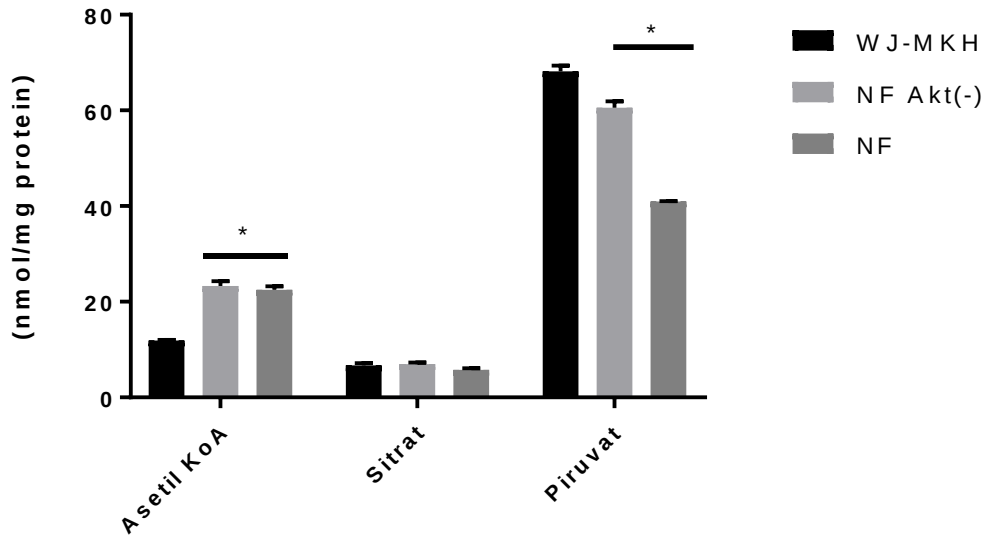


Şekil 29: Normal şartlarda ve Akt inhibisyonu sonrasında nöronal farklılaşma sürecinde Sitrat değişimi.

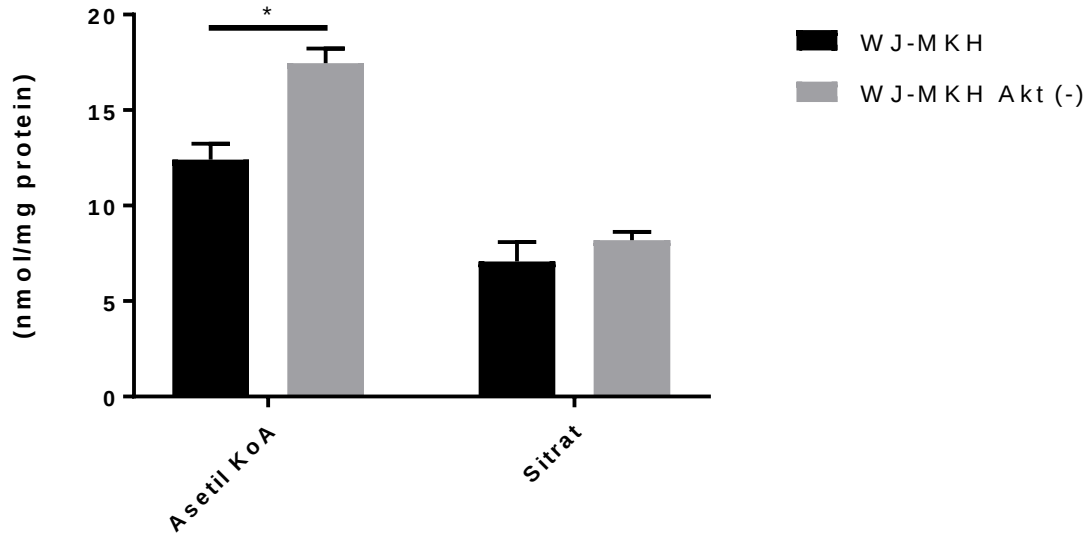


Şekil 30: Nöronal farklılaşma sonrası hücresel metabolit değişimleri

Basal ve 7 günlük nöronal farklılaşma indüksiyonu sonrası hücresel metabolit değişimleri (Şekil 31). Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. (n=3, WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, NF: Nöronal farklılaşma indüksiyonu, * İstatistiksel anlamlı farklılık $p < 0.05$)

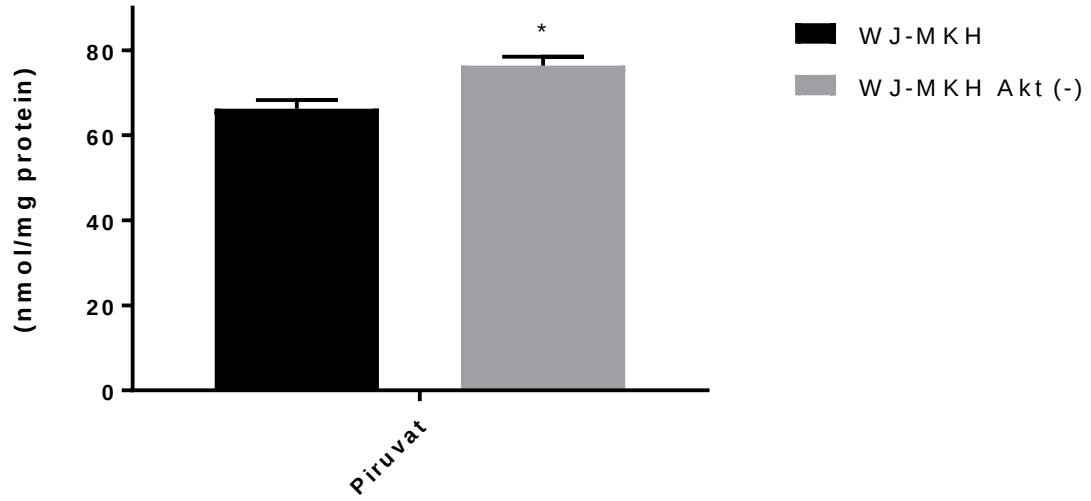


Şekil 31: Akt baskılanmasının nöronal farklılaşma sonunda hücre metabolit düzeylerine etkisi. Bazal WJ-MKH değerleri ile 7. Gün NF indüksiyonu sonrasında Akt inhibisyonu varlığında ve yokluğunda elde edilen hücre metabolit düzeyleri görülmektedir. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. (n=3, WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, NF: Nöronal farklılaşma indüksiyonu, * İstatistiksel anlamlı farklılık p<0.05)



Şekil 32: Akt baskılanmasının WJ-MKH'lerinde Asetil KoA ve Sitrat düzeylerine etkisi

Nöronal farklılaşma indüksiyonu öncesi yapılan 3. saatlik akt inhibitörü pre-treatment uygulamasının hücresel asetil koA ve sitrat düzeyine etkisi (Şekil 33). Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. (n=3, WJ-MKH: wharton jölesi mezenkimal kök hücre, NF: Nöronal farklılaşma indüksiyonu, * p<0.05)



Şekil 33: Akt baskılanmasının WJ-MKH'lerinde piruvat düzeyine etkisi

Nöronal farklılaşma indüksiyonu öncesi yapılan 3. saatlik akt inhibitörü pre-treatment uygulamasının hücresel piruvat düzeyine etkisi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. (n= 3, WJ-MKH : wharton jölesi mezenkimal kök hücre, NF: Nöronal farklılaşma indüksiyonu, * p<0.05)

5. TARTIŞMA

Nöronal farklılaşma sırasında metabolizmanın yeniden programlanması nasıl olur tam olarak bilinmemekle birlikte, nörogenez esnasında glukoz metabolizmasında görevli Hekzokinaz (HK2) ve laktat dehidrogenaz (LDHA) enzim ekspresyonunun birlikte kaybedildiği gösterilmiştir [35]. Zheng ve arkadaşları 2016 yılında yayınlanan çalışmalarında, aerobik glikolizin durdurulmasının nöronal farklılaşma için kritik önem taşıdığını ileri sürmüşlerdir [36]. Nöronal kök hücre aktivitesinde lipit metabolizması kritik rol üstlenebilir ve yağ asidi sentezi, yağ asidi oksidasyonunu ve kolesterol metabolizması değişimleri nörogeneziste rol oynayabilir [37], [38]. Ancak henüz kök hücre lipit metabolizmasını etkileyebilecek, asetil KoA oluşumu ile akıbetini belirleyebilecek pirüvat dehidrogenaz ve sitrat liyaz enzimlerinin ekspresyon ve aktivite değişimleri net olarak tanımlanmamıştır.

Olgun nöron ve nöroglia hücrelerinin karbonhidrat ve lipit metabolizmaları farklıdır. Nöroprogenitör hücrelerden nöron ve oligodendroglia farklılaşırken, farklı metabolik yolların uyarılması olasıdır; Nöronlarda nörotransmitter sentezinde kullanılmak üzere kısa sitozolik yollar aktiftir, gerekli substratlar nöroglial hücrelerden alınabilir. Nöron aksonlarını sararak miyelin kılıfı oluşturan oligodendroglia hücrelerinde ise kolesterol, fosfolipit ve galaktolipit gibi kompleks lipit sentezi artmıştır [39]. Hücre içi lipit sentezi için gerekli asetil-ko A, temel enerji kaynağı olan glukozun glikoliz sonucunda oluşan pirüvatın sitrik asit siklusu ile mitokondride oksidatif dekarboksilasyonu ile elde edilir. Mitokondride oluşan asetil ko-A'nın, lipit sentezi için sitoplazmaya taşınması gerekir ancak mitokondrial zar asetil Ko A için geçirgen değildir. Sitrat şeklinde sitoplazmaya taşınabilen asetil Ko A, sitrat liyaz enzimi ile açığa çıkar[39]. Bizim çalışmamızda da nöronal farklılaşma sürecinde sitrat, pirüvat metabolizmasında değişim olduğu gösterilmiştir.

Farklılaşma esnasında hücre içi oluşan asetil KoA'nın akıbeti, hücrenin fenotipik ve fonksiyonel değişimlerini etkileyebilir. Bunu destekler şekilde daha önceki çalışmalarda oligodendrositlerde nöronlara göre heksoz mono fosfat şantı lipit sentezini desteklemek üzere daha baskın olduğu bilinmektedir. Lipit sentezi için gerekli asetil koA asetattan oluşturulur. Mitokondri içinde oluşan asetil koA'nın sitoplazmada lipit sentezi için kullanımında kilit basamaklardan birini, piruvat karboksilaz (PC) enzimi oluşturur. Bu

enzim, çoğu ökaryotik ve birçok prokaryotik dokuda bulunan nükleer kodlanmış bir homotetramerdir ve biyotin bağımlı karboksilaz ailesinin bir üyesidir [40]. PC'nin santral sinir sisteminde sadece astrositler tarafından eksprese edildiğini öne süren bir dizi çalışma bulunmaktadır [41]–[47]. Oligodendrositlerde PC ekspresyonunu tanımlayan bir rapor vardır [48] ancak bu yayındaki oligodendrosit kültürlerinde % 10 astrosit bulunduğu bilgisi dikkatle alınmalıdır [49]. Oligodendrositlerdeki PC yanı sıra glikojenolizde görevli glikojen fosforilaz enziminin de aktivitesinde bir azalma söz konusudur [50]. Glikojenoliz glutamat oluşumu için bir ön şarttır [51], [52]. Sinir sisteminde yaygın olan glutamaterjik sinyalizasyonun piruvat karboksilaz ile oluşan oksaloasetat ve oksaloasetat üzerinden oluşan glutamat bağımlılığına bağlı olabilir [53]. PC'nin oligodendrositlerde ekspresyonunun az olması, sitoplazmada asetil koA'nın aspart- malat-oksaloasetat- alfa-keto-glutarat döngüsünden çok sitrat üzerinden sitrat liyaz enzimi yardımı ile oluştuğunu düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda da bunu destekler şekilde sitrat miktarı ve asetil koA miktarı arasında negatif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir.

Oligodendrositlerle ilgili çözülmemiş bir soru da pentoz fosfat yolağı aktivitesinin kapsamıdır. Bu glukoz şantı, nöronlarda ve astrositlerde ve gelişmekte olan beyin oligodendrositlerinde yüksek aktiviteye sahiptir [54][55]. Ancak olgun oligodendrositlerdeki aktivitesi henüz araştırılmaktadır. Sykes ve ark. (1986), neonatal sıçanların oligodendrositlerinde yağ asitleri ve kolesterolünün de novo sentezinin, bu hücrelerdeki pentoz fosfat yolağının aktivitesi ile yakından ilişkili olabileceği ileri sürmektedirler [56]. Glutamat, glutamin ve sitrik asit siklusu nöron glial hücre metabolik kompartmanları içinde yakın ilişki halinde olan döngülerdir. Glutamat alfa-keto glutamata çevrilebilir ya da oksidize edilebilir. Oligodendrositlerde glutamin sentaz ve piruvat karboksilaz enzimlerinin yeterli olmadığı rapor edilmiştir. Bu nedenle oligodendrositlerin glutamin sentezleyip sentezleyemedikleri kesin değildir. Nöronlar ise n-asetil aspartatdan aspartat sentezleyebilir. Aspartat miyelin lipidlerinin sentezi için temel yapı taşıdır [57].

Hücre enerji metabolizmasının düzenlenmesinde AMP kinaz enzim aktivitesi merkezi role sahiptir ve enerji metabolizması değişimlerinin hücre fenotipini etkilemesi olasıdır; Düşük glukoz veya hipoksi varlığında hücre içi (AMP+ADP/ATP) oranının değişerek

AMPKinaz aktivasyonu ile glikolizin ve kök hücre canlılığının arttığı ancak kolesterol ve yağ asidi sentezinin baskılandığı gösterilmiştir. PI3K-AKT yolağı AMP kinaz enziminin kontrol yollarından biridir. PI3K ve Akt aktivasyon azalması ile kök hücrelerin motor nöronlara çevrilmesinin tetiklendiği gösterilmiştir. AMP kinaz kolesterol sentezindeki hız kısıtlayıcı enzim olan 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) enzimini fosforiller ve inaktive edebilir [58]. Bizim çalışmamızda akt inhibitörü hücrelerde asetil KoAve piruvat düzeyini artırmakla beraber sitrat düzeyi üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır.

mTOR lipid metabolizması üzerine etkili bir enzimdir ve enerji metabolizması ile etkileşebilir; Bir lipid kinazın sekans imzasına rağmen, mTOR, bir protein kinazdır. Substratlarında treonin ve serin amino asitlerinin hidroksil gruplarını fosforile eder. mTOR, hücrelerde mTOR kompleksi olarak adlandırılan iki çoklu protein kompleksinin katalitik alt birimleri 1 (mTORC1) ve kompleks 2 (mTORC2) [59]. mTOR AKT'ı fosforile eder ve aktivasyonunu uyarır ve dolayısıyla AKT aracılı hücre sağ kalımında kritik bir rol oynar [60]. mTORC2 sitrat liyaz enziminin Ser-455 fosforilasyonunu kontrol ettiği ve böylece asetil-KoA üretimini teşvik ettiği gösterilmiştir. İlginç olarak bu çalışmada lipogenezin MTORC1/mTORC2 kinaz inhibitörü (mTOR-KI) veya mTORC2'nin hücre sel susturulması ile bloke edildiği ancak rapamisin tarafından bloke edilmediği gösterilmiştir [61]. MTORC1'e kıyasla, mTORC2'nin işlevleri ve substratlar hakkında çok daha az şey bilinmektedir. mTORC2 aktivitesi için gerekli RICTOR'un ekspresyonunun adipoz dokuya sınırlı olarak silindiği farelerde adipogenezde hiçbir kusur gözlemlenmemiştir [62], [63]. Ancak Yao ve arkadaşları adipogenezde mTORC2 in rolü olabileceğini ileri sürmüşlerdir [64]. Ayrıca mTOR2'nin asetil-koA üretimi ve de-novo lipogenezisi ATP sitrat liyaz enzim aktivasyonu yolu ile uyarabildiği meme kanser hücrelerinde de gösterilmiştir [61]. Lipid sentezinin kontrol edilmesi sırasında mTOR yolağı ile enerji bağımlı AMP kinaz yolağının birbiri ile olan etkileşiminin olabileceği ve bu ilişki de tuberoskleroza (TSC 1/2) fosforilasyonunun rol oynayabileceği ileri sürülmektedir. TSC kaybıyla mTORC1'in yapısal olarak aktive edilmesi adipogenezini teşvik ederken, doku kültürü deneylerinde genetik olarak veya rapamisin ile mTORC1'in engellenmesi adipogenezini bozmuştur [65]. Akt, mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) ve Erk (Extracellular Signal-regulated Kinase) 1/2 yollarının oligodendrosit farklılaşmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür [66]–[73]. Dai ve

arkadaşları ise 2014 yılında sıçan oligodendrositlerini PDGF/FGF'nin ve T3 muamelesi ile farklılaştırdıkları deney modelinde Akt'in tam aktivasyonu için, serin 473'ün (S473) mTORC2 tarafından ve treonin 308'in (T308) ise fosfoinositol bağımlı kinaz 1 (PDK1) tarafından fosforilasyonuna bağlı olduğunu göstermişlerdir [74]. Bu çalışmada PI3K inhibitörü (LY294002) ve mTORC 1/2 inhibitörü (Torin1) yüksek konsantrasyonlarda kullanımı ile oligodendrosit olgunlaşması tamamen engellenmiş, daha sonra LY294002 ve Torin1 konsantrasyonlarında azalma, Erk1 / 2 inhibitörü U0126 ile miyelin basic protein (MBP) mRNA ve protein ekspresyonu üzerindeki kombinasyonel etkisini değerlendirmek için kullanılmıştır. Oligodendrositler Akt / mTOR'un inhibisyonunu pErk 1/2 aktivitesindeki artışlarla aşmaya çalışmışlardır ve oligodendrosit farklılaşmasını ve miyelinasyonunu düzenleyen sinyal yollarının karmaşıklığını vurgulamışlardır.

Nöroprogenitör hücre ve oligodendrosit farklılaşması birbirine eşlenik gelişim basamaklarıdır; Gelişimsel olarak, insan pluripotent kök hücrelerinden embriyonik cisimcikler üzerinden nöroprogenitör hücrelerden sırası ile pre-oligodendrosit prekürsör hücrelere, oligodendrosit prekürsör hücrelere, pre-oligodendrositlere ve miyelin sentezleyebilen oligodendrositlere farklılaşabilir [75]. İnsan oligodendrositleri gelişim basamaklarına göre, hücre karakterizasyonu için kullanılan belirteçler de değişmektedir. Nöral progenitör hücreler Nestin, PAX6 daha baskın olarak sentezlenirken, pre-oligodendrosit prekürsör hücrelerde farklı olarak NG2, OLIG1, A2B5; oligodendrosit prekürsör hücrelerde NKX6.2, SOX8, SOX9; pre-oligodendrositlerde ise RIP, CNPase, O1, O4 ve Galc; son olarak miyelinli oligodendrositlerde ise PLP ve MBP ekspresyonları mevcuttur. Aynı zamanda Tuj-1 olarak da bilinen β -3 tubulin, beta tubulin protein ailesinin sınıf III üyesidir. Beta tubulinler, insan hücrelerinde mikrotübül ağını oluşturan iki yapısal bileşenden biridir. Genel tubulinler, çok çeşitli hücresel süreçlerde (mitoz, motilite, vb.) rol oynarken, β -3 tubulin, özellikle nöronlara lokalizedir. Özellikle, β -3 tubulin ekspresyonu, nöronal farklılaşmanın en erken evreleriyle ilişkilidir. İnsan beyninin kök hücre havuzlarından yeni nöronlar ürettiği keşfedildiğinden, β -3 tubulin birçok araştırma çalışmasında pozitif nöron kimliğinin bir işareti olarak kullanılmıştır. β -3 tubulinin nörogenez, akson rehberliği ve bakımında etkileri olduğu bilinmektedir [76] [77]. Bizim çalışmamızda WJ-MKH hücreler 7. Günlük indüksiyondan sonra erken dönem nöronal hücre aşamasına farklılaştırılmış hücrelerin β -3 tubulin ekspresyonu gösterilmiştir. Nestin ekspresyonları ise gösterilememiştir.

Nöronal indüksiyonun daha ileri devrelerinin ve oligodendrosit gelişiminin tetiklendiği yeni planlanacak ileriki çalışmalarımızda, nestin, A2B5, O4, MBP ve benzeri belirteçlerin gösterilmesi mümkün olabilir.

Nöronal hücrelere farklılaştırma için embriyo temelli hat seçimi [32] ve stromal hücrelerle ko-kültür gibi birkaç protokol direkt fare embriyonel kök hücrelerinin orta beyin dopaminerjik nöronlarına dönüşümünde kullanılmıştır [33]. Mezankimal kök hücreler (MKH) ise, ilk olarak Friedenstein tarafından kemik iliğinde belirlenen, az sayıda multipotent heterojen bir grup stromal hücre olarak tanımlanmıştır [8]. Bunların plastik zemine tutunabilen, koloni oluşturan ünitelere çoğalabilen fibroblastlar olduğu, belirli koşullarda farklılaşarak, osteojenik, kondrojenik, myojenik, adipojenik ve diğer hücre türlerine dönüşebildiği, çok sayıda çalışmada gösterilmiştir [9]–[11]. Wharton jölesinden elde edilebilen kök hücreler (WJ-MKH) son yıllarda hastalıkların tedavisine yönelik olarak prelinik ve klinik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır [78].

Kendini yenileme ve farklılaşma bir kök hücreyi tanımlayan iki esas kriterdir ve MKH bu özelliklere sahiptir. MKH'ler kök hücre olarak belirli proteinleri eksprese ederler, ancak sadece MKH'de eksprese olan bir markır protein henüz bulunamamıştır (Handbook of Stem Cells, Volume 2 (Google eBook) 2012). Immünosupresif etkilerinin olması, MKH'lerin hücresel tedavilerde ve rejeneratif tıpta hücre kaynağı olarak değerlendirilmelerinin önünü açmıştır [79]. Intervertebral disk dejenerasyonunda Wharton's jelly hücre transplantasyonunun olumlu etkileri gösterilmiştir [80]. WJ- Ayrıca MKH'den elde edilen kök hücrelerden fonksiyonel dopaminerjik ve asetilkolinerjik nöronların farklılaşması için gerekli yöntemsel çalışmalar araştırmacıların ilgi odağı olmuştur [28], [30], [31], [81].

Kök hücre biyolojisi çalışmalarında standardizasyon için karşılaşılan başlıca problemlerden biri, kullanılan hücre kültür ortamları ve hücre dışı sinyal faktörleri nedeni ile homojen elde edilemeyen transkripsiyonel profil farklılıklarıdır [82]. Oligodendrosit progenitör hücreler nöralprogenitör hücrelerden türetildiğinden dolayı, gliogenezisi teşvik eden biyolojik yanıtların nöronogenezisi antagonize etmesi beklenir. Nörogenezisten gliogenezise geçiş zamanının büyüme faktörü bağımlı bir mekanizma ile kontrol edildiği ileri sürülmüştür [83]. Ancak fibroblast büyüme faktörü, OLIG2- eksprese eden hücrelerin proliferasyonunu artırırken, motor nöronlara farklılaşmasını

eş zamanlı olarak bloke edebilir. WJ-MKH'nin nöroglial hücelere dönüşme potansiyelleri daha önce gösterilmiştir [80], [84], [85]. Bu çalışmalarda büyüme faktörleri kullanımı sonrası sonic hedgehog (SHH), T3, noggin veya epidermal büyüme faktörü kullanımının oligodendrosit farklılaşması için kritik olabileceği görülmektedir. Tez çalışmamızda primitif hücre özellikleri gösteren, ancak tanım olarak erişkin kök hücre olan WJ-MKH'lerde nöroglial farklılaşma esnasındaki metabolik plastisitenin rolü araştırılmıştır. WJ-MKH'lerin nöroglial hücelere farklılaşması sürecinde hücelerdeki metabolik değişiklikler ortaya konulmuştur. Yapmış olduğumuz literatür taramamıza göre çalışmamız ile ilk kez wharton jölesinden elde edilecek insan mezenkimal kök hücelerin nöronal ve oligodendroglial farklılaşması esnasında, oluşacak asetil KoA ve ilişkili metabolit değişimleri zaman bağımlı olarak belirlenmiştir.

Sitrik asit ($\text{HOOC-CH}_2\text{-C}(-\text{OH})(-\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-COOH}$), mitokondride meydana gelen TCA döngüsünde önemli bir ara maddedir. Glikoliz boyunca oluşmuş asetil koA'nın asetil grubuna oksaloasetat ilavesiyle oluşur. Sitrat, mitokondriden taşınabilir ve yağ asidi sentezi için tekrar asetil KoA'ya dönüştürülebilir. Sitrat, hem yağ asidi sentezi (asetil-koA karboksilaz) hem de glikolizin (fosfofruktokinaz) allosterik bir modülatörüdür. Bu tez çalışması ile nöronal farklılaşma sürecinde düzeyinin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Çalışmamızda nöronal farklılaşma için yeni ve özgün bir hipotez ileri sürülmüştür. Bu hipoteze göre kök hüceler nöroglial farklılaşmanın derecesine bağılı olarak, farklı metabolik yolları belirlemek üzere asetil KoA'nın oluşumunu ve ya akıbetini değiştirebilirler, bu değişimde sitrat liyaz ya da pirüvat dehidrogenaz enzim ekspresyonları ve aktiviteleri anahtar rol üstlenebilir. Yağ asidi, kolesterol ve fosfolipitlerin öncülü olan Asetil KoA'nın metabolizmasını ilgilendiren değişiklikler mTOR ve AKT-AMP kinaz yolları ile kontrol edilebilir. mTOR ve AKT-AMP kinaz yollarının dengeli ve sıralı uyarımı asetil KoA'nın akıbetini belirlemek üzere pirüvat dehidrogenaz, sitrat liyaz, yağ asidi sentaz ve HMG KoA redüktaz vb enzimleri etkileyerek farklılaşmayı kontrol edebilir. Bu hipotezin kanıtlanabilmesi için daha detaylı planlanmış yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Primer kültür için dokuların ayrışmasını sağlamada çeşitli teknikler günümüze kadar geliştirilmiştir. Bu teknikler izole edilen hücelerin miktarını ve kalitesini etkileyebilir. Salehinejad ve arkadaşları 2012 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada insan göbek

kordonundan mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu için dört metodu karşılaştırmışlardır [86]. Bunlar: üç enzimatik yöntem; kollajenaz / hiyalüronidaz / tripsin , kollajenaz / tripsin ve tripsin ve eksplant yöntemi. Farklı yöntemlerin sonuçlarını değerlendirmek için tripan mavi boya testi, suda çözünür tetrazolyum tuzu-1 (WST-1) testi, akış sitometrisi, alkalen fosfataz aktivitesi ve histokimyasal boyama kullanılmıştır. Kök hücreleri, tüm yöntemler ile başarıyla izole edilmiş, ancak izolasyon yöntemi, izole edilmiş hücrelerin hücre sayısını ve çoğalma kapasitesini büyük ölçüde değiştirdiği gösterilmiştir. Akış sitometrisi analizi CD44, CD73, CD90 ve CD105'in tüm gruplarda eksprese edildiğini gösterilirken CD34 ve CD45 eksprese edilmediği gösterilmiştir. Enzimatik gruplarda C-kit ekspresyonu eksplant grubundakinden daha yüksek iken, Oct-4 ekspresyonu diğer gruplara kıyasla kollajenaz tripsin grubunda daha yüksektir. Kollajenaz/tripsin hücre izolasyonu yönteminin, diğerlerinden daha yüksek bir hücre yoğunluğu sağladığı ve bu hücrelerin, C-kit ve Oct-4 gibi pluripotent hücre markörlerinin daha yüksek bir oranını ifade ettiği belirlenmiştir. Eksplant yöntemi ise diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek bir hücre proliferasyon hızı ve aktivitesi ile sonuçlanmıştır. Bizim projemiz ile laboratuvar koşullarımızda insan wharton jölesinden kök hücre eldesi için enzimatik ve eksplant yöntemleri kullanılmış ve eksplant yöntemi optimize edilmiştir. Eksplant yönteminde enzimatik yöntemle göre daha yüksek proliferasyon hızı elde edilmiştir. Doubling time eksplant yöntemi ile elde edilen hücrelerde 3 gün iken, enzimatik yöntem ile elde edilen hücrelerde 5 günü bulmuştur. Bizim çalışmamızda eksplant yöntemi ile 1.250 hücre/saat proliferasyon hızında kök hücre sayısı elde edilmiştir. Bu değer enzimatik yöntem ile elde edilen kök hücreler için ortalama yaklaşık 830/saat hücre sayısı değerindedir. İnsan göbek kordonu yaklaşık olarak 50-60 cm uzunluğundadır ve literatürdeki mevcut çalışmalar göbek kordonunun hangi bölümü üzerinde çalışıldığına dair bazı bilgiler sağlamıştır. Lim J.et al. Göbek kordonunun üç anatomik segmentinden elde edilen WJMSC'leri karşılaştırılmışlardır. Maternal ve fetal segmentlerden izole edilen WJMSC'lerin, daha fazla canlılık sergilediğini ve orta segmentten alınan hücrelere kıyasla daha yüksek proliferasyon oranına sahip olduğunu göstermişlerdir [87]. Bu çalışmada immünofenotipleme, her üç segmentten türetilen WJMSC'lerin, MSC işaretleyicileri CD105, CD73, CD90, CD44, CD13 ve CD29'un yanı sıra HLA-ABC ve HLA-DR'yi ifade ettiğini, ancak hematopoietik işaretleyiciler CD14, CD34 ve CD45 için negatif olduğunu ortaya çıkarmıştır. Aynı

zamanda bu çalışmada gerçekleştirilen embriyonik belirteçlerin analizi, her üç bölümün Nanog ve 3/4'ü gösterdiğini, ancak sadece maternal ve fetal segmentlerin SSEA 4 ve TRA-160'ı ifade ettiğini göstermiştir. Her üç segmentten alınan hücreler, diğer iki segmente kıyasla çok daha düşük farklılaşma potansiyeli gösteren orta segmentler ile kondrojenik, osteojenik ve adipojenik soylara farklılaşabilmiştir. Bizim çalışmamızda göbek kordonunun maternal ve fetal segmentleri birlikte kullanılmıştır. Kök hücreler diferansiye hücrelerden fizyolojileri ve enerji kaynağı olarak kullandıkları metabolik yollar bakımından farklılık göstermektedirler. Bu farklılığın nedeni ve boyutu üzerinde araştırmalar sürmektedir [18]. Bizim çalışmamızda laktat Üretim Hızı $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein/saat olarak ölçüldüğünde, farklılaşma süresine bağlı olarak laktat üretiminin değiştiği belirlenmiştir. Yedi gün süre ile endotel ve nöronal farklılaşma uyaranları verilen örneklerde laktat üretimi en az, bir gün süre ile endotel farklılaşma uyaranları verilen örneklerde laktat üretimi en yüksek olarak ölçülmektedir. Ayrıca nöronal farklılaşma glikoz tüketimini $\sim\%$ 48 artırırken ve bu hücrelerin hücre dışı kalsiyum konsantrasyonu, senkronize olmayan farklılaşmamış hücrelerden önemli ölçüde daha düşüktü (veriler sunulmadı, ön çalışma niteliğindedir). Bu bulgular farklılaşma için yaptığımız uyarının hücre enerji metabolizmasını değiştirdiğini göstermektedir. Bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Lipit sentezinin temel öncüsü ve asetil gruplarının asetillemesi için tek donörü olan asetil koA'nın yakın zamanda enerji metabolizması, mitoz ve otofaji dahil olmak üzere çoklu hücresel olaylarda hem doğrudan hem de gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesi yoluyla kritik bir pozisyonda bulunduğu gösterilmiştir [88]. Bununla birlikte, AcCoA gibi lipit öncü metabolitlerinin metabolizması, daha fazla araştırma yapılmasını gerektiren daha derin etkilere sahip olabilir [89]. Bununla birlikte Asetil-CoA sentetazın, histon asetilasyonunu ve hipokampal hafızayı düzenlediği ileri sürülmektedir [90]. Bu çalışmada nöronal hücre kültürü modelinde, asetil KoA sentaz enziminin farklılaşan nöronların çekirdeğinde arttığı gösterilmiştir. Bu enziminin aktivitesinin azaltılması, asetil koA seviyelerini, histon asetilasyonunu da azaltmıştır. Yetişkin farelerde ise hipokampal asetil koA sentaz 2 enzim ekspresyonunun zayıflamasının ise, histon asetilasyonuna dayanan bilişsel bir süreç olan uzun süreli uzamsal belleği bozduğu gösterilmiştir. Asetil-CoA'nın metabolik üretimi, histon asetilasyonu ve gen düzenlemesi ile bağlantılı olabilir, ancak kesin mekanizmalar henüz büyük ölçüde bilinmemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu tez çalışması ile literatür taramamıza göre ilk kez insan göbek kordonundan elde edilen WJ-MKH'lerin nöronal hücelere farklılaşması sürecinde asetil koA miktarının anlamlı olarak artarken eş zamanlı laktat, sitrat ve pirüvat miktarının azaldığı gösterilmiştir. Nöronal farklılaşma esnasında sitrat ve laktat miktarının birlikte azalması hücrenin anaerobik glikolizden çıktığını ancak bu duruma eşlenik olarak asetil koA ve pirüvat öncüllerinden sitrat sentezinin artmadığını düşündürebilir.

Bu tez ve benzeri çalışmalar oligodendroglial hücre olgunluk derecesine göre lipit kompozisyonlarındaki değişimlerin ve bunu kontrol eden sinyal yollarının belirlenmesi sinyal ileti fonksiyonu için kritik olan miyelin kılıfa dair rejeneratif uygulamalara katkıda bulunabilir. Bu tez projesi benzeri çalışmalar kök hücrelerin devamlılığı ve oligodendroglial farklılaşması esnasında oluşan metabolik plastisitenin açıklanmasına ve bunun kontrol edilmesine katkı verebilir.

7. KAYNAKLAR

- [1] P. Bianco, P. G. Robey, and P. J. Simmons, "Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays," *Cell Stem Cell*, vol. 2, no. 4, pp. 313–319, 2008.
- [2] J. Panno, *The New Biology Sem Cell*. 2005.
- [3] A. Bongso and E. H. Lee, "Stem Cells : Their Definition ,," pp. 1–13.
- [4] J. A. Thomson *et al.*, "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts," vol. 282, no. November, pp. 1145–1148, 1998.
- [5] D. M. Gilbert, "The future of human embryonic stem cell research: addressing ethical conflict with responsible scientific research," *Med Sci Monit*, vol. 10, no. 5, pp. RA99-103, 2004.
- [6] J. G. Toma *et al.*, "Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin," *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, no. 9, pp. 778–784, 2001.
- [7] L. A. Fortier, "Stem cells: Classifications, controversies, and clinical applications," *Vet. Surg.*, vol. 34, no. 5, pp. 415–423, 2005.
- [8] L. K. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, "THE DEVELOPMENT O F FIBROBLAST COLONIES I N MARROW A N D SPLEEN CELLS," pp. 393–403, 1970.
- [9] D. J. Prockop, "Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): Controversies, myths, and changing paradigms," *Mol. Ther.*, vol. 17, no. 6, pp. 939–946, 2009.
- [10] E. Javazon, K. Beggs, and A. Flake, "Mesenchymal stem cells: paradoxes of pasaging," *Exp Hematol*, vol. 32, no. 32, pp. 414–25, 2004.
- [11] M. F. Pittenger *et al.*, "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells," vol. 284, no. 5411, pp. 143–147, 1999.
- [12] R. Hass, C. Kasper, S. Bohm, and R. Jacobs, "Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC," *Cell Commun Signal*, vol. 9, no. 1, p. 12, 2011.
- [13] M. Dominici *et al.*, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal

- stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement," *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–317, 2006.
- [14] A. J. Marcus and D. Woodbury, "Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: Do not discard: Stem Cells Review Series," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 12, no. 3, pp. 730–742, 2008.
 - [15] S. S. Kelly, C. B. S. Sola, M. de Lima, and E. Shpall, "Ex vivo expansion of cord blood," *Bone Marrow Transplant.*, vol. 44, no. 10, pp. 673–681, 2009.
 - [16] Giampiero La Rocca, "Novel Immunomodulatory Markers Expressed by Human WJ-MSC: an Updated Review in Regenerative and Reparative Medicine," *Open Tissue Eng. Regen. Med. J.*, vol. 5, no. 1, pp. 50–58, 2012.
 - [17] R. R. Taghizadeh, K. J. Cetrulo, and C. L. Cetrulo, "Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications," *Placenta*, vol. 32, no. SUPPL. 4, pp. S311–S315, 2011.
 - [18] J. Rehman, "Empowering self-renewal and differentiation: The role of mitochondria in stem cells," *J. Mol. Med.*, vol. 88, no. 10, pp. 981–986, 2010.
 - [19] A. Prigione and J. Adjaye, "Modulation of mitochondrial biogenesis and bioenergetic metabolism upon in vitro and in vivo differentiation of human ES and iPS cells," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 54, no. 11–12, pp. 1729–1741, 2011.
 - [20] R. Bukowiecki, J. Adjaye, and A. Prigione, "Mitochondrial function in pluripotent stem cells and cellular reprogramming," *Gerontology*, vol. 60, no. 2, pp. 174–182, 2014.
 - [21] J. D. Ochocki and M. C. Simon, "Nutrient-sensing pathways and metabolic regulation in stem cells," *J. Cell Biol.*, vol. 203, no. 1, pp. 23–33, 2013.
 - [22] K. Ito and T. Suda, "Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 4, pp. 243–256, 2014.
 - [23] C. T. Chen, S. H. Hsu, and Y. H. Wei, "Mitochondrial bioenergetic function and metabolic plasticity in stem cell differentiation and cellular reprogramming," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1820, no. 5, pp. 571–576, 2012.

- [24] V. A. Rafalski, E. Mancini, and A. Brunet, "Energy metabolism and energy-sensing pathways in mammalian embryonic and adult stem cell fate," *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. 23, pp. 5597–5608, 2012.
- [25] T. Teslaa and M. A. Teitell, "Pluripotent stem cell energy metabolism: an update," *EMBO J.*, vol. 34, no. 2, pp. 138–153, 2015.
- [26] D. G. Hardie and M. L. J. Ashford, "AMPK: Regulating Energy Balance at the Cellular and Whole Body Levels," *Physiology*, vol. 29, no. 2, pp. 99–107, 2014.
- [27] M. Shimobayashi and M. N. Hall, "Making new contacts: The mTOR network in metabolism and signalling crosstalk," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 3, pp. 155–162, 2014.
- [28] E. Paldino *et al.*, "Induction of Dopaminergic Neurons From Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell by Forskolin," *J. Cell. Physiol.*, vol. 229, no. 2, pp. 232–244, 2014.
- [29] P. J. Hallett *et al.*, "Successful function of autologous iPSC-derived dopamine neurons following transplantation in a non-human primate model of Parkinson's disease," *Cell Stem Cell*, vol. 16, no. 3, pp. 269–274, 2015.
- [30] L. Zhang *et al.*, "In vitro differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs), derived from Wharton's jelly, into choline acetyltransferase (ChAT)-positive cells," *Int. J. Dev. Neurosci.*, vol. 30, no. 6, pp. 471–477, 2012.
- [31] J. Liang *et al.*, "Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into cholinergic-like neurons in vitro," *Neurosci. Lett.*, vol. 532, no. 1, pp. 59–63, 2013.
- [32] V. M. Y. Lee, R. S. Hartley, and J. Q. Trojanowski, "Neurobiology of human neurons (NT2N) grafted into mouse spinal cord: Implications for improving therapy of spinal cord injury," *Prog. Brain Res.*, vol. 128, pp. 299–307, 2000.
- [33] H. Kawasaki *et al.*, "Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity," *Neuron*, vol. 28, no. 1, pp. 31–40, 2000.

- [34] J.-Y. Hsieh *et al.*, "Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis.," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e72604, Jan. 2013.
- [35] M. Knobloch and S. Jessberger, "Metabolism and neurogenesis," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 42, pp. 45–52, 2017.
- [36] X. Zheng *et al.*, "Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation," *Elife*, vol. 5, no. JUN2016, pp. 1–25, 2016.
- [37] M. Knobloch *et al.*, "Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis," *Nature*, vol. 493, no. 7431, pp. 226–230, 2013.
- [38] M. Knobloch, "The Role of Lipid Metabolism for Neural Stem Cell Regulation," *Brain Plast.*, vol. 3, pp. 1–11, 2017.
- [39] P. O. F. Molecular and M. Neurobiology, *Principles of Molecular , Cellular and .*
- [40] J. C. Wallace, S. Jitrapakdee, and A. Chapman-Smith, "Pyruvate carboxylase," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 30, no. 1, pp. 1–5, 1998.
- [41] A. C. H. Yu, J. Drejer, L. Hertz, and A. Schousboe, "Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons.," *Journal of Neurochemistry*, vol. 41, no. 5. pp. 1484–1487, 1983.
- [42] R. P. Shank, G. S. Bennett, S. O. Freytag, and G. L. M. Campbell, "Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools," *Brain Res.*, vol. 329, no. 1–2, pp. 364–367, 1985.
- [43] G. M. Kurz, H. Wiesinger, and B. Hamprecht, "Purification of Cytosolic Malic Enzyme from Bovine Brain, Generation of Monoclonal Antibodies, and Immunocytochemical Localization of the Enzyme in Glial Cells of Neural Primary Cultures," *J. Neurochem.*, vol. 60, no. 4, pp. 1467–1474, 1993.
- [44] M. Cesar and B. Hamprecht, "Immunocytochemical Examination of Neural Rat and Mouse Primary Cultures Using Monoclonal Antibodies Raised Against

- Pyruvate Carboxylase," *J. Neurochem.*, vol. 64, no. 5, pp. 2312–2318, 1995.
- [45] M. C. McKenna, J. T. Tildon, J. H. Stevenson, X. Huang, and K. G. Kingwell, "Regulation of mitochondrial and cytosolic malic enzymes from cultured rat brain astrocytes," *Neurochem. Res.*, vol. 20, no. 12, pp. 1491–1501, 1995.
- [46] R. Vogel, B. Hamprecht, and H. Wiesinger, "Malic enzyme isoforms in astrocytes: Comparative study on activities in rat brain tissue and astroglia-rich primary cultures," *Neurosci. Lett.*, vol. 247, no. 2–3, pp. 123–126, 1998.
- [47] R. Vogel, G. Jennemann, J. Seitz, H. Wiesinger, and B. Hamprecht, "Mitochondrial malic enzyme: purification from bovine brain, generation of an antiserum, and immunocytochemical localization in neurons of rat brain," *J Neurochem*, vol. 71, no. 2, pp. 844–852, 1998.
- [48] R. Murin, M. Cesar, B. S. Kowtharapu, S. Verleysdonk, and B. Hamprecht, "Expression of pyruvate carboxylase in cultured oligodendroglial, microglial and ependymal cells," *Neurochem. Res.*, vol. 34, no. 3, pp. 480–489, 2009.
- [49] J. Hirrlinger, J. König, and R. Dringen, "Expression of mRNAs of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones," *J. Neurochem.*, vol. 82, no. 3, pp. 716–719, 2002.
- [50] K. Richter, B. Hamprecht, and H. Scheich, "Ultrastructural localization of glycogen phosphorylase predominantly in astrocytes of the gerbil brain," *Glia*, vol. 17, no. 4, pp. 263–273, 1996.
- [51] H. M. Sickmann *et al.*, "Brain glycogen and its role in supporting glutamate and GABA homeostasis in a type 2 diabetes rat model," *Neurochem. Int.*, vol. 42, no. 1, pp. 267–275, 2013.
- [52] J. Xu *et al.*, "Role of Glycogenolysis in Stimulation of ATP Release from Cultured Mouse Astrocytes by Transmitters and High K⁺ Concentrations," *ASN Neuro*, vol. 6, no. 1, p. AN20130040, 2013.
- [53] L. Hertz, J. Xu, D. Song, T. Du, E. Yan, and L. Peng, "Brain glycogenolysis, adrenoceptors, pyruvate carboxylase, Na⁺,K⁺-ATPase and Marie E. Gibbs' pioneering learning studies," *Front. Integr. Neurosci.*, vol. 7, no. April, pp. 1–7,

2013.

- [54] E. M. F. Brekke, A. B. Walls, A. Schousboe, H. S. Waagepetersen, and U. Sonnewald, "Quantitative importance of the pentose phosphate pathway determined by incorporation of ^{13}C from 2- ^{13}C - and 3- ^{13}C -glucose into TCA cycle intermediates and neurotransmitter amino acids in functionally intact neurons," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 32, no. 9, pp. 1788–1799, 2012.
- [55] J. Edmond, R. A. Robbins, J. D. Bergstrom, R. A. Cole, and J. de Vellis, "Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture," *J. Neurosci. Res.*, vol. 18, no. 4, pp. 551–561, 1987.
- [56] J. E. C. Sykes, M. Lopes-Cardozo, and S. G. Van Den Bergh, "Substrate utilization for energy production and lipid synthesis in oligodendrocyte-enriched cultures prepared from rat brain," *Neurochem. Int.*, vol. 8, no. 1, pp. 67–75, 1986.
- [57] A. I. Amaral, T. W. Meisingset, M. R. Kotter, and U. Sonnewald, "Metabolic aspects of Neuron-Oligodendrocyte-Astrocyte interactions," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 4, no. MAY, pp. 1–5, 2013.
- [58] J. L. Goldstein and M. S. Brown, "Regulation of the mevalonate pathway," *Nature*, vol. 343, no. 6257, pp. 425–430, 1990.
- [59] Y. Zheng and Y. Jiang, "mTOR Inhibitors at a Glance," *Mol. Cell. Pharmacol.*, vol. 7, no. 2, pp. 15–20, 2016.
- [60] J. Huang, "A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 37, no. Pt 1, pp. 217–222, 2009.
- [61] Y. Chen, J. Qian, Q. He, H. Zhao, and L. Toral-barza, "through ATP citrate lyase in HER2 / PIK3CA-hyperactive breast cancer," vol. 7, no. 18, 2016.
- [62] N. Cybulski, P. Polak, J. Auwerx, M. A. Ruegg, and M. N. Hall, "mTOR complex 2 in adipose tissue negatively controls whole-body growth," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 24, pp. 9902–9907, 2009.
- [63] A. Kumar *et al.*, "Fat cell-specific ablation of rictor in mice impairs insulin-

- regulated fat cell and whole-body glucose and lipid metabolism," *Diabetes*, vol. 59, no. 6, pp. 1397–1406, 2010.
- [64] Y. Yao *et al.*, "BSTA promotes mTORC2-mediated phosphorylation of Akt1 to suppress expression of FoxC2 and stimulate adipocyte differentiation," *Sci. Signal.*, vol. 6, no. 257, pp. 1–13, 2013.
- [65] P. Polak, N. Cybulski, J. N. Feige, J. Auwerx, M. A. Rüegg, and M. N. Hall, "Adipose-Specific Knockout of raptor Results in Lean Mice with Enhanced Mitochondrial Respiration," *Cell Metab.*, vol. 8, no. 5, pp. 399–410, 2008.
- [66] A. I. Flores *et al.*, "Akt-mediated survival of oligodendrocytes induced by neuregulins," *J. Neurosci.*, vol. 20, no. 20, pp. 7622–30, 2000.
- [67] A. I. Flores *et al.*, "Constitutively Active Akt Induces Enhanced Myelination in the CNS," *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 28, pp. 7174–7183, 2008.
- [68] S. P. Narayanan, A. I. Flores, F. Wang, and W. B. Macklin, "Akt Signals through the Mammalian Target of Rapamycin Pathway to Regulate CNS Myelination," *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 21, pp. 6860–6870, 2009.
- [69] W. A. Tyler *et al.*, "Activation of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Is Essential for Oligodendrocyte Differentiation," *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 19, pp. 6367–6378, 2009.
- [70] S. L. Fyffe-Maricich, J. C. Karlo, G. E. Landreth, and R. H. Miller, "The ERK2 Mitogen-Activated Protein Kinase Regulates the Timing of Oligodendrocyte Differentiation," *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 3, pp. 843–850, 2011.
- [71] A. Ishii, S. L. Fyffe-Maricich, M. Furusho, R. H. Miller, and R. Bansal, "ERK1/ERK2 MAPK Signaling is Required to Increase Myelin Thickness Independent of Oligodendrocyte Differentiation and Initiation of Myelination," *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 26, pp. 8855–8864, 2012.
- [72] H. M. Guardiola-Diaz, A. Ishii, and R. Bansal, "Erk1/2 MAPK and mTOR signaling sequentially regulates progression through distinct stages of oligodendrocyte differentiation," *Glia*, vol. 60, no. 3, pp. 476–486, 2012.

- [73] A. Ishii, M. Furusho, and R. Bansal, "Sustained Activation of ERK1/2 MAPK in Oligodendrocytes and Schwann Cells Enhances Myelin Growth and Stimulates Oligodendrocyte Progenitor Expansion," *J. Neurosci.*, vol. 33, no. 1, pp. 175–186, 2013.
- [74] J. Dai, K. K. Bercury, and W. B. Macklin, "Interaction of mTOR and Erk1/2 signaling to regulate oligodendrocyte differentiation," *Glia*, vol. 62, no. 12, pp. 2096–2109, 2014.
- [75] W. F. Alsanie, J. C. Niclis, and S. Petratos, "Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocytes: Protocols and Perspectives," *Stem Cells Dev.*, vol. 22, no. 18, pp. 2459–2476, 2013.
- [76] R. Cristofani *et al.*, "Inhibition of retrograde transport modulates misfolded protein accumulation and clearance in motoneuron diseases," *Autophagy*, vol. 13, no. 8, pp. 1280–1303, 2017.
- [77] T. Nakaya and M. Maragkakis, "Amyotrophic Lateral Sclerosis associated FUS mutation shortens mitochondria and induces neurotoxicity," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–15, 2018.
- [78] M. Joerger-Messerli *et al.*, "Preeclampsia enhances neuroglial marker expression in umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells," *J. Matern. Neonatal Med.*, vol. 28, no. 4, pp. 464–469, 2015.
- [79] G. Chen *et al.*, "Comparison of biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from maternal-origin placenta and Wharton's jelly," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–7, 2015.
- [80] Y. Zhang *et al.*, "The effects of human Wharton's jelly cell transplantation on the intervertebral disc in a canine disc degeneration model," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–15, 2015.
- [81] Y.-S. Fu *et al.*, "Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly to Dopaminergic Neurons In Vitro: Potential Therapeutic Application for Parkinsonism," *Stem Cells*, vol. 24, no. 1, pp. 115–124, 2006.
- [82] N. Kozubenko *et al.*, "Analysis of in vitro and in vivo characteristics of human

- embryonic stem cell-derived neural precursors," *Cell Transplant.*, vol. 19, no. 4, pp. 471–486, 2010.
- [83] P. Itsykson *et al.*, "Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 30, no. 1, pp. 24–36, 2005.
- [84] C. Leite *et al.*, "Differentiation of human umbilical cord matrix mesenchymal stem cells into neural-like progenitor cells and maturation into an oligodendroglial-like lineage," *PLoS One*, vol. 9, no. 10, 2014.
- [85] M. Messerli *et al.*, "Stem cells from umbilical cord Wharton's jelly from preterm birth have neuroglial differentiation potential," *Reprod. Sci.*, vol. 20, no. 12, pp. 1455–1464, 2013.
- [86] P. Salehinejad *et al.*, "Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly," *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.*, vol. 48, no. 2, pp. 75–83, 2012.
- [87] J. Lim, Z. R. M. Razi, J. Law, A. M. Nawi, R. B. H. Idrus, and M. H. Ng, "MSCs can be differentially isolated from maternal, middle and fetal segments of the human umbilical cord," *Cytotherapy*, vol. 18, no. 12, pp. 1493–1502, 2016.
- [88] F. Pietrocola, L. Galluzzi, J. M. Bravo-San Pedro, F. Madeo, and G. Kroemer, "Acetyl coenzyme A: A central metabolite and second messenger," *Cell Metab.*, vol. 21, no. 6, pp. 805–821, 2015.
- [89] L. Wang *et al.*, "Fatty acid synthesis is critical for stem cell pluripotency via promoting mitochondrial fission," *EMBO J.*, vol. 36, no. 10, pp. 1330–1347, 2017.
- [90] P. Mews, G. Donahue, A. M. Drake, V. Luczak, T. Abel, and S. L. Berger, "Acetyl-CoA synthetase regulates histone acetylation and hippocampal memory," *Nature*, vol. 546, no. 7658, pp. 381–386, 2017.

8. EKLER

8.1. EK-1 GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

Bu form **“Nöroglial Farklılaşma Sürecinde Akt -AMP kinaz ve mTOR Aracılı Asetil Ko A ve İlişkili Metabolit Değişimlerinin Belirlenmesi”** başlıklı çalışmamıza katılacak gönüllüler için düzenlenmiştir.

Kök hücre, işlevsel olarak farklılaşmamış, yani vücudun herhangi bir organ ya da dokusunda özel bir görev yapabilmek için tam olarak olgunlaşmamış karmaşık bir yapısı olan öncül bir hücredir. Bununla birlikte bu öncül hücre bedenin başka hücrelerine dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Bu hücreler, kemik iliğinden elde edildiği gibi, göbek kordonundan da elde edilebilir. Bu araştırmada amacımız göbek kordonunu oluşturan Wharton jölesi olarak isimlendirilen dokudan kök hücre elde etmek ve elde edilen bu kök hücreleri nöron ve nöronal destek hücrelerine farklılaştırmak, bu farklılaşmaya değişik moleküllerin etkisini incelemektir.

Bu projede elde edilecek yeni bilgiler, ileride, vücuttaki hasarlı bir dokunun yenilenmesi için tedavi amaçlı kullanılabilecek hücrelerin eldesinde kullanılabilecektir.

Çalışmaya normal gebelik seyri olan, sezaryen ile temrinde 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 sonuçları sizle 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 ETİK KURUL ONAYI

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2017/12-30	Tarih:18.05.2017				
	Prof.Dr.Pınar AKAN'ın sorumlusu olduğu "Nöroglial Farklılaşma Sürecinde Akt-AMP Kinaz ve mTOR Aracılı Asetil KoA ve İlişkili Metabolit Değişimlerinin 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.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

8.3. EK-3 ÖZGEÇMİŞ

RAMAZAN UĞUR BORA

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası: 27188071868

Doğum Tarihi: 09/04/1991

İletişim Adresi: Muammer Akar Mah. 47 Sk. No.23 D.9

Telefon: (535) 523 22 24

E-posta: rug.bora@gmail.com

ugur.bora@ogr.deu.edu.tr

Web Adresi

Eğitim Bilgileri 01 Eylül 2015 - Bu Anda (3 yıl 5 ay)

Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL SİNİRBİLİMLER (YL) (TEZLİ) Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.33 / 4.0

01 Eylül 2009 - 01 Ocak 2015 (5 yıl 5 ay)

Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE

FEN FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

Diploma Numarası: 2014/04/0101

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.33 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Ar-Ge Yetkinlik

Bildiriler R. U. BORA, P. AKAN, Ö. TEZCAN, T. İAN & 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.

Ö.TEZCAN, R.U.BORA, P.AKAN, D.ÖZTEKİN & K.BAYSAL, Characterization Of Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells From The Human Umbilical Cord And Investigation Of The Role Of Cellular Metabolism On Their In Vitro Differentiation, Poster Sunumu, The 41nd Febs Congress, 03 Eylül 2016, 08 Eylül 2016, 283, S1, 1 - 441.

P. AKAN, Ö. GÜRSOY ÇALAN, R. U. BORA & A. S. KOÇTÜRK, The Effects Of Nmda Receptor Subunits And Cholesterol On Amyloid Beta Toxicity In Shsy-5y Cells, Poster Sunumu, 1st International Cell Death Research Congress, 04 Mayıs 2016, 07 Mayıs 2016.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri 115S355, EMA (Expert Meeting On Neonatal And Pediatric Sepsis Consensus

2010) Kriterleri Yenidoğan Sepsisini Öngörmede Geçerli Midir? Yeni Kriterlere Gereksinim Var Mıdır?, 1001 - Araştırma, Burslu, Yürürlükte, SBAG - Sağlık Bilisimleri Araştırma Destek Grubu, ARDEB, 10.03.2015, 29.05.2017 - 01.10.2015 - 01.10.2018.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı

İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı

Raportörlük Sayısı

ARDEB/BİDEB 0

ARDEB/BİDEB 0

ARDEB/BİDEB 0

TEYDEB 0

TEYDEB 0

TEYDEB 0

Toplam 0

Toplam 0

Toplam 0