

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROLAKTİN GENİ AKTARILMIŞ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN UYARILMIŞ KONDROSİT APOPTOZU ÜZERİNE
ENGELLEYİCİ ETKİSİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

Nilbeste BEKİROĞLU

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliği'nin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ
2016

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROLAKTİN GENİ AKTARILMIŞ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN UYARILMIŞ KONDROSİT APOPTOZU ÜZERİNE
ENGELLEYİCİ ETKİSİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

Nilbeste BEKİROĞLU

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliği'nin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gülçin GACAR
TÜBİTAK Proje No: 114S154
Etik Kurul No: KOÜ KAEK 2014/195

KOCAELİ
2016

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

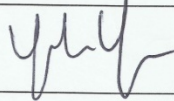
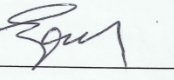
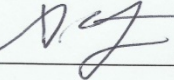
(Tez Onay Sayfası)

Tez adı: Prolaktin geni aktarılmış mezenkimal kök hücrelerin uyarılmış kondrosit apoptozu üzerine engelleyici etkisinin in vitro araştırılması

Tez yazarı: Nilbeste Bekiroğlu
Tez savunma tarihi: 23.06.2016

Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Gülçin Gacar

İş bu çalışma Jürimiz tarafından Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı		İmzası
Üye	Doç. Dr. Yusufhan Yazır	
Üye	Yard. Doç. Dr. Gülçin Gacar	
Üye	Yard. Doç. Dr. Alev Cumbul	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../20

Prof. Dr. Mustafa Yıldız
Enstitü Müdürü

ÖZET

Prolaktin Geni Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerin Uyarılmış Kondrosit Apoptozu Üzerine Engelleyici Etkisinin *In Vitro* Araştırılması

AMAÇ: Prolaktin (PRL) ön hipofiz bezinden ve diğer organlardan salgılanan antiapoptotik ve mitojenik özellik gösteren bir hormondur. Mezenkimal kök hücreler (MKH) de antiapoptotik özellik gösteren bir kök hücre grubudur. Osteoartrit ve romatoid artrit gibi hastalıklarda gerçekleşen kondrosit apoptozuna karşı MKH ve PRL kullanımını içeren klinik yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu çalışmayla PRL geni aktarılmış MKH'lerin (PKİ-MKH) kondrosit apoptozuna karşı etkisinin *in vitro* ortamda araştırılması ve ortak kültür yönteminin irdelenmesi hedeflenmiştir.

YÖNTEM: PRL geni elektroporasyonla kemik iliğinden türetilmiş MKH'lere aktarıldı. TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ 'dan oluşan bir apoptoz sinyali hazırlandı. 6 kuyucuklu kültür kaplarına kondrosit hücreleri (hCA), ayırıcı membranlara da MKH ve PKİ-MKH ekildi. Apoptoz sinyalleri ile birlikte 7 gün boyunca kültüre edildi. Kültürün 1. ve 7. günlerinde morfolojik gözlemler, ELISA ve BCA analizleri ile anneksin V analizi birlikte değerlendirildi.

BULGULAR: Gen aktarımı sonunda hücrelerin kök hücre morfolojilerini ve koloni oluşturma potansiyellerini koruduğu gösterildi. Ortak kültür sonunda MKH ve PKİ-MKH grubu hücrelerde apoptotik cisimciklere rastlandı. Hücrelerdeki nekrozun ilk güne nazaran kontrol, MKH ve PKİ-MKH gruplarında sırasıyla 2,03, 3,5 ve 1,73 katına çıktığı tespit edildi. PKİ-MKH'lerin metabolizmasının MKH'lere göre artmış olduğu bulundu.

SONUÇ: PKİ-MKH'ler hem kök hücre özelliklerini hem de antiapoptotik özelliklerini korumuşlardır. PRL hücre ölümünü düzenleyerek hücreleri nekrozdan korudukları sonucuna varılmıştır. Ortak kültür koşullarının iyi tanımlanması ile bu hücrelerin *in vitro*daki davranışları anlaşılabilir, daha sonra da *in vivo*daki kullanımları araştırılabilir. Hücreler ileride apoptoz çalışmalarında ve klinikte kullanılmaya aday hücrelerdir.

Anahtar kelimeler: kondrositler, mezenkimal kök hücreler, ortak kültür, apoptoz, gen aktarımı

İNGİLİZCE ÖZET

***In Vitro* Study of Prolactin Gene Transferred Mesenchymal Stem Cells Against Induced Chondrocyte Apoptosis**

OBJECTIVE: Prolactin (PRL) is a hormone with anti-apoptotic and mitogenic characteristics which is secreting from pituitary gland and other organs. Mesenchymal stem cells (MSC) are a group of stem cells with antiapoptotic features. There are some clinical approaches including usage of MSCs and PRL against chondrocyte apoptosis in diseases such as osteoarthritis and rheumatoid arthritis. With this study, it is aimed to investigate the *in vitro* effects of PRL gene transferred MSCs (PBM-MSCs) against chondrocyte apoptosis and to examine co-culture method.

METHOD: PRL gene has transferred to bone marrow derived-MSCs via using electroporation. An apoptosis signal including TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ has prepared. Chondrocytes (hCAs) were seeded onto 6 well culture flasks while MSCs and PBM-MSCs seeded onto inserts. The cells were cultured for 7 days with apoptosis signals. At the days of 1st and 7th, morphological observations, ELISA and BCA assays were evaluated with annexin V data.

RESULTS: It is shown that after gene transfer the cells still keep their stem cell morphologies and potential of colony forming. At the end of co-culture, apoptotic bodies were seen in the groups of MSCs and PBM-MSCs. Necrosis occurring the cells was determined in control, MSC and PBM-MSC groups as 2,03, 3,5 and 1,73 fold, respectively. It is found out that PBM-MSCs have a faster metabolism comparing with MSCs.

CONCLUSIONS: PBM-MSCs kept both their stem cell characters and anti-apoptotic features. It is reached a conclusion of PRL keeps the cells away while regulating the cell death. With a good defining of co-culture conditions, their habits *in vitro* may be understood and their usage *in vivo* may be studied. These cells are a good candidate of apoptosis researches and clinical experiments.

Keywords: chondrocytes, mesenchymal stem cells, co-culture, apoptosis, gene transfer

TEŞEKKÜR

Öncelikle bizleri hayata hazırlayan, değerli katkılarını hiçbir zaman bizlerden esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Doç. Dr. Yusufhan YAZIR' a ve gıyabında tüm KÖGEM ailesine çok teşekkür ederim.

Bana yalnız tez danışmanlığı değil aynı zamanda annelik yapan, evinin kapılarını bana açan, beraber gülüp eğlendiğimiz, günleri geceleri birlikte ettiğimiz değerli hocam Yrd. Doç. Gülçin GACAR' a ve bölümümüzde bile olmamasına rağmen babalığını benden hiç esirgemeyen, beni kendi kızlarından ayırmadığını her daim hissettiğim, çok değerli Prof. Dr. Nejat GACAR' a en büyük minnetlerimi sunarım.

Gerek tezde, gerek projeyi oluşturma aşamasında, gerekse günlük hayat dertleriyle boğuşma esnasında deneyimlerini benimle paylaşan çok sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU' ya çok çok teşekkür ederim.

Lisans yıllarımdan itibaren dostluklarını hiç esirgemeyen, daha da uzun yıllar birlikte olacağımızı bildiğim "Biyolomühler" (alfabetik sıra ile) Aygöl, Belma, Benan, Berhan, Bilge, Hati, Kezban, Özlem ve Sinem' e sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İçime sevgiyi ve güzelliği en temelinde yerleştirdiği, bana önce kendi davranışlarıyla örnek olduğu, bilimsel çalışmalarla ve akademik dünyanın zorluklarıyla ilgili öğütlerini asla esirgemeyen, hem annem hem hocam Prof. Dr. Nazan BEKİROĞLU' ya; aynı annem gibi yüreğime sevgiyi ve iyiliği koyan, doğru insan olmanın bu dünyadaki timsali olmanın yanı sıra küçük yaşında beni biyoloji ve kimya laboratuvarlarına sokarak şu an olduğum yerin temelini en baştan atan sevgili babam Ziraat Yük. Müh. Yılmaz BEKİROĞLU' ya; mantığına ve espritüel zekâsına her daim hayranlık beslediğim, son dört yılda çok özlediğim sevgili ablam Leyla Didar BEKİROĞLU ve çok sevgili abim Feyyaz ÖZYAZICI' ya ailem oldukları için kendimi çok şanslı hissettiğimi belirtmek isterim.

Tezimi kaybetmemi engelleyen teknolojik gelişmelerle beni tanıştıran, tezi bitirme sürecimde desteğini hep hissettiğim, hayatımdaki varlığına günbegün daha da şükrettiğim değerli arkadaşım Bil. Müh. Süha BONCUKÇU' ya en güzel teşekkürlerimi sunarım.

Ancak en özel teşekkürlerimi yağmur çamur, dağ taş, gece gündüz demeden tüm çilemi çekendört tekerime, renkli ve fosforlu kalemlerime, kâğıtlarım ve defterlerime, yazıcıma, klasörlerime ve artık format zamanı gelmiş olan bilgisayarlarıma etmek isterim.

Bu tez çalışması, 114S154 proje numarasıyla TÜBİTAK tarafından desteklenmiş olup ilgili bütün yayınlar proje çıktısı olarak değerlendirilecektir.

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

..... / 06 / 2015

Nilbeste BEKİROĞLU

İmza

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET	v
TEŞEKKÜR	vi
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ÇİZİMLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
DENKLEMLER DİZİNİ.....	xx
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Hücre Ölümleri: Apoptoz ve Nekroz.....	1
1.1.1. Apoptoz	1
1.1.2. Nekroz	3
1.2. İskelet - Kas Sistemi Rahatsızlıkları.....	4
1.2.1. Osteoartrit	4
1.2.2. Romatoid Artrit	5
1.2.3. Tedavi yaklaşımları	6
1.3. Prolaktin	7
1.3.1. Prolaktin Sinyal Yolağı	9
1.3.2. PRL' in Hücreler Üzerindeki Etkileri.....	12
1.3.3. Prolaktin ile Hastalıklar Arasındaki İlişki	13
1.4. Kök Hücreler	14
1.4.1. Genel Özellikleri.....	14
1.4.2. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	14
1.4.3. Klinikte Kök Hücreler	18
Gen Aktarım Yöntemleri	19
1.4.4. Mezenkimal Kök Hücreler	21
Mezenkimal kök hücrelerin özellikleri.....	22
1.5. PRL' in MKH' ler üzerine etkileri	23
2. AMAÇ	24

3.	YÖNTEM	25
3.1.	Seçilen Gen: Prolaktin (PRL)	25
3.2.	Seçilen Vektör: N-terminal pFLAG-CMV-3	26
3.3.	PRL' in Klonlanması	28
3.4.	Gen Aktarımı ve Ortak Kültür İçin Hücrelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonları.....	33
3.4.1.	Mezenkimal Kök Hücreler	33
	Osteojenik farklılaşma ve hücrelerin fiksasyonu.....	34
	Alizarin red S boyaması	34
	Adipojenik farklılaşma ve hücrelerin fiksasyonu.....	34
	Oil red O boyaması.....	34
3.4.2.	Kondrositler	35
	İmmunfloresan boyamalar	35
	Hücre döngüsü analizi	356
3.5.	Gen Aktarımı	37
3.6.	Apoptoz Optimizasyonu	38
3.6.1.	WST-1 Analizi.....	38
3.7.	Ortak Kültür.....	40
3.8.	Ortak Kültür Sonrası Testler.....	42
3.8.1.	ELISA.....	42
3.8.2.	Bisinkoninik Asit (BCA) Analizi ile Toplam Protein Tayini.....	43
3.8.4.	Anneksin V Analizi	44
4.	BULGULAR	46
4.1.	Hücreler ve Karakterizasyonlarına Ait Görüntüler	46
4.1.1.	Mezenkimal Kök Hücreler	46
4.1.2.	Kondrositler	49
4.2.	PRL' in Klonlanması	52
4.2.1.	Q5 DNA Polimerazla PRL' in Çoğaltılmasına Ait PCR Ürünlerinin Jel Görüntüsü	52
4.2.2.	Restriksiyon Enzim Kesimiyle <i>Insert</i> ve Vektörün Hazırlanması.....	53
4.2.3.	Ligasyon Ürünüyle Transforme Edilen Hücrelerin Katı Agar ve LB Broth Besiyerlerindeki Koloni Görüntüleri	54
4.2.4.	Dolu Plazmidlerin PCR ile Tespitine Ait Jel Görüntüsü.....	55
4.2.5.	Yön Tayini Jel Görüntüsü	56

4.3.	Gen Aktarımı Sonrası Hücre Görüntüleri.....	57
4.4.	Apoptoz Optimizasyonu WST-1 Sonuçları ve Grafikleri.....	58
4.5.	Ortak Kültür Sonrası.....	60
4.5.1.	Morfolojik Gözlemler.....	60
4.5.2.	ELISA ve BCA Sonuçları	64
4.5.3.	Anneksin V Analizi Sonuçları.....	66
5.	TARTIŞMA.....	72
6.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	80
KAYNAKLAR.....		82
EKLER		91
ÖZGEÇMİŞ.....		93



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µm: Mikrometre

µM: Mikromolar

ACPA: Römatooid faktör ve antisitrülin protein antikorları

Akt: Protein kinaz B

amp: Ampisilin

APH(3')-II: Aminoglikozid 3' fosfotransferaz

BCA: Bisinkoninik asit

BMP: Kemik morfogenez protein

bp: baz çifti

BSA: Bovin serum albümin

Ca²⁺: Kalsiyum iyonu

CBP: CREB bağlayıcı protein

CD: Ayrım kümesi (*cluster of differentiation*)

CEBP-beta: CCAAT *enhancer* bağlayan protein-beta

CMV: Sitomegalovirüs

COL1A1: Tip 1 kollajen

COL2A1: Tip 2 kollajen

CoRE: Kompozit yanıt elementi

CREB: cAMP yanıt elementine bağlanan protein

CSF: Koloni uyarıcı faktör

CTGF: Bağ doku büyüme faktörü

DAPI: 4',6 diamidino -2- fenilindol

ddH₂O: Bidistile su

DEAE: Dietil aminoetil

dH₂O: Distile su

dk: Dakika

DMD: Duchenne musküler distrofisi

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMEM-F12: *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksinükleotid trifosfat
EGF: Epidermal büyüme faktörü
ELISA: Enzim bağlı immunosorbent analizi (*enzyme-linked immunosorbent analysis*)
ERK: Hücre dışı sinyallerle düzenlenen kinazlar
FBS: Fetal bovin serumu
FGF: Fibroblast büyüme faktörü
FITC: Floresan izotiyosiyanat
Fyn: Src ailesi tirozin-protein kinaz
G418: Genetisin
GAG: Glikozaminoglikan
GAS: İnterferon gama tarafından aktive edilen dizi
GD: Graves hastalığı
GM-CSF: Granülosit/makrofaj koloni uyarıcı faktör
GR: Glukokortikoid reseptörü
GRB-2: Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein-2
GVHD: *Graft-versus-host* hastalığı
hCA: İnsan artiküler kondrosit hücreleri
HGF: Hepatosit büyüme faktörü
HGF: Hepatosit büyüme faktörü
HLA: İnsan lökosit antijeni
HPRL: Hiperprolaktinemi
HRP: *Horse radish* peroksidaz
HT: Hashimoto tiroidi
IBMX: 3-izobütil 1-metilksantin
IBMX: 3-izobütil-1-metilksantin
IDO: İndolamin 2,3-dioksijenaz
IFN: İnterferon
IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL: İnterlökin
ILGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IRS: İnsülin reseptör substratı
iNOS: İndüklenebilen nitrik oksit sentaz
iPSC: Uyarılmış pluripotent kök hücre (*induced pluripotent stem cell*)
JAK: *Janus* kinaz

kb: Kilobaz
Kİ-MKH: İnsan kemik iliğinden türetilmiş mezenkimal kök hücre
LIF: Lösemi inhibitör faktörü
MAPK: Mitojenlerce aktive edilen protein kinaz
MAPK: Mitojenlerle aktive edilen protein kinaz
MEK: MAPK/ERK kinaz
mg: Miligram
Mg²⁺:Magnezyum iyonu
MgCl₂: Magnezyum klorür
MHC: Majör histokompatibilite
MKH: Mezenkimal kök hücre
MKH: Mezenkimal kök hücre
ml: Mililitre
mM: Milimolar
MMP: Matriks metaloproteinazları
mRNA: *Messenger RNA*
ms: Milisaniye
MS: Multiple skleroz
MSC: Çoklu klonlama bölgesi
mTOR: Rapamisin'in mekanistik hedefi
NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NEAA: Temel olmayan aminoasit
neo: Neomisin
ng: Nanogram
NK: Doğal öldürücü hücre
nm: Nanometre
NMI: N-Myc (ve STAT) interaktörü protein
NMR: Nükleer manyetik rezonans
npt II: Aminoglikozid 3' fosfotransferaz
OA: Osteoartrit
OA: Osteoartrit
°C: derece Celcius
ORF: *Open reading frame*
PBS: *Phosphate buffered saline*

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF: Trombositten türetilen büyüme faktörü
PE: Polietilen
PET: Polietilen tereftalat
PFA: Paraformaldehit
PGE: Prostaglandin E
PI: Propidyum iyodid
PI3K: Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz
PKB: Protein kinaz B
PKB: Protein kinaz B
PKİ-MKH: Prolaktin geni aktarılmış, kemik iliğinden türetilmiş mezenkimal kök hücre
PLC- γ : Fosfolipaz C-gama
PRF: Trombositçe zengin fibrin (*platelet-rich-fibrin*)
PRL: Prolaktin
PRLR: Prolaktin reseptörü
PRP: Trombositçe zengin plazma (*platelet-rich-plasma*)
PS: Fosfatidilserin
qRT-PCR: Kantitatif *real time* polimeraz zincir reaksiyonu
RA: Rوماتoid artrit
RA: Rوماتoid artrit
Raf: “*Rapidly accelerated fibrosarcoma*”
Ras: “*Rat sarcoma*”
RNA: Ribonükleik asit
RNaz: RNA'yı yıkan enzim
rpm: devir, *round per minute*
Ser: Serin aminoasiti
SFK: Src ailesi kinaz
SH2: Src homoloğu
SHC: Src homoloğu 2 bölgesini içeren transforme edici protein
SHP2: SH2 bölgesi içeren protein tirozin fosfataz
SLE: Sistemik lupus eritematozus
SOC: *Super optimal catabolite repression*
SOCS: Sitokin sinyal iletiminin baskılayıcısı (*suppressor of cytokine signaling*)
SOS: *Son of sevenless* proteini

Sox9: *SRY (Sex Determining Region Y)-Box 9*

SS: Sjörger sendromu

STAT: Sinyal çeviricileri ve transkripsiyon aktivatörleri (*signal transducers and activators of transcription*)

T1D: Tip 1 diyabet

TAE: Tris asetat EDTA

TCF: T hücre faktörü

TEM: Taramalı elektron mikroskobu

TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü- β

T_m: Erime sıcaklığı

TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TNF: Tümör nekroz faktör

Treg: T regülatör hücre

TRH: Tirotropin salgılayan hormon

Trp: Triptofan aminoasiti

UTR: Translasyona uğramayan bölge

V: Volt

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

WST-1: Suda çözünebilen tetrazolyum tuzu-1 (*Water-soluble tetrazolium salt-1*)

x g: Ayırıştırma kuvveti, relatif santrifüj kuvveti (RCF)

α -MEM: *Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification*

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Apoptozda rol oynayan ana mekanizmalar	2
Çizim 1.2 Kondrosit apoptozu	4
Çizim 1.3 Römatooid artrit ve osteoartritte kırıldaktaki yıkıcı metalloproteinazların hücresel kaynakları	5
Çizim 1.4. PRP ile sağlanan biyosinyal molekülleri ve etkiledikleri hücrelerden bazıları ..	7
Çizim 1.5. İnsan prolaktininin çözünebilen formu	8
Çizim 1.6 Prolaktin sinyal yolları	10
Çizim 1.7 Kök hücrelerin potansiyel kullanım alanları	14
Çizim 1.8 Kaynaklarına göre kök hücreler	15
Çizim 1.9 İnsan embriyonik kök hücre plastisitesi	16
Çizim 1.10 Kaynaklarına göre kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin karşılaştırması	17
Çizim 1.11. İndüklenmiş pluripotent kök hücre	18
Çizim 1.12. Kök hücrelerin klinikte alternatif kullanılma yolları	19
Çizim 1.13 Mezenkimal kök hücre plastisitesi	21
Çizim 1.14 Mezenkimal kök hücrelerin parakrin etkileri	22
Çizim 3.1. PRL geninin insan kromozomu üzerindeki yeri	25
Çizim 3.2. PRL' in temin edildiği plazmidin yapısı	25
Çizim 3.3. N-terminal pFLAG-CMV-3 ekspresyon vektörüne ait harita	27
Çizim 3.4. FLAG peptid dizisi	26
Çizim 3.5. Penisilinde β -laktam halkasının β -laktamaz tarafından kırılmasının şematik gösterimi	26
Çizim 3.6. Genetisinin (G418) yapı formülü	28
Çizim 3.7. PRL mRNA varyant 2' ye ait gen dizisi üzerinde restriksiyon enzim kesim bölgelerinin gösterimi	28
Çizim 3.8. Yön tayini için kullanılan tüm primerler ve genin vektör üzerindeki yerinin bir arada gösterimi	32
Çizim 3.9. Hücre siklusu ve kontrol noktaları	38
Çizim 3.10. Tetrazolyum tuzunun formazana parçalanması	39
Çizim 3.11. Ortak kültür elemanları	41
Çizim 3.12. Ortak kültür gruplarının şematize gösterimi	42
Çizim 3.13. Sandviç ELISA yönteminin prensibi	43

Çizim 3.14. BCA analizinin temelini oluşturan reaksiyonun gösterimi	44
Çizim 3.15. Anneksin V boyamasının prensibi	45
Çizim 4.1. MKH' lerin kültür ortamında alınan görüntüleri	46
Çizim 4.2. Osteojenik farklılaşmaya sürüklenen MKH' lerin kültür ortamında alınan görüntüleri	46
Çizim 4.3. Adipojenik farklılaşmaya sürüklenen MKH' lerin kültür ortamında alınan görüntüleri	47
Çizim 4.4. MKH' lerin yüzey belirteçleri ile sitoplazmik belirteçlerine göre akım sitometri cihazı ile elde edilmiş sonuçlarına ait grafik	48
Çizim 4.5. hCA' ların kültür ortamında alınan görüntüleri	50
Çizim 4.6. İmmunfloresan olarak boyanan hCA' lara ait görüntüler	50
Çizim 4.7. Sıvı azotta bulunan hCA' ların çözdürülmesi sonrası gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi verileri	51
Çizim 4.8. Sıvı azotta bulunan hCA' ların çözdürülmesi sonrası gerçekleştirilen anneksin V analizi verileri	51
Çizim 4.9. PCR ürünlerinin yüklendiği jele ait görüntü	52
Çizim 4.10. N-terminal pFLAG-CMV-3 vektörünün kesim ürününe ait jel görüntüsü	53
Çizim 4.11. PRL' in kesim ürününe ait jel görüntüsü	53
Çizim 4.12. Transforme edilen hücrelerin ampisilinli katı agardaki koloni görüntüsü	54
Çizim 4.13. Transforme edilen hücrelerin ampisilinli LB Broth sıvı besiyerinde çoğalmalarına ait görüntüsü	54
Çizim 4.14. Dolu plazmidlerin tespiti için gerçekleştirilen koloni PCR jel görüntüsü	55
Çizim 4.15. Yön tayini için kurulan PCR' a ait jel görüntüsü	56
Çizim 4.16. Gen aktarılmamış (MKH) ve gen aktarılmış MKH (PKİ-MKH) gruplara ait kültür görüntüleri	57
Çizim 4.17. TNF- α ' nın birinci konsantrasyon değerinde (12,5 ng/ml) IL-1 β ve IFN- γ ' nın değişiminin canlılığa olan etkisine ait grafik	58
Çizim 4.18. TNF- α ' nın ikinci konsantrasyon değerinde (25 ng/ml) IL-1 β ve IFN- γ ' nın değişiminin canlılığa olan etkisine ait grafik	59
Çizim 4.19. TNF- α ' nın üçüncü konsantrasyon değerinde (50 ng/ml) IL-1 β ve IFN- γ ' nın değişiminin canlılığa olan etkisine ait grafik	59
Çizim 4.20. Ortak kültür sonrası 1. günde hCA' lara ait kültür fotoğrafları	60
Çizim 4.21. Ortak kültür sonrası 1. günde hCA' lara ait apoptotik cisimcik fotoğrafları	61

Çizim 4.22. Ortak kültür sonrası 7. günde hCA' lara ait kültür fotoğrafları	62
Çizim 4.23. Ortak kültür sonrası 7. günde hCA' lara ait apoptotik cisimcik fotoğrafları ..	63
Çizim 4.24. ELISA sonucu PRL seviyelerinin karşılaştırılması	64
Çizim 4.25. BCA sonucu toplam protein miktarlarının karşılaştırılması	65
Çizim 4.26. Toplam protein miktarı içinde ile PRL' in yüzde olarak ifadesi	65
Çizim 4.27. Kontrol grubu 1. gün anneksin V analizi verileri	66
Çizim 4.28. Kontrol grubu 7. gün anneksin V analizi verileri	67
Çizim 4.29. MKH grubu 1. gün anneksin V analizi verileri	67
Çizim 4.30. MKH grubu 7. gün anneksin V analizi verileri	68
Çizim 4.31. PKİ-MKH grubu 1. gün anneksin V analizi verileri	68
Çizim 4.32. PKİ-MKH grubu 7. gün anneksin V analizi verileri	69
Çizim 4.33. Tüm grupların anneksin V analizlerinden hesaplanan yüzde canlılık değerleri	70
Çizim 4.34. 1. günde MKH ve PKİ-MKH gruplarına ait toplam apoptotik hücrelerin yüzdesi	70
Çizim 4.35. 7. günde MKH ve PKİ-MKH gruplarına ait toplam apoptotik hücrelerin yüzdesi	70
Çizim 4.36. MKH grubunun 1. ve 7. gündeki toplam apoptotik hücrelerin yüzdesi	71
Çizim 4.37. PKİ-MKH grubunun 1. ve 7. gündeki toplam apoptotik hücrelerin yüzdesi ..	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Apoptoz ve nekrozun farkları.....	3
Çizelge 1.1 Kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerine göre sınıflandırılması.....	15
Çizelge 1.2 Gen aktarım yöntemleri.....	20
Çizelge 3.1. Tasarlanan primerlere ait bilgiler	29
Çizelge 3.2. PRL için gerçekleştirilen, üretici firmanın önerdiği Q5 PCR bileşenleri.....	30
Çizelge 3.3. Üretici firmanın öngördüğü PCR döngü şartları	30
Çizelge 3.4. <i>Insert</i> ve vektör için kesim reaksiyonu bileşenleri.....	31
Çizelge 3.5. Ligasyon reaksiyonu bileşenleri.....	32
Çizelge 3.6. Yön tayini için kurulan reaksiyonların bileşenleri	33
Çizelge 3.7 hCA' ların karakterizasyonu için kullanılan antikor ve serumların listesi.....	36
Çizelge 3.8 Kullanılan sinyallere ait firma ve katalog numarası bilgileri.....	39
Çizelge 3.9. Optimizasyonda kullanılan konsantrasyon değerleri	39
Çizelge 3.10. Sinyal bileşimlerinin 96 kuyucuklu kültür kabında temsili gösterimi	40
Çizelge 4.1 TNF- α ' nın birinci konsantrasyon değerinde (12,5 ng/ml) IL-1 β ve IFN- γ ' nın değişiminin canlılığa olan etkisi.....	58
Çizelge 4.2 TNF- α ' nın ikinci konsantrasyon değerinde (25 ng/ml) IL-1 β ve IFN- γ ' nın değişiminin canlılığa olan etkisi.....	58
Çizelge 4.3 TNF- α ' nın üçüncü konsantrasyon değerinde (50 ng/ml) IL-1 β ve IFN- γ ' nın değişiminin canlılığa olan etkisi.....	59
Çizelge 4.4 Tüm grupların anneksin V analizi verileriyle oluşturulmuş çizelge	69

DENKLEMLER DİZİNİ

Denklem 3.1. Üç çeşit sitokinin üç farklı konsantrasyon değeri için kombinasyon hesabı	38
Denklem 4.1. Yüzde cinsinden PRL miktarının ifadesi	64
Denklem 4.2. Yüzde cinsinden canlılığın ifadesi	66



1. GİRİŞ

1.1.Hücre Ölümleri: Apoptoz ve Nekroz

1.1.1. Apoptoz

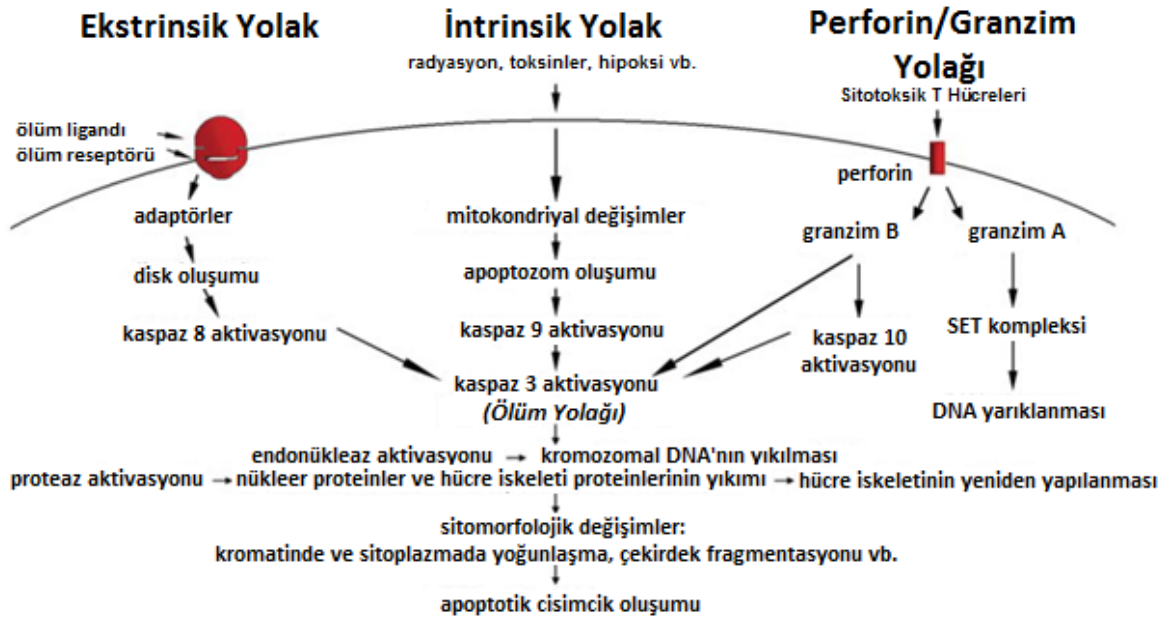
Apoptoz, organizmada tamamen fizyolojik şartlar altında gerçekleşen, genlerle düzenlenen ve enflamasyon yanıtına yol açmaksızın gerçekleşen programlı hücre ölümüdür. Yunanca *apo* (=ayrı) + *ptosis* (=düşmek) kelimelerinin birleşmesinden oluşmuş olup sonbahardaki yaprak dökülmesi anlamında kullanılır.

Hücre ölümünün değişik tiplerde olduğu bilimadamlarınca keşfedilmiş olsa da bunlardan birinin apoptoz olarak adlandırılması ilk kez Kerr ve diğ. 1972' de yayınladıkları çalışma ile gerçekleşmiştir.Daha sonra programlı hücre ölümü olarak da adlandırılan bu proseste ölüme genetik olarak karar verilen hücrelerin ölümünde bir dizi enzim grubu görev alır ve apoptoza özel morfolojik değişimler görülür.

Işık ve elektron mikroskopi görüntüleri incelendiğinde apoptoza giden hücrelerin erken safhada küçüldüğü ve kromatin yoğunlaşmasına uğradığı (piknoz) görülür. Hücreler sitoplazmik olarak küçüldüğü için organeller daha sıkı paketlenmiş bir hal alırlar. Hücre zarı bütünlüğünü kaybetmeden hücre dışına doğru baloncuklaşmaya başlar yani blebleşir. Apoptozun daha ileriki aşamalarında blebleşmeyi çekirdeğin parçalanması izler(karyoreks, *karyorrhexis*). Bu parçalar yoğunlaşmış sitoplazma ve organellerle birlikte apoptotik cisimciklerin içine alınır. Bu aşamada organeller bütünlüğünü yitirmemiştir. Ortamdaki makrofajlar veya parenkim hücreler gibi fagositik hücrelerin varlığında apoptotik hücreler fagosite edilir. Apoptotik hücrelerin parçacıkları çevre dokuya yayılmadığı, fagositik hücreler tarafından hemen sindirildikleri ve bu nedenle ikincil nekrozu tetiklemedikleri, ayrıca bu esnada ortama antienflamatuvar sitokinler salgılanmadığı için apoptoz esnasında veya apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmasında enflamatuvar yanıt oluşmaz (Kurosaka ve diğ 2003, Wong 2011, Savill ve Fadok 2000).

Apoptoz, gelişim ve yaşlanma sürecinde dokulardaki hücrelerin devamlılığını sürdürmeye yarar (Renehan ve diğ. 2001, Arandjelovic ve diğ. Henson ve Hume 2006).El ve ayak parmaklarının oluşması bu duruma en güzel örnektir. Bağışıklığın önemli bir parçası olarak hasarlı veya öze tolerans göstermeyen (otoreaktif) hücrelerin ortadan kaldırılmasında da apoptoz görülür (Vilen ve diğ. 2008, Norbury ve Hickson 2001, Pender 1999).

Apoptoz üç yolak üzerinden işlev görür. Bunlar intrinsik yolak, ekstrinsik yolak, ve perforin/granzim yolağıdır (Çizim 1.1). Her üç yolak sonraki aşamalarda bir ortak ölüm yolağını tetiklerler. Bu yolak kaspaz 3'ün yarıklanması ile başlayıp DNA'nın parçalanması, hücre ve çekirdek içi proteinlerin bozunması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimciklerin oluşması ve nihayetinde fagositik hücreler tarafından sindirilmesi ile sonuçlanır (Kurosaka ve diğ. 2003). Bu olaylar aynı zamanda apoptotik hücrelerin biyokimyasal özelliklerini göstermektedir (Hengartner 2000). Granzim A yolağı ise kaspazlardan bağımsız olarak DNA hasarına yol açmaktadır (Martinvalet ve diğ. 2005).



Çizim 1.1. Apoptozda rol oynayan ana mekanizmalar (Elmore 2007) (Türkçe'ye çevrildi).

Kaspazlar (*caspases*, *cysteine-aspartic proteases*) apoptozda görev alan önemli bir enzim grubudur. Proteinleri temel olarak aspartik asit yan gruplarından yıkarak proteolitik aktivite gösterebilirler de değişik kaspazlar değişik yan grupları tanıyarak etki gösterir. Apoptozda meydana gelen ve bleb oluşumunda etkili olan protein çapraz bağlanması doku transglutaminazlarının ifadesi ve aktifleşmesiyle gerçekleşir (Nemes ve diğ. 1996). Genetik materyalde meydana gelen DNA kırıkları Ca^{2+} ve Mg^{2+} a bağlı endonükleazlar sayesinde gerçekleşir. Bu da jel elektroforezinde apoptoz için karakteristik olan 180 ilâ 200 baz çiftlik bantların oluşturduğu merdivensiyi "DNA ladder" görüntüsünün ortaya çıkmasını sağlayan durumdur (Bortner ve diğ. 1995).

Apoptoz esnasında gerçekleşen bir başka kimyasal olay ise hücre yüzey belirteçlerinin ifade edilmesiyle fagositik hücrelerin hızlı bir biçimde uyarılmasıdır. Fagositik hücrelerin apoptotik hücreleri tanımasında anneksin I ve kalretikulin gibi bir çok

proteinin görev almasına rağmen bu belirteçler arasında en önemlisi fosfatidilserin yerleşiminin değişmesidir (Bratton ve diğ. 1997). Normal bir hücrede fosfatidilserin hücre zarının sitoplazmik kısmında yer alır ancak apoptoz esnasında hücre zarının dışına yerleşim gösterir. Fosfatidilserine yüksek afinite ile bağlanan anneksin V proteini apoptotik hücrelerin tespitinde kullanılan önemli bir belirteçtir (Elmore 2007).

1.1.2. Nekroz

Enerji bağımlı ve kontrollü bir hücre ölümü olan apoptozun aksine nekroz, genellikle büyük bir hücre grubunu etkileyen, kontrolsüz ve pasif bir proses olarak tanımlanmaktadır. Nekrotik hücre hasarı iki ana mekanizmayla ortaya çıkmaktadır. Bunlardan ilki enerji akışının kesilmesi, diğeri ise hücre zarının doğrudan tahribata uğramasıdır (Elmore 2007).

Nekroza uğrayan bir hücre şişer, sitoplazmik vakuollerin ve bleblerin oluşumu gerçekleşir. Apoptozun aksine organeller bütünlüğünü kaybeder; endoplazmik retikulum şişer. Mitokondri ve lizozom şişerek zarar görür, ribozomlar buldukları yerlerden ayrılır ve nihayetinde hücre membranı da tahribata uğrar. Bunun neticesinde sitoplazma içerikleri çevre dokuya yayılır ve bu içerik kemotaktik sinyal olarak görev alıp enflamasyon yanıtını uyarır (Kerr ve diğ. 1972, Trump ve diğ. 1997).

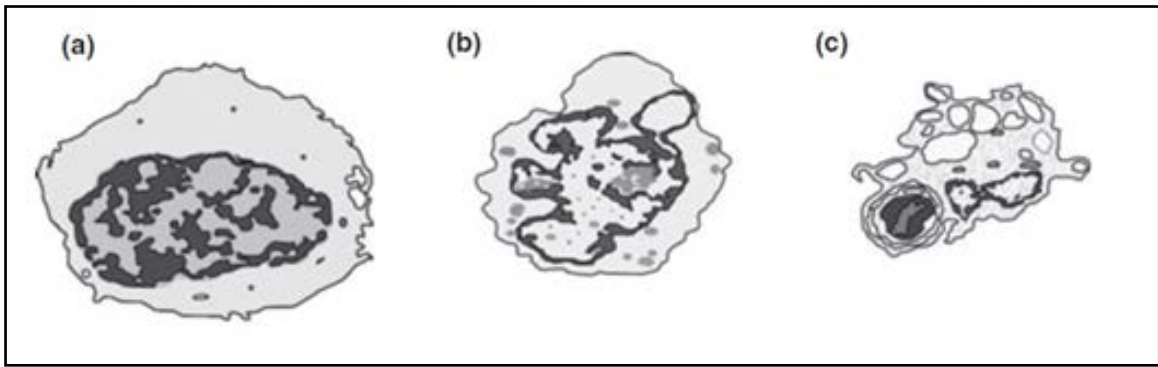
Görüldüğü gibi apoptoz ve nekrozda gerçekleşen olaylar bütünüyle birbirinden farklı değildir. Bununla birlikte bir hücrenin apoptoza veya nekroza gideceğini alan sinyal, doku tipi, gelişimsel evre ve mikroçevre belirler. Tüm bu koşullar birlikte değerlendirilmelidir, alınan sinyal aynı olsa bile hücreler diğ etmenler nedeniyle sinyale farklı yanıtlar üretebilir (Zeiss 2003, Fiers ve diğ. 2003). Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar Çizelge 1.1' de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1. Apoptoz ve nekrozun farkları (Elmore 2007) (Türkçe'ye çevrildi).

APOPTOZ	NEKROZ
Tek hücre veya küçük bir hücre grubu etkilenebilir	Büyük bir hücre grubu etkilenir
Hücreler küçülür	Hücreler şişer
Kromatin yoğunlaşması ve çekirdek parçalanması görülür	Çekirdeğin çözünmesi(karyoliziz), kromatin yoğunlaşması ve çekirdek parçalanması görülür
Hücre membranı bütünlüğünü korur	Hücre membranı tahribe uğrar
Sitoplazmik içerik apoptotik cisimlerin içinde kalır	Sitoplazmik içerik meydana çıkar
Enflamatuvar yanıt oluşmaz	Enflamatuvar yanıt oluşur

1.2.İskelet - Kas Sistemi Rahatsızlıkları

Kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligamentler, menisküs ve sinirlerin görev aldığı iskelet-kas sistemi (Hui ve diğ. 2009) vücut şeklinin korunmasından ve motor hareketlerden sorumludur. Bu sistemle ilişkili olan birçok hastalık nedeniyle motor hareketleri kısıtlandığı için, birçok insan günümüzde kalitesiz bir yaşam sürmektedir. Ortopedik rahatsızlıklar içinde kıkırdağı etkileyen osteoartrit; kemiği etkileyen kritik kemik defektleri, gelişme çağındaki çocuklarda fizeal hasar ve *osteogenesis imperfecta*; tendon ve ligament zedelenmeleri; menisküs zedelenmeleri ve meniskektomi; kasları etkileyen Duchenne Muskuler Distrofisi (DMD); omuriliği etkileyen intervertebral disk dejenerasyonu ile eklemleri ve eklem dışı dokuları birlikte etkileyen, bu yolla sistemik etki yaratan romatoid artrit sayılabilir (Hui ve diğ. 2009, Thomas ve diğ. 2007, Kon ve diğ. 2012, Adan ve diğ. 2013). Bu rahatsızlıklardan osteoartrit ve romatoid artrit gibi bir kısmı, yaşa da bağlı olmak üzere, eklem kıkırdağında bulunan tek hücre tipi olan ve eklem kıkırdağının oluşturulmasını sağlayan kondrositlerin (hCA) apoptozu (Çizim 1.2) (Lotz ve diğ. 1999, Zamli ve diğ. 2011) ile ilişkili olup, eklem kıkırdağının ve bu eklemlerde kayganlaştırıcı ve şok önleyici olarak görev yapan sinoviyal sıvının yetersiz kalması neticesinde motor hareket bozuklukları ile sonuçlanmaktadır.

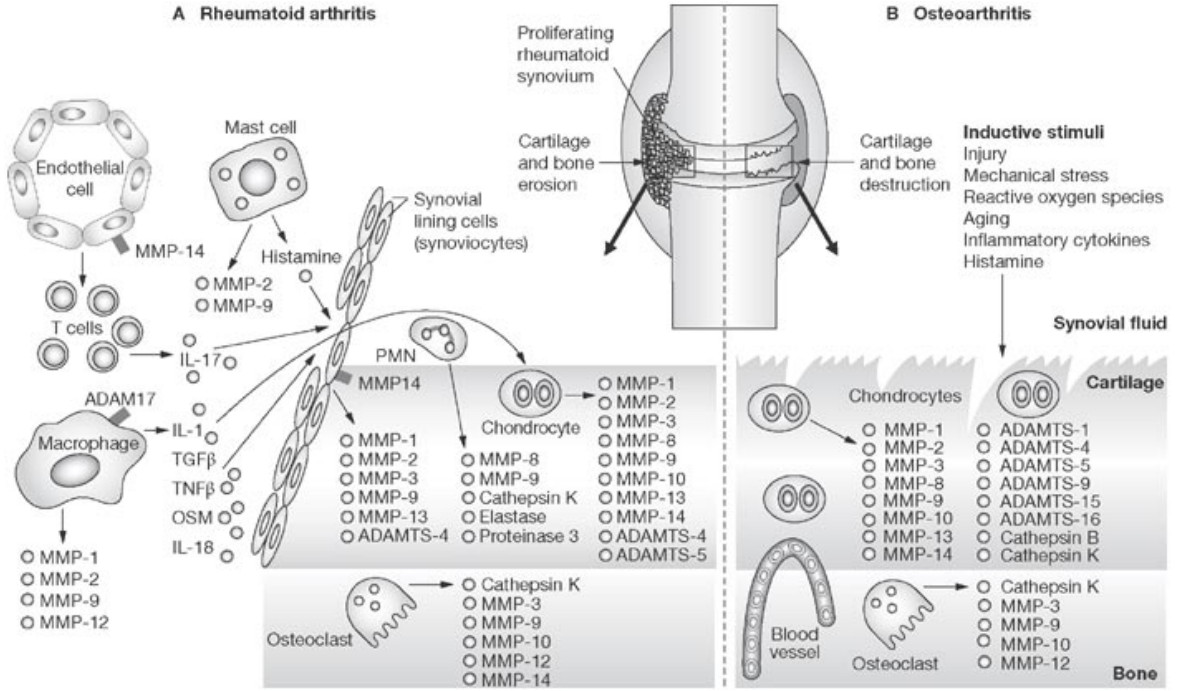


Çizim 1.2. Kondrosit apoptozu. Çizimde a) Normal hücre b) Erken evre kondrosit apoptozu, periferik kromatin yoğunlaşması ile c) geç evre kondrosit apoptozu, hücrede apoptotik cisimcikler ve vakuollerin varlığı görülmektedir (Zamli ve Sharif, 2011).

1.2.1. Osteoartrit

Osteoartrit çok sık karşılaşılan bir eklem rahatsızlığı olup aşırı yük binen eklem kıkırdaklarında ortaya çıkan bir eklem hastalığı olarak bilinmektedir. İltihabi yanıtın uyarılmadığı (non-enflamatuvar) bir rahatsızlık olup hücre yoğunluğunun azalması, kıkırdak kaybı ve fibrilasyonla karakterizedir. Doku kaybında ana olarak matriks metalloproteazların (MMP) rol aldığı ve doku MMP inhibitörleri ile aralarındaki dengenin

bozulduğu bilinmektedir (Thomas ve diğ. 2007) (Çizim 1.3). Hücre kaybında da apoptozun etkili olduğu ve yaş ilerledikçe apoptoz oranının daha fazla olduğu osteoartrit hastalarında gösterilmekle birlikte hem apoptoz hem nekroz ile hücre ölümü olduğu da belirtilmiştir. Ayrıca mikroçevredeki sağlıklı sinyallerinin yetersiz kalması da buradaki rejenerasyon yeteneğini kısıtlamaktadır (Zamli ve diğ. 2011, Thomas ve diğ. 2007, Goggs ve diğ. 2003).



Çizim 1.3. Römatoit artrit ve osteoartritte kıkırdaktaki yıkıcı metaloproteinazların hücresel kaynakları (Murphy ve diğ. 2008)

1.2.2. Römatoit Artrit

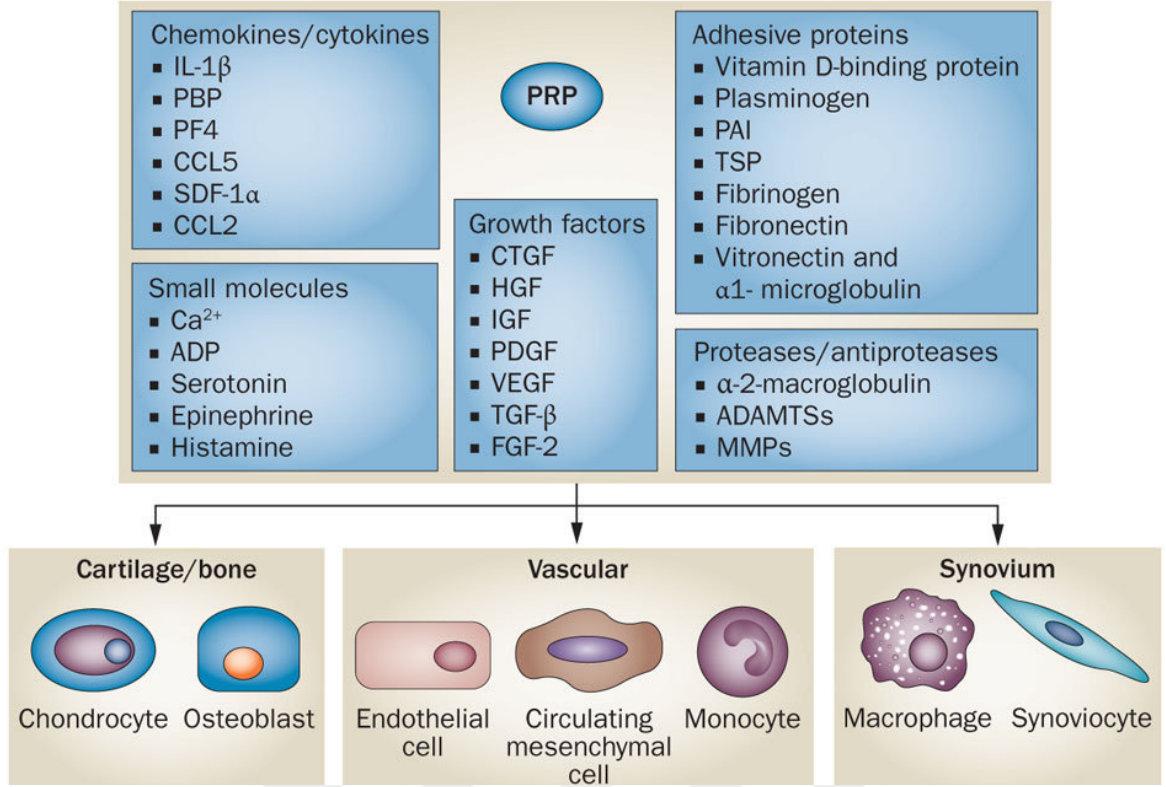
Römatoit artrit, temelde periferik sinoviyal eklemleri etkileyen ancak vücutta birçok dokuyu etkileyerek sistemik etki gösteren enflamatuvar, romatizmal ve otoimmün bir rahatsızlıktır. Sinoviyum ve eklem dokularında iltihabi lökositlerin ve otoantikörlerin (römatoit faktör ve antisitrülin protein antikörleri, ACPA) birikimi ile karakterizedir. Aynı zamanda kemik ve kıkırdak doku yıkımı ile enflamasyondan kaynaklanan diğer sistemik etkiler de görülür. Sistemik olduğu için tek bölge ile sınırlı kalmayıp çoklu eklem rahatsızlıkları geliştiren hastalar özellikle sabah tutukluğu, ağrı ve eklemlerde instabilite yaşarlar. Otoimmün atakları engelleyebilmek için tedavide hedeflenen moleküller arasında tip 1 / tip 2 sitokin reseptörleri, B hücreleri ve Fc reseptörleri, *downstream* kinazlar, mitojenlerce aktive edilmiş protein kinaz ailesi, PI3K, PKB ve mTOR bulunmaktadır. Burada bahsedilen tip 1 ve tip 2 sitokinler; interlökinler (IL), interferonlar (IFN), koloni

uyarıcı faktörler (CSF) ve eritropoetin (EPO), prolaktin (PRL), büyüme hormonu (GH) ve leptin gibi hormon benzeri sitokinleri kapsamaktadır (O'shea ve diğ. 2013).

1.2.3. Tedavi yaklaşımları

Ortopedik hastalıkların tedavisi için kullanılan yöntemler arasında kök hücrelerle ya da birtakım biyosinyal molekülleriyle kombine edilmiş doku mühendisliği yaklaşımlarının (Schmitt ve diğ. 2012) ya da cerrahi operasyonların yanısıra, kan temelli trombositçe zengin plazma (*platelet-rich-plasma*, PRP) enjeksiyonu (Centeno ve diğ. 2008, Rha ve diğ. 2012, Everts ve diğ. 2006), trombositçe zengin fibrin (*platelet-rich-fibrin*, PRF) enjeksiyonu (Everts ve diğ. 2006), kortikosteroid enjeksiyonu, viskoz destek materyali (*viscosupplement*) olarak hyaluronik asit enjeksiyonu gibi yöntemler de bulunmaktadır (Kon ve diğ. 2012, Orth ve diğ. 2014).

PRP ve PRF, kanın santrifüj edilmesiyle elde edilen, biyosinyal moleküllerince zengin olan serum kısmının kök hücreleri uyarıcı özelliklerinden yararlanılmasına dayanmaktadır. Ayrıştırılan serum kısmı, transforme edici büyüme faktörü beta-1 (*transforming growth factor beta-1*, TGF- β 1), fibroblast büyüme faktörü (*basic fibroblast growth factor*, bFGF), trombositçtürevlenen büyüme faktörü (*platelet derived growth factor*, PDGFa-b), epidermal büyüme faktörü (*epidermal growth factor*, EGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) ve bağ doku büyüme faktörü (*connective tissue growth factor*, CTGF) gibi; mezenkimal hücre proliferasyonunu, kondrosit ve osteoblast gelişimi ve farklılaşmasını, kollajen sentezini, endotelial kemotaksis ve anjiyogenezini, doku rejenerasyonunu, fibrosis ve platelet adezyonunu uyaran, ayrıca endotelial, fibroblastik ve osteoblastik mitogenezi, kollajenaz ekspresyonunu düzenleyen birçok biyosinyal molekülünü barındırmaktadır (Everts ve diğ. 2006) (Çizim 1.4).

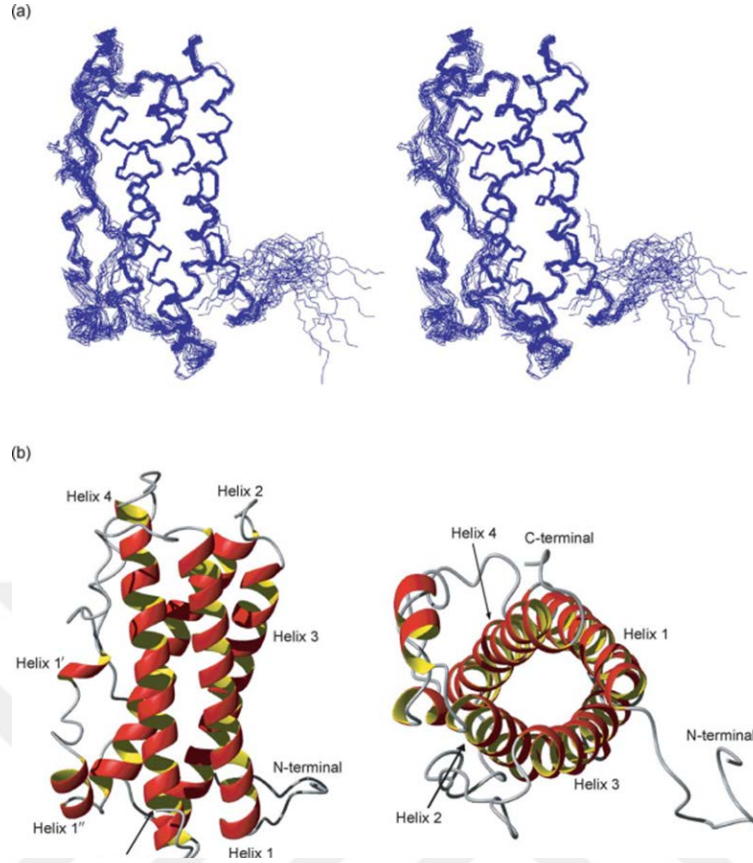


Çizim 1.4.PRP ile sağlanan biyosinyal molekülleri ve etkiledikleri hücrelerden bazıları (Andia ve Maffuli, 2013).

Sayılan etkilerin tamamı mikroçevrenin devamlılığını sağlayan önemli etkiler olmakla birlikte, özellikle hücre yenileme ve mitozu uyarma kapasiteleri ile mevcut kök hücre grubunu indükledikleri, yenilenmeyi teşvik ettikleri için PRP enjeksiyonu klinikte kendine yer bulmuştur. Benzer mantıkla o bölgedeki kök hücre grubunu uyarıcı başka sinyaller mikroçevreye kazandırılarak hücre yenilenmesinin artırılması da tedavide denenilen yöntemler arasında girmiştir. Bunlardan biri de eklem kıkırdağı mikroçevresinde doğal olarak da bulunan prolaktinin (Ogueta ve diğ. 2002) eklem içine enjeksiyonudur.

1.3.Prolaktin

Prolaktin (PRL), tirotropin salgılayan hormondan (TRH) salınan dopamin ve uyarıcı sinyal yoluyla hipotalamusun tonik inhibisyonu ile ön hipofiz bezinden, diğer organlardan ve özellikle lenfositlerden salgılanan pleiotropik bir peptid hormondur (Orbach ve diğ. 2007, Canbay ve diğ. 1997)(Çizim 1.5). Bu hormonun tüm omurgalılarda var olduğu bilinmektedir (Binart ve diğ. 2000). IL-1, IL-2 ve IL-6 PRL salgılanmasını uyarırken IFN- γ ve endotelin-3, PRL salgılanmasında inhibisyon etkisi göstermektedirler. PRL' in 3 izoformu bulunmaktadır ve bu izoformlar serbest küçük (monomerik), büyük ve en büyük (makro) PRL olarak adlandırılırlar.



Çizim 1.5. İnsan PRL' inin çözünebilen formu. a) Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ile görüntülenmiş hal b) Kurdele formunda gösterim. Solda hormonun bir yanından, sağda da bunun 90° geriye çevrilerek (z ekseninde) alttan görüntülenmiş hali yer almaktadır (Telium ve diğ. 2005).

PRL, hipofiz içinden salgılandığı kadar, nöronlar, meme epiteli, prostat, endotelyum, deri ve bağışıklık sisteminde bulunan timositler, periferel kan mononükleer hücreleri ve ana olarak lenfositlerden salgılanırlar. Emzirme, göğüs duvarı uyarısı ve stres gibi faktörler hipofize PRL salgılatırlar. Kadınlarda meme gelişmesi ve farklılaşması ile laktasyonda (süt salgılanması) temel görev üstlenirler. Bu temel görevlerle birlikte, PRL' in etki ettiği olaylar 6 farklı başlık altında toplanabilir:

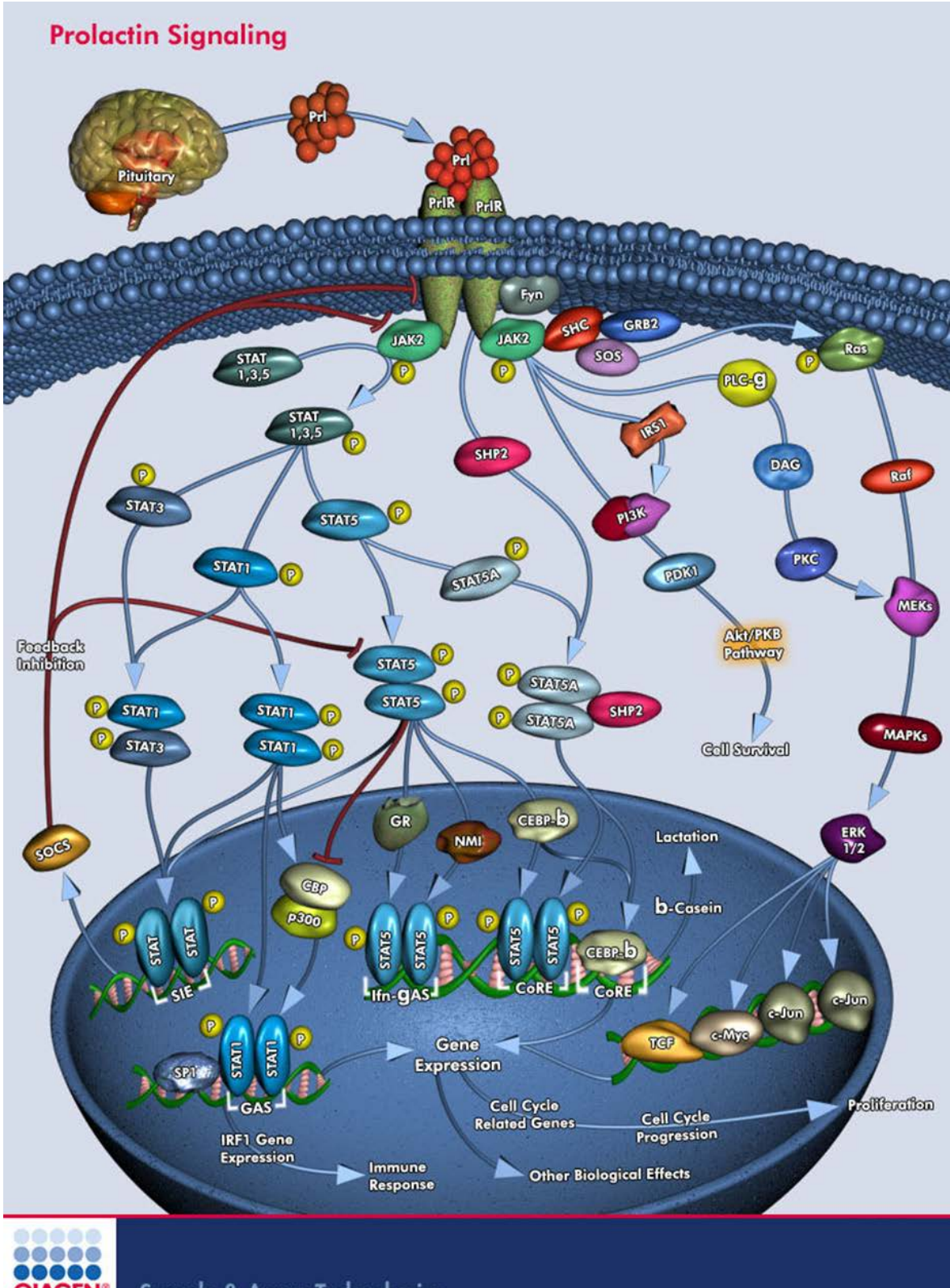
- i. Üreme ve laktasyon
- ii. Büyüme ve gelişme
- iii. Endokrinoloji ve metabolizma
- iv. Beyin ve davranış
- v. İmmunmodulasyon
- vi. Osmoregülasyon (WikiPathways, 2015, Ben-Jonathan ve diğ. 2006, Fresno Vara ve diğ. 2001).

PRL reseptörleri (PRLR) de tip 1 sitokin reseptör süper ailesinin bir üyesi olup ligand bağlayan hücre dışı bölge (ekstraselüler), transmembran bölge ve sitoplazmik bölgelerden oluşurlar (Freeman ve diğ. 2000, Binart ve diğ. 2000). Hücre dışı bölge iki disülfid bağı ve Trp-Ser-X-Trp-Ser motifinden oluşur. Sitoplazmik bölge proline zengin olup bu yolla protein kinaz sinyal moleküllerine bağlanabilmektedir. Tip 1 sitokin süper ailesinin diğer üyeleri gibi PRLR de tirozin kinaz bulundurmaz. Bunun yerine Janus kinaz (JAK) ailesi ve Src tirozin kinaz ailesi (*Src family of tyrosine kinases*, SFK) ile ilişkili diğer tirozin kinazların aktivasyonu yoluyla sinyal iletimine katılırlar. Bu reseptörün katıldığı en iyi bilinen yollar Janus kinaz (JAK)/sinyal çeviricileri ve transkripsiyon aktivatörleri (*signal transducers and activators of transcription*, STAT) yolağı, Ras-Raf-MAPK yolağı, SFK ve PLC- γ (fosfolipaz C-gama) yolaklarıdır (Lee ve diğ. 1999).

1.3.1. Prolaktin Sinyal Yolağı

İnsan PRL' i üzerinde yapılan çalışmalar, PRL sinyal yolaklarının JAK/STAT yolakları ile ilişkili olduklarını göstermiştir. Hücre sağkalımı ve farklılaşması ile hücre proliferasyonu üzerinde etkili olan bu yollar, PRL' in de hücre sağkalımı üzerindeki etkilerini yöneten birinci derecede önemli olan sinyal yolaklarıdır (Çizim 1.6) (Terasaki ve diğ. 2010, Brooks, 2012, Freeman ve diğ. 2000, Cooke ve diğ. 2006, Devi ve diğ. 2014).

PRL' in sinyal olarak görev yapabilmesi için ilk etkileşim, PRL ile ona özgü olan PRLR arasında olmaktadır. Moleküler düzeydeki etkiler, PRL' in homodimerizasyonu ile başlar. PRLR ile etkileştiği bulunan iki tirozin kinaz Fyn ve JAK2' dir. JAK2 ile etkileştiğinde PRL, STAT ailesini güçlendirir ve aktifleştirir.



Çizim 1.6. Prolaktin sinyal yolları. PRL, PRLR' e bağlandığında bir dizi yolakla etkileşme yoluyla hücre sağkalımı, immun yanıt ve proliferasyon üzerinde etkili olur (QIAGEN, 2014).

Bu aktivasyon, STAT ailesinin özellikle STAT1, STAT3 ve STAT5 üyelerini uyarır ve bu uyarım da sırasıyla interferon regülatör faktörü (*interferon regulatory factor-1*, IRF1) ile beta kazein gen ürünlerinin oluşturulmasında görev alır. PRL' e bağlı olarak gerçekleşen hücre proliferasyonu ve gen aktivasyonunda birincil aracı STAT moleküllerinin STAT5A ve STAT5B olduğu düşünülmektedir. Fosforile STAT proteinler, dimerize olup çekirdeğe giderler. Burada PRL ile indüklenecek spesifik DNA dizilerine bağlanıp transkripsiyonu başlatırlar (Lee ve diğ. 1999). STAT5, glukokortikoid reseptörü (GR) gibi steroid reseptörlerle etkileşir. Bu reseptörler, CREB bağlayıcı protein (CBP)/p300, N-Myc (ve STAT) interaktörü (NMI) protein ve ERK1/2 (*extracellular signal regulated kinases*) eş aktivatörüdür. İntranükleer STAT5' inkonsensus STAT5 yanıt elementlerine bağlanması beta kazeinin de aralarında bulunduğu çok miktarda PRL' e özgü genlerin aktifleşmesiyle sonuçlanır. Bu transkripsiyonel aktivasyon GR ve CCAAT/güçlendirici (*enhancer*) bağlayıcı protein beta (*CCAAT/enhancer binding protein-beta*, CEBP-beta) tarafından güçlendirilir. Hücre döngüsü ilerleyişini düzenleyen siklin D1 promotörü ve antiapoptotik bir faktör olan BclXL promotörleri STAT5 proteinlerince hedeflenmektedir (Chughtai ve diğ. 2002).

PRLR dimerizasyonu aynı zamanda GRB2-SOS-Ras-Raf-MEK-MAPK sinyal yolağını da etkiler. Bu etkisini de hücre döngüsü için gerekli olan Myc, c-Jun, ve T hücre faktörü (*T cell factor*, TCF) üzerinden gerçekleştirir. Ayrıca protein kinaz C (PLC-PKC) ve fosfatidilinozitol 3 kinaz (PI3K) aktivasyonunun PRLR için efektör işlevi gördüğü de belirtilmektedir. PI3K hücre sağkalımında etkili olan Akt/PKB yolağını indükler. PRLR aktivasyonunu takiben birçok protein tirozinlerce fosforlanır. Buna reseptörün kendisi (PRLR), Src homoloğu 2 (SH2) içeren adaptör protein SHC ve insülin reseptör substratı 1 (IRS1) da dahildir. (Lee ve diğ. 1999). SH2 bölgesi içeren tirozin fosfataz (SHP2) beta kazein gen promotörü aktivasyonu üzerinden PRLR sinyal transdüksiyonuna katkıda bulunur. SHP2 fiziksel olarak STAT5A ile ilişkilidir. Beta kazein gen promotörü STAT5 interferon gama tarafından aktive edilen dizi (*STAT5 IFN-gamma-activated sequence*, STAT5 GAS) elementinin aktivasyonu için önemlidir (Chughtai ve diğ. 2002). Beta kazein gen transkripsiyonu birincil olarak kompozit yanıt elementi (*composite response element*, CoRE) tarafından kontrol edilir. Bağışıklık hücrelerinde PRL, interlökin 2 (IL-2), IFN' lar, IFN' larca indüklenen genler ve bunlarla ilişkili, bağışıklık yanında görev alan diğer genlerin ifadelerini düzenleyen interferon regülatör faktörü 1 (IRF1) ifadesini tetikleyerek etkili olur. IRF1 promotörü önemli bir GAS elementini içerir. PRL' ce indüklenen STAT1,

transkripsiyon faktörü SP1 ve CREB bağlayıcı proteinin (p300/CBP) eş uyararı gibi birçok aracı molekül PRL uyarısında IRF1 gen ifadesini arttırıcı yönde etkilidir. PRL tarafından tetiklenebilen STAT5 ise IRF1 gen ifadesini azaltmaktadır (Yu-Lee, 2002).

Sitokin sinyal iletiminin baskılayıcısı (*suppressor of cytokine signaling*, SOCS) gen ailesinin PRL sinyal transdüksiyonunu zayıflatarak (*downregülasyon*) JAK-STAT yolağını hedefledikleri görülmüştür. SOCS1 ve SOCS3' ün devamlı ifade edilmesi PRL tarafından indüklenen STAT5 üzerinden gerçekleşen gen ifadesini ve JAK2 tirozin kinaz aktivitesini büyük ölçüde azaltmıştır.(Goffin ve diğ. 2002).

1.3.2. PRL' in Hücreler Üzerindeki Etkileri

PRL, B hücre olgunlaşması sırasında otoreaktif B hücrelerinin negatif seçilimine katılır, CD4⁻CD8⁻ hücrelerinin IL-2 reseptör ekspresyonu yoluyla CD4⁺CD8⁺ hücrelerine olgunlaştırılmasını sağlar ve pro-B hücrelerinin oluşturulmasına yol açar. PRL seviyesi ile CD4⁺ ve B hücrelerinin sayısı arasında bir orantı bulunmasına rağmen, PRL' in lenfopoez için şart olmadığı da belirtilmektedir (Peeva ve diğ. 2003). PRL antiapoptotik etkisini ayrıca sağkalım sinyallerini arttırmak yoluyla göstermektedir (Kochendoerfer ve diğ. 2003). MHC sınıf II ve eş uyarıcı molekülleri ifade etmek suretiyle antijen sunan hücre gelişimini arttırırlar. Eş uyarıcı molekülleri ve MHC sınıf II moleküllerinin sunumu sayesinde B ve T hücreleri ile etkileşirler, böylelikle de MHC olarak sunulan otoantijenlere yanıtı arttırıp öze toleransı azaltırlar. B hücrelerindeki CD40 ile T hücrelerindeki CD40L etkileşimi antiapoptotik bir gen olan Bcl-2 ifadesini arttırır, böylelikle otoreaktif B hücreleri negatif seçimden kurtarılır ve öze tolerans azaltılır (Kochendoerfer ve diğ. 2003). Antijen ve mitojenlere karşı proliferatif yanıtı, immünglobulinlerin ve otoantikörlerin üretimini arttırır (Orbach ve diğ. 2007, Shelly ve diğ. 2011). Bu nedenle de otoreaktivite artar.

Çeşitli yayınlarda PRL' in apoptozu engelleyici etkileri vurgulanmıştır. Weimann ve diğ. (1998) yaptıkları çalışmada PRL bağımlı Nb2 hücrelerinde glukokortikoidlerle apoptozu indüklemişler ve PRL' in apoptozu engelleyici etkisini değişik evrelerde incelemişlerdir. Çalışmada, glukokortikoidlerin mitokondriyal transmembran potansiyelini azaltıcı etkisinin PRL sayesinde engellendiği belirtilmiştir. Flint ve diğ. (2006) involüt fare meme bezinde yaptıkları çalışmada insülin benzeri büyüme faktörü-5 (*insulin-like growth factor-5*, ILGF-5) üretemeyen *wild type*(transgenik olmayan) ve ILGF-5 üretebilen transgenik farede PRL' in etkisini incelemişlerdir. Buna göre *wild type* farede PRL hücre

kaybı ve MMP ekspresyonunu engellerken transgenik farede bu etkiyi göstermemiştir. Zermeño ve diğ. (2006) yaptıkları çalışmada düşük serum ortamında bıraktıkları kondrositlerin PRL yoluyla apoptozunun engellendiğini rapor etmişlerdir. Adan ve diğ. (2013) ise çalışmalarında proenflamatuar sitokinler olan TNF- α , IL-1 β , ve IFN- γ içeren bir sitokin kokteyli ile kondrositleri apoptoza sürüklemişlerdir. Bu kondrositleri PRL ile etkileştirdiklerinde Bax/Bcl-2 oranının nitrik oksitten bağımsız ancak JAK2/STAT3 bağımlı yolak üzerinden azaldığı ve p53 indüklenmesinin de azaldığı sonuçlarına ulaşmışlardır. Fernandez ve diğ. (2003) ise Nb2 hücreleri ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında PRL' in hem NO donörce indüklenen apoptoza hem de deksametazonca indüklenen apoptoza karşı koruyucu etkilerini belirtmişlerdir.

1.3.3. Prolaktin ile Hastalıklar Arasındaki İlişki

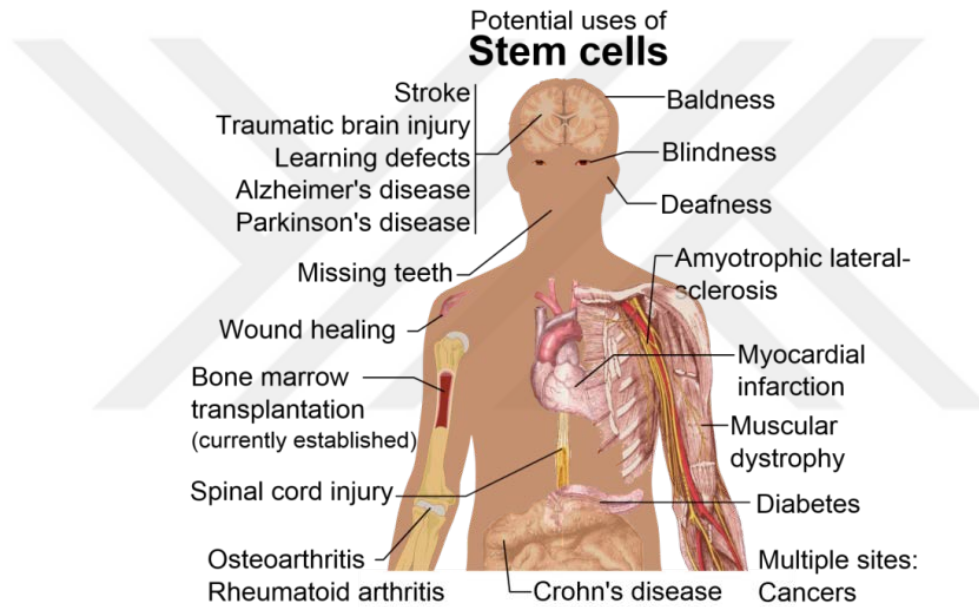
Karsinogenez hücrel kontrol mekanizmalarında meydana gelen kontrol kaybına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Genetik, çevresel, diyetle ilişkili ve hormonal faktörler karsinogenezde etkili olmaktadır. PRL' in antiapoptotik ve mitojenik özellik gösteriyor olması, onun değişik kanser türleriyle ilişkilendirilmesine neden olmaktadır. Örneğin meme kanseri biyopsilerinin büyük bir çoğunluğunda PRL ve PRLR mRNA' larına rastlanmıştır. Kolorektal tümörlerin agresifliği de PRL fonksiyonuna dayandırılmaktadır. İnsan meme kanserinin birkaç türünde proliferasyonun tetiklenmesi, malign B lenfositlerinin ve lenfoma hücrelerinin aktifleştirilmesi, promiyelositlerin proliferasyonunda artış olması yine PRL ile ilişkilendirilmektedir. Benign fibromusküler miyometriyal tümörlerin (leiomyomlar) yüksek miktarda PRL salgıladıkları gösterilmiştir. Tümörlerle ilişkisi düşünüldüğünde tümörögenезin engellenmesi, bir tedavi yönteminin oluşturulabilmesi için PRL üretiminin engellenmesi veya PRLR' nün bloklanması hedeflenebilir.

PRL' in otoimmün hastalıklarda yüksek seviyede olduğu (hiperprolaktinemi, HPRL) gözlenmiştir. Bu hastalıklar arasında sistemik lupus eritematozus (SLE), romatoid artrit (RA), Sjörger Sendromu (SS), Hashimoto tiroidi (HT) ve multiple skleroz (MS), tip 1 diyabet (T1D), Graves hastalığı (GD), çölyak hastalığı, akut alerjik ensefalomyelitis, adjuvan artrit gibi hastalıklar sayılmaktadır (Orbach ve diğ. 2007, Shelly ve diğ. 2011, Matera, 1996). Ancak PRL seviyesi ile hastalık arasında kesin bir korelasyon da bulunmamaktadır. HPRL ve hipoprolaktinemi durumlarının ikisi de bağışıklık baskılayıcı etki yaptığından vücutta PRL seviyesinin optimum seviyelerde tutulması önemlidir.

1.4.Kök Hücreler

1.4.1. Genel Özellikleri

Kök hücreler, farklılaşmadan kendini yenileme ve gerektiğinde farklılaşabilme kapasitesine sahip, doku ve organların *in vivo* yeniden yapılanmasını sağlayan hücrelerdir (Lakshimpathy ve diğ. 2004). Vücutta her organa özgü kök hücreler vardır ve bir hasar oluştuğu anda kök hücreler mevcut hasar sinyaline yanıt olarak proliferer olur, gerekli hücre tipine farklılaşarak mikroçevredeki devamlılığı sağlarlar. Birçok hastalığın kök hücre kaynaklı olduğu düşünülmekte ve gelecekte de yenileyici ve onarıcı tıpta hastalıkları tedavi etmek üzere bu hücreler üzerine daha da yoğunlaşacağı beklenmektedir (Çizim 1.7).



Çizim 1.7.Kök hücrelerin potansiyel kullanım alanları.Bunlar içinde kanser türleri, yara iyileşmesi, osteoartrit, romatoid artrit, musküler distrofi, körlük, sağırılık, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi çok çeşitli hastalık türleri yer almaktadır (Wikipedia, 2014).

1.4.2. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

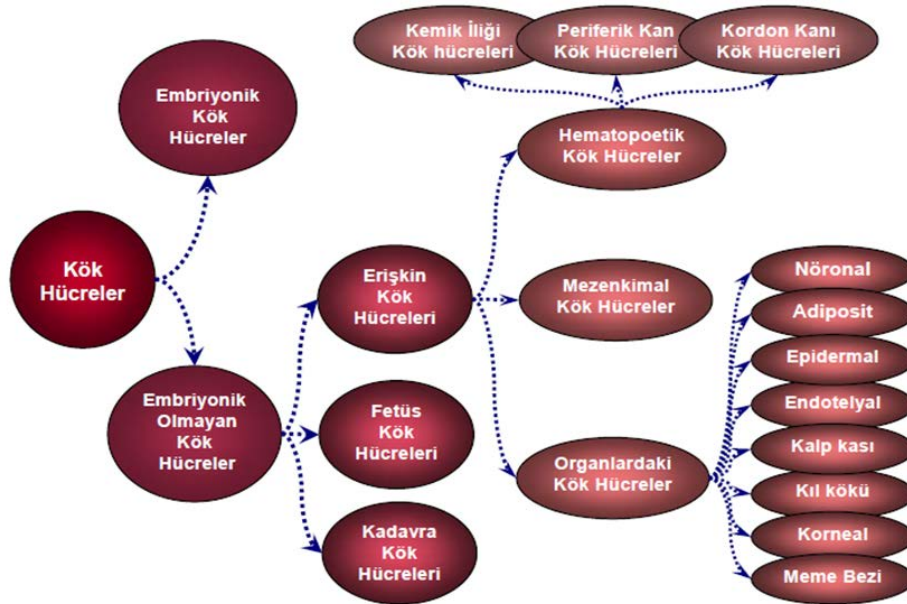
Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre başlıca, totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak sınıflandırılabilir (Çizelge1.2). Totipotent hücreler, zigot oluşumundan 8 hücreli blastosist evresine kadar geçen sürede bulunan hücreleri kapsar ve bu hücrelerin her biri tam bir birey oluşturma kapasitesine sahiptirler. Pluripotent hücrelerin farklılaşma yeteneği totipotentten daha düşük olup her 3 germ yaprağına (ektoderm, endoderm, mezoderm) ait hücrelere de dönüşebilirler, birkaç doku dışındaki tüm dokulara farklılaşabilirler. Multipotent karakterdeki kök hücrelerin farklılaşma kapasiteleri ise pluripotent hücrelerden de düşüktür, ana olarak yer aldıkları dokunun

hücrelerini oluşturabilirler. Unipotent kök hücrelerse sadece bir tek hücreye farklılaşabilirler (Alwattar ve diğ. 2011, Maron-Guiterrez ve diğ. 2009).

Çizelge 1.2. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerine göre sınıflandırılması (Maron-Guiterrez ve diğ. 2009) (Türkçe' ye çevrildi).

Terminoloji	Açıklama	Örnek
Totipotent	<i>Tüm bireyi oluşturabilme</i>	Zigot
Pluripotent	<i>Her üç germ yaprağına ait hücreleri oluşturma</i>	Embriyonik kök hücre
Multipotent	<i>Bulunduğu dokuya ait hücreleri oluşturma</i>	Mezenkimal kök hücre
Unipotent	<i>Tek bir hücre tipini oluşturma</i>	Tip 2 pnömosit

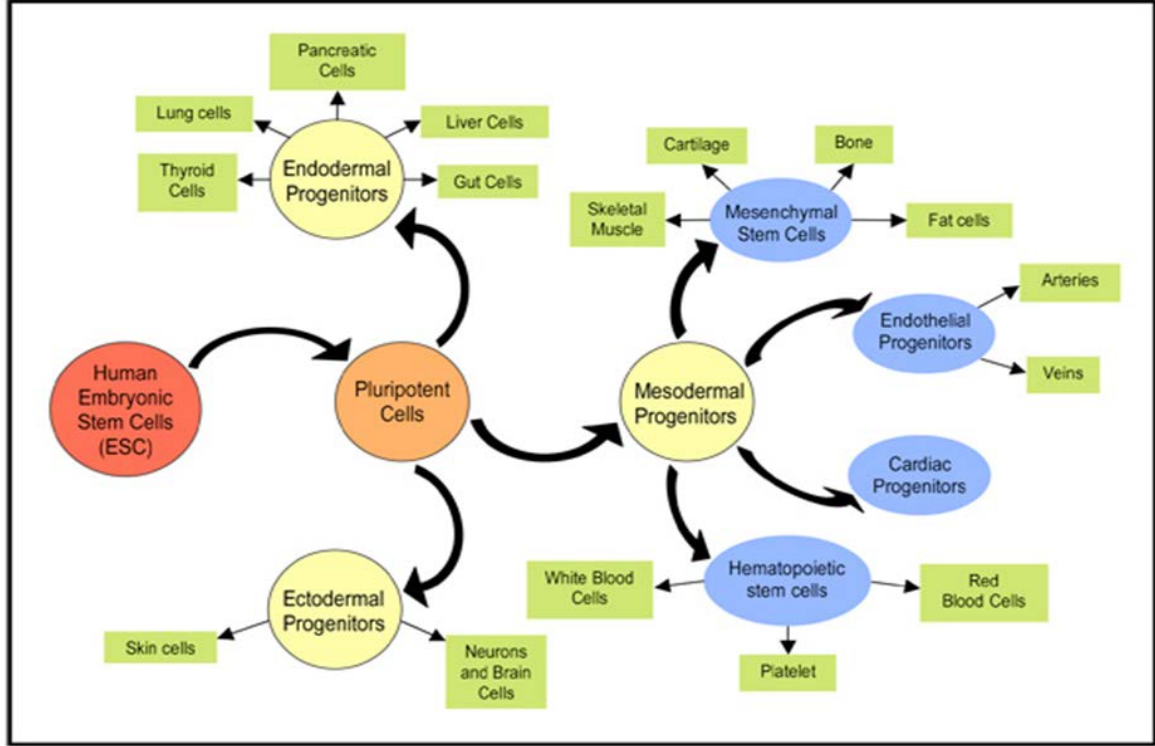
Kök hücreleri kaynaklarına göre sınıflandırdığımızda embriyonik kök hücreler ve erişkin kök hücreler olarak 2 ana grup karşımıza çıkmaktadır (Çizim 1.8). Bir de bunların dışında son yıllarda gündeme gelen indüklenmiş pluripotent kök hücre kavramı mevcuttur.



Çizim 1.8. Kaynaklarına göre kök hücreler (İnan ve Özbilgin, 2008)

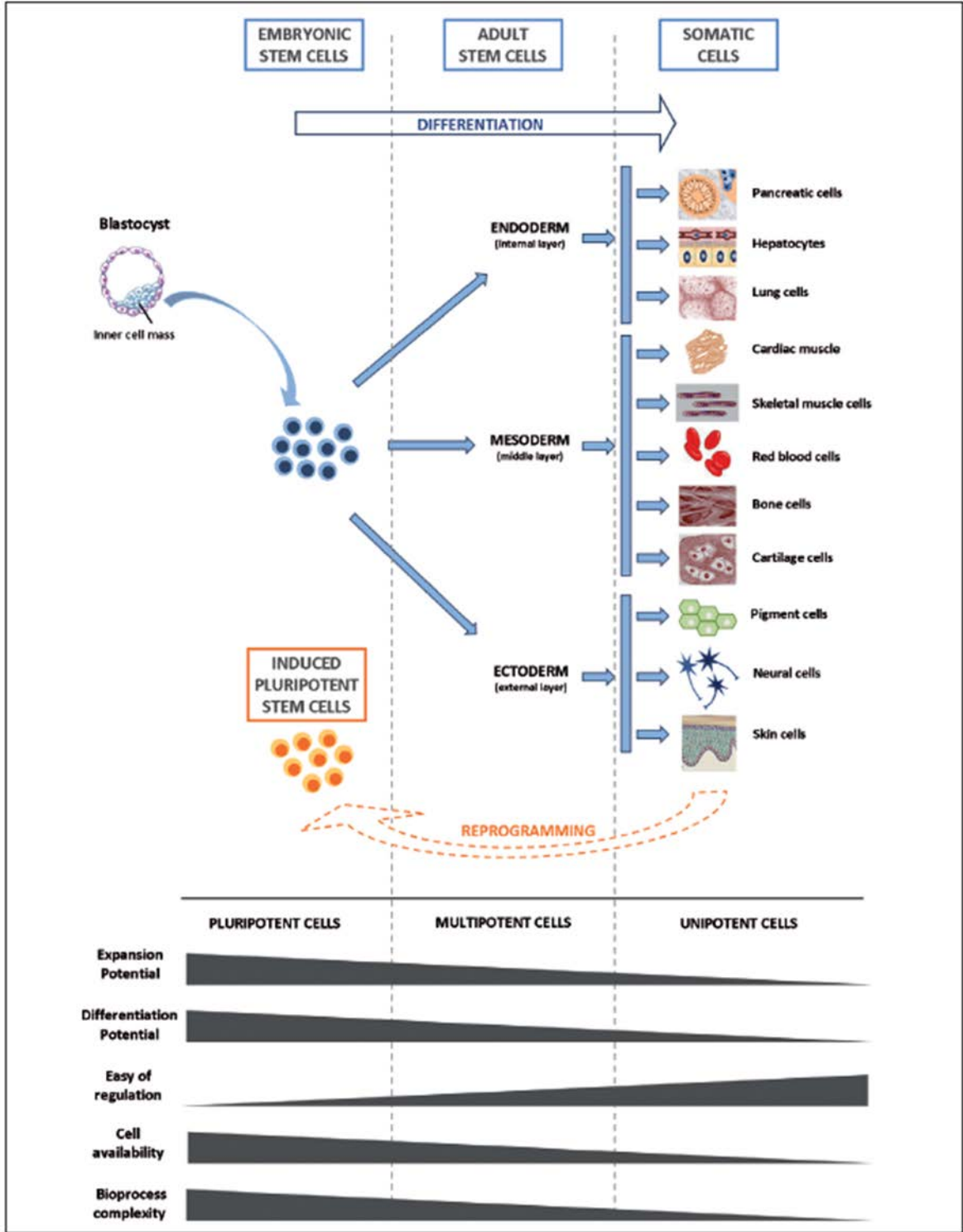
İnsan embriyonik kök hücresi, embriyonun blastosist aşamasındaki hücrelerin iç hücre kitlesinden elde edilen ve pluripotent özellik taşıyan kök hücreleridir (Alvarez ve diğ. 2012). Plasental dokular dışında vücuttaki 200'e yakın hücreye kaynaklık edebilirler. Pluripotensi güçleri, her 3 germ yaprağındaki (endoderm, ektoderm ve mezoderm)

hücrelere kök vermesinden gelir (Çizim 1.9). Ancak yine aynı güçten ötürü klinik uygulamalarda teratom yaratabilme ve immun red yanıtı oluşturabilme gibi kısıtlamalar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca fetal kaynaklı olduğu için de geniş çevrelerce etik açıdan yanlış bulunmaktadır (de Wert ve Mummery, 2003).



Çizim 1.9. İnsan embriyonik kök hücre plastisitesi (Connexions, 2014).

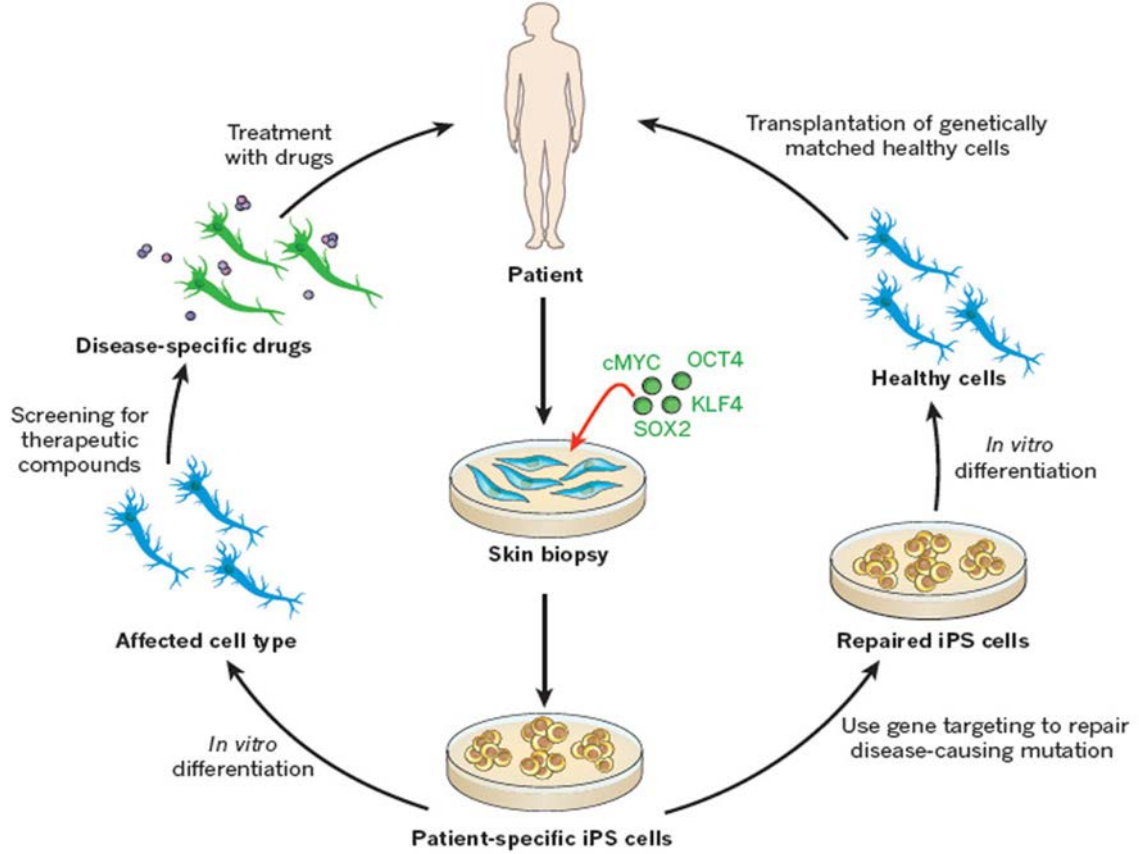
Totipotent özellikteki zigot ve blastosist aşamasındaki embriyonik kök hücreler dışındaki tüm kök hücreler erişkin kök hücreler olarak adlandırılır (Çizim 1.10). Bu hücreler embriyonik kök hücrelerin aksine erişkin bireylerden otolog olarak elde edilebildikleri için etik açıdan problem yaratmamaktadır. Vücutta her organ ve dokuda bulunan bu hücreler dokunun devamlılığını sağlamak ve hasar sinyalleri algılandığında hasarı onaracak şekilde farklılaşmaya gitmek ya da başka sinyaller vermek gibi görevleri üstlenirler. Ancak bunların da *in vitro*da saf kültür eldesinin zorluğu, optimize edilmediği takdirde yeteri miktarda çoğaltılamaması gibi sorunları vardır. Yani ortamın iyi optimizasyonuna mutlak surette ihtiyaç duyulmaktadır (King ve Miller, 2007).



Çizim 1.10. Kaynaklarına göre kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin karşılaştırması (Serra ve diğ. 2010).

2012’ de Japon bilim adamı Shinya Yamanaka’ ya Nobel ödülünü getiren uyarılmış pluripotent kök hücreler (Takahashi ve Yamanaka, 2006), öncelikle fibroblastların yeniden programlanarak pluripotensi özelliği kazandırılmasıyla ortaya çıkmış olsalar da değişik

birçok erişkin hücreyi yeniden programlamak mümkündür. Bunlar embriyoniğe benzer bir pluripotensi karakteri gösterdikleri, bireye özgü oldukları, dolayısıyla immun red cevabı oluşturmadıkları ve etik sorun teşkil etmeyen erişkin hücrelerden programlandıkları için bilim adamlarının ilgi odağı olmuşlardır. Ne var ki pluripotensi karakterinde oldukları için bu hücreler de teratom yaratma riski taşımaktadırlar ve bu da kullanımlarını kısıtlamaktadır (Çizim 1.11).

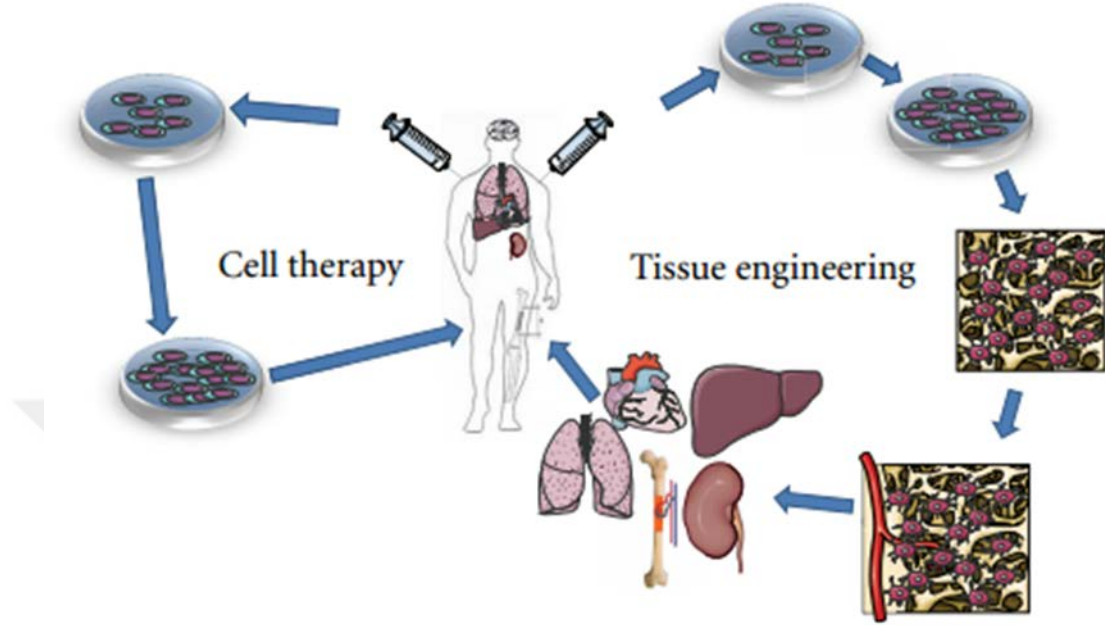


Çizim 1.11. İndüklenmiş pluripotent kök hücre. Çizimde nörodejeneratif bir hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere hastanın kendi deri hücrelerinin çeşitli faktörlerle yeniden programlanması özetlenmiştir (Robinton ve Daley, 2012).

1.4.3. Klinikte Kök Hücreler

Kök hücreler tedavide, bir muamele olmaksızın tek başlarına ya da bir doku iskelesiyardımlarıyla uygulanabildiği gibi (Çizim 1.12) (Schmitt ve diğ. 2012, Manning ve diğ. 2012, Orth ve diğ. 2014), gen terapisi yaklaşımlarında transgenik olarak üretilip geni taşıyıcı araç (*vehicle*) olarak da kullanılabilirler (Gelse ve diğ. 2012, Ivkovic ve diğ. 2014). Herhangi bir özelliğin kök hücreye gen düzeyinde kazandırılması ile kök hücre hem mikroçevreye yerleştiği hem de genetik olarak istenen özelliği kalıcı olarak sağladığı için bu yaklaşım oldukça avantajlıdır. Değişik hasar modellerindeki kıkırdak defektlerinin

tedavisine yönelik çalışmalarda IGF-1, BMP-2, BMP-7, FGF-2 ve SOX-9 gibi genler hedeflenmiştir (Gelse ve diğ. 2012, Neumann ve diğ. 2012, Longo ve diğ. 2012, Gafni ve diğ. 2004, Alwattar ve diğ. 2011).



Çizim1.12.Kök hücrelerin klinikte alternatif kullanılma yolları. Kök hücreler rejeneratif tıpta, izole edilip kültürde çoğaltıldıktan sonra otolog ya da allojenik olarak hastalara uygulanabilir (hücresel terapi) ya da üç boyutlu bir doku iskelesi (*scaffold*) yardımıyla hasar bölgesine farklılaştırılarak ya da farklılaştırılmadan uygulanabilir (doku mühendisliği). Bu yaklaşımlar defekt özelliğine göre değişiklik göstermektedir (Schmitt ve diğ. 2012).

Gen Aktarım Yöntemleri

Gen aktarımı, hücrelerde olmayan bir özelliği kazandırmak, var olan bir özelliği güçlendirmek ya da zayıflatmak veya tamamen yok etmek amacıyla gen ifadesinin değiştirilmesi amacıyla kullanılan yöntemlerin tümüne verilen isimdir (Jones ve diğ. 2015). İdeal bir gen aktarımında karşılanması beklenen 3 kriter bulunmaktadır. Bunlardan ilki aktarılan genin hücre içinde nükleazlar tarafından yıkılmamasıdır. İkincisi, aktarılan genin hücre zarından ve çekirdek zarından geçebilmesidir. Üçüncüsü ise zararlı etkilerinin olmamasıdır. Hürelere gen aktarımı için kullanılan yöntemler ana üçbaşlıkta toplanabilir: Fiziksel, biyolojik ve kimyasal yöntemler. Bu yöntemler Çizelge 1.3' te özetlenmiştir.

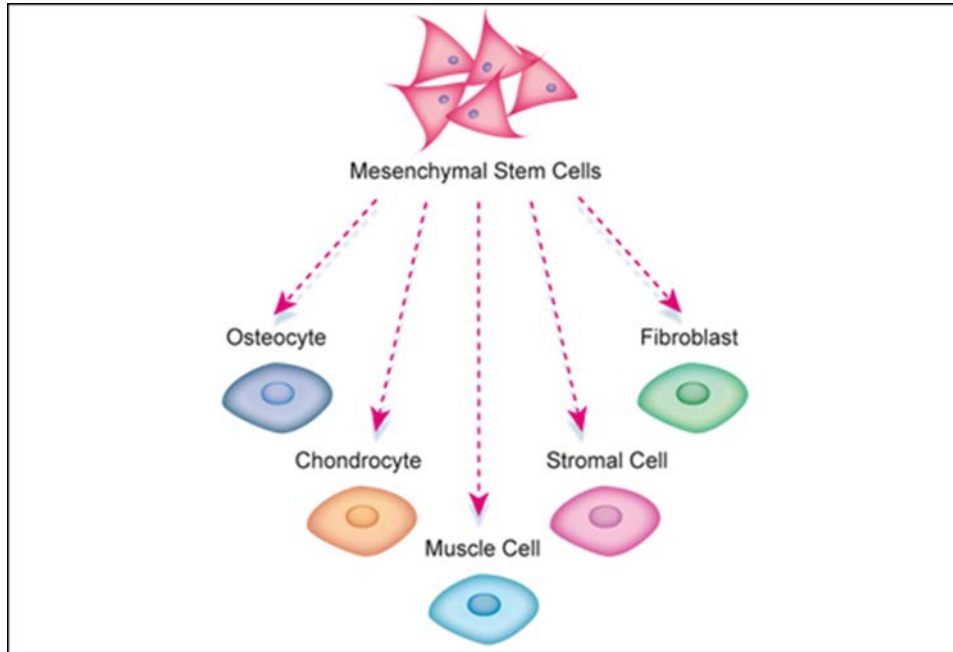
Çizelge 1.3. Gen aktarım yöntemleri (Kim ve Eberwine 2010).

CİNSİ	YÖNTEM	AVANTAJ	DEZAVANTAJ	ÖRNEK
Biyolojik	Virüs aracılı	Yüksek verim Kolay kullanım	Kullanıcıya potansiyel zarar Mutagenез ihtimali var İmmunojenik	Herpes simpleks virüsü, adeno ilişkili virüsler, vaksina virüsü, Sindbis virüsü
Kimyasal	Katyonik polimer, Kalsiyum fosfat, Katyonik lipid,	Virial vektör yok Yüksek verim Kolay kullanım	Bazı hücre tiplerine karşı toksik Hücre tipi veya durumuna göre değişik verim	DEAE (diethylaminoetil)- dekstran, polletilenimin, lipofektin, polibren, kalsiyum fosfat, lipofektamin
Fiziksel	Doğrudan enjeksiyon, Biyolistik parçacık bombardımanı, Elektroporasyon, Lazer radyasyon, Sonoporasyon, Manyetik nanopartikül	Temel prensipler üzerine kurulu Nükleik asitlerin hücre içinde yeni den yerleşimi söz konusu Vektör ihtiyacı yok Hücre tipi ve durumuna daha az bağımlılık	Özel cihaz gereksinimi Nükleik asitlerin korunmasız olması Prosedür ve operatör bağımlı	Mikroigne, Gene Gun, Amaxa Nucleofector, fototransfeksiyon

Elektroporasyon yönteminde hücreye kısa süreli bir elektrik şoku verilir. Bu şok nedeniyle hücre zarında ve çekirdek zarında geçici porlar açılır. Nükleik asit bu esnada hücre içine alınır ve gen aktarımı gerçekleştirilmiş olur. Kolay ve hızlı bir yöntem olup tek seferde yüksek miktarda hücreye gen aktarılmasına imkan verir. Ancak önce elektroporasyon koşullarının o hücre tipi için belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Kim ve Eberwine 2010).

1.4.4. Mezenkimal Kök Hücreler

mezenkimal kök hücreler (MKH), kültüre alındığında kültür kabına yapışma özelliği gösteren, kendine özgü bir yüzey antijenleri ekspresyon profili bulunan ($CD105^+$, $CD90^+$, $CD73^+$, $CD34^-$, $CD45^-$, $CD11b^-$ ya da $CD14^-$, $CD19^-$ ya da $CD79a^-$, $HLA-DR1^-$) (Docheva ve diğ. 2008, Orth ve diğ. 2014) ve *in vitro*da birden fazla soya (*multilineage*) farklılaşma kapasitesine (osteojenik, kondrojenik ve adipojenik) sahip bir kök hücre popülasyonudur (Çizim1.13) (Longo ve diğ. 2012, Dominici ve diğ. 2006). Kemik iliği (Gnecchi ve Melo, 2009, Fafián-Laborave diğ. 2015), adipozdoku (Zuk ve diğ. 2001), dental pulpa (Perry ve diğ. 2008), periodontal ligament, amniyotik sıvı, endometriyum, plasenta, kordon kanı (Siboy ve diğ. 2012), Wharton jeli (Ding ve diğ. 2015, Batsali ve diğ. 2013), timuslar, paratiroid bezi, pankreatik adacıklar (Zanini ve diğ. 2011) gibi birçok dokuda bulunmaktadır. Erişkin dokulardan kolaylıkla izole edilebilmeleri, teratom oluşturmamaları ve etik problemlerinin olmaması onların klinikte bir tedavi ajanı olarak değerlendirilmelerine yardımcı olmuştur (Knoepfler, 2009).

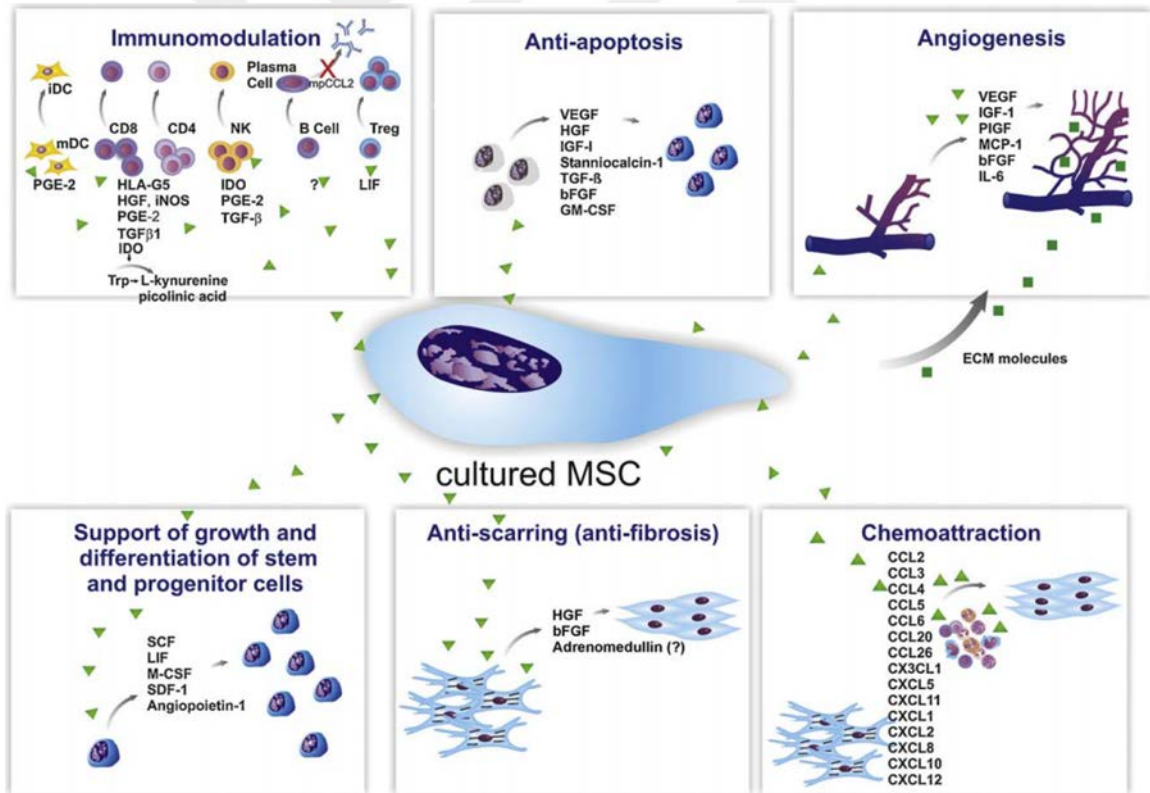


Çizim1.13. Mezenkimal kök hücre plastisitesi (AbD Serotec, 2014).

Mezenkimal kök hücrelerin özellikleri

Bu hücreleri klinikte değerli kılan önemli özellikler mevcuttur. Bu özellikler:

- Apoptoza karşı olma (antiapoptotik)
- İmmun sistemi baskılama (immunsupresif)
- İltihabi yanıtı engelleme (antienflamatuar)
- Mevcut lokalize kök ve progenitör hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını destekleme
- Yara oluşumunu engelleme (antiskar, antifibroz)
- Kemoatraktan salgılama
- Neovaskülarizasyon indüksiyonu olarak tanımlanabilir (Çizim1.14) (Silva Meirelles ve diğ. 2009).



Çizim1.14. Mezenkimal kök hücrelerin parakrin etkileri (Silva Meirelles ve diğ. 2009).

MKH' ler, salgıladıkları IDO, PGE-2, TGF-β, LIF, iNOS gibi moleküllerle immün sistem hücreleri CD4 T, CD8 T, Treg, NK ve B lenfositleri üzerinde düzenleyici rol oynayarak immunsupresyonu sağlamaktadırlar (Silva Meirelles ve diğ. 2009). Bu nedenle

immün sistemin baskılanması gereken, nakil sonrası ortaya çıkan graft-versus-host hastalığı (GVHD) gibi komplikasyonlar ve hastalıklarda tedavi elemanı olarak kullanılmaları söz konusudur.

Aynı zamanda bu hücreler VEGF, HGF, TGF- β , bFGF, GM-CSF, IGF-1 gibi salgılar yaparak antiapoptotik etki gösterirler. Bu özellikleri ile de otoimmün ataklara karşı koyma özelliklerine sahiptirler (Silva Meirelles ve diğ. 2009). İşte bu özellik onları özellikle otoimmün hastalıkların tedavisi için en büyük aday haline getirmektedir. Romatoid artrit, deneysel otoimmün ensefalomyelitis, multiple skleroz ve diyabet gibi birtakım otoimmün hastalıklarda MKH kullanımı halen araştırılan ve üzerinde klinik denemeler bulunan bir uygulama alanıdır. Örneğin Centeno ve diğ. (2008) osteoartrit vakalarında gerçekleştirdikleri klinik çalışmayla otolog MKH'lerin perikütanöz olarak diz içine uygulanmasının eklem kıkırdağı hacmini ve meniskal doku rejenerasyonunu arttırdığını ortaya koymuşlardır.

1.5.PRL' in MKH' ler üzerine etkileri

Yapılan çalışmalarda, PRL' in MKH' ler üzerine olan etkileri incelendiğinde elde edilen bulgular göstermektedir ki, PRL, MKH' lerin osteojenik ve kondrojenik soya farklılaşmasını düzenlemektedir. Ogueta ve diğ. (2002) sinoviyal sıvıdan PRL izole edip MKH' lerin kondrosit fenotipini kazanırken PRLR' deki değişimini araştırmışlardır. Elde ettikleri verilere göre PRLR bu proseste orta formda eksprese edilmekte ve hücre proliferasyonunda daha da fazla rol oynamaktadır. İçeriği bilinen besiyeri ortamında kültüre edilen MKH agregatlarında PRL' in tip II kollajen ve hipofiz dışı PRL üretimini indüklediği gösterilmiştir. Bu agregatların histomorfolojik analizleri PRL' in proteoglikan sentezini ve glukokortikoidlerle birlikte boyuna kolonlar şeklinde bir doku yapısı oluşumunu uyardığını göstermiştir. Bu verilerin PRL-PRLR sisteminin kemik ve kıkırdak oluşum ve tamir prosesinde önemli roller üstlendikleri belirtilmiştir.

2. AMAÇ

İlk bölümde bahsedilen tüm bilgiler birlikte değerlendirildiklerinde hem PRL' in hem de MKH' lerin apoptozu engelleme ve kondrojenik farklılaşma konusunda tamamlayıcı özelliklerinin bulunduğu anlaşılmaktadır. Tedavi elemanı olarak bu ikisinin birlikte kullanımı birçok sorunun çözümü olabilir. PRL' in gen transferiyle kök hücreye kazandırılması ise, özelliğin kök hücre tarafından devamlı olarak taşınması, yani hem kök hücre özelliği taşıyan hem de PRL' i devamlı salgılayan bir hücre hattı oluşturulması demektir.

Yapılan literatür taramasında PRL geni aktarılmış mezenkimal kök hücrelerin varlığına ve kullanımına rastlanmamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasıyla öncelikle aktarılan geni kalıcı olarak ifade eden bir kök hücre hattı elde edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca daha önce üretilmemiş bu hücre hattının ortak kültür ortamında nasıl davrandığının gözlenmesi ve ortak kültürde yöntemsel olarak izlenmesi gereken adımların irdelenmesi hedeflenmiştir. Doku mühendisliğinin bir elemanı olarak kullanılmak üzere tasarlanan bu hücreler, üretilmeleri ve davranışlarının incelenebilmesi halinde bu hücrelerin ileride doku iskeleleri ile birleştirilen başka çalışmalarda kullanılması hedeflenmektedir.

Özetle bu çalışmada;

1. PRL genini sürekli ifade eden bir MKH hattı oluşturulması
2. Bu hücrelerin kültürdeki davranışlarının gözlenmesi
3. hCA' larla birlikte ortak kültüre alındıklarında nasıl davrandıklarının gözlenmesi
4. Ortak kültür için yöntem önerisinde bulunulması amaçlanmıştır.

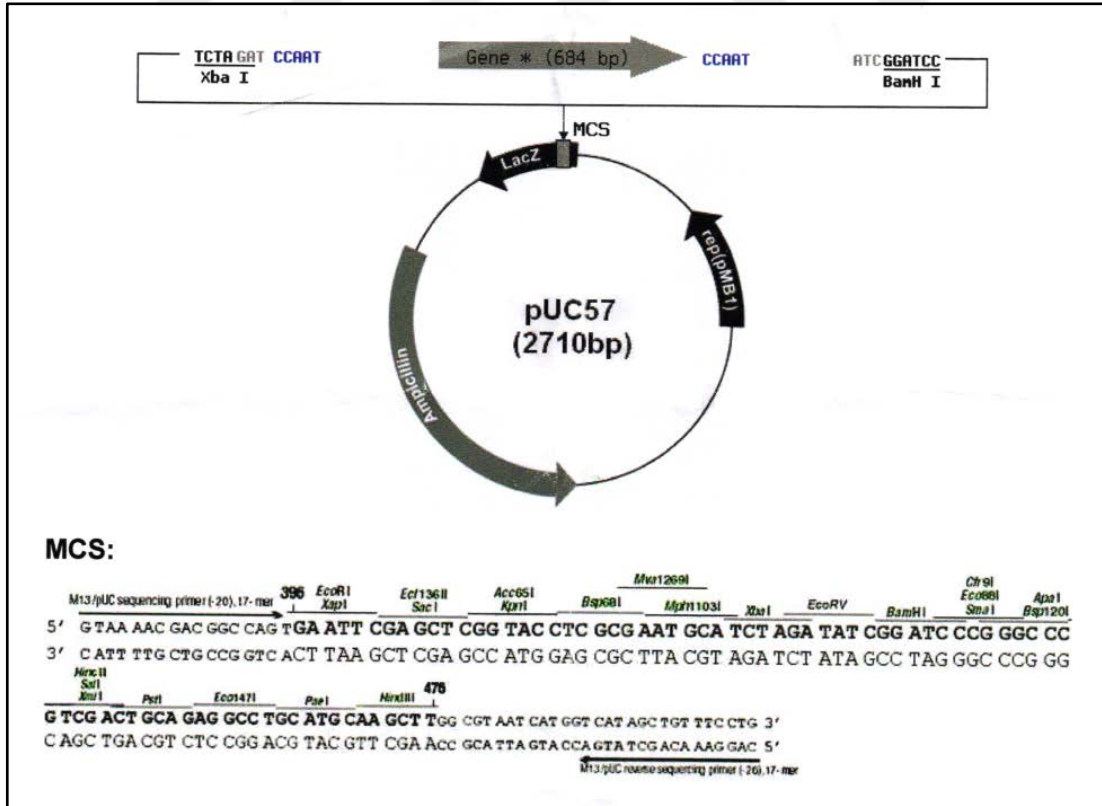
3. YÖNTEM

3.1. Seçilen Gen: Prolaktin (PRL)

Hücrelere aktarılmak üzere insan prolaktin (PRL) geni (GenBank Acc. No. NM_001163558) seçildi. Hücrelerin etkinliğini geliştirmesi öngörülen PRL' in gen kimliği (*gene ID*) 5617 olup gen insanda 6. kromozomun p kolunda (6p22.3) 5001-20610 baz çiftleri (*base pair*, bp) arasında kodlanmaktadır (Gene Cards, 2015) (Çizim 3.1). İki farklı mRNA varyantı bulunmakta ve her biri tamamen aynı proteini kodlamaktadır. Ancak 5' UTR (*untranslated region*, kodlanmayan bölge) bölgeleri farklılık göstermekte ve birinci varyant daha uzun bir transkripti temsil etmektedir (NCBI, 2015). Hücrede en çok ifade edilen varyant 2 seçildi ve PRL gen dizisi pUC57 vektörü içinde temin edildi (Çizim 3.2).



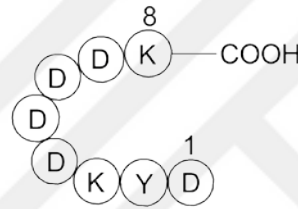
Çizim3.1. PRL geninin insan kromozomu üzerindeki yeri (Gene Cards, 2015).



Çizim3.2. PRL' in temin edildiği plazmidin yapısı. PRL geni (2. varyasyon) 648 baz çifti uzunluğunda olup vektöre HindIII ile BamHI kesim bölgeleri arasına yerleştirilmiştir.

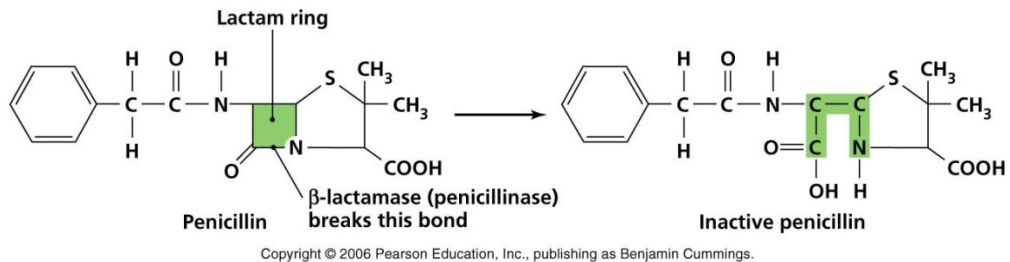
3.2.Seçilen Vektör: N-terminal pFLAG-CMV-3

Vektör olarak N-terminal pFLAG-CMV-3 ekspresyon mekik (*shuttle*) vektörü (Sigma Aldrich, Amerika) seçildi (Çizim 3.3, takip eden sayfada). Bu vektör, FLAG peptit dizisi (Çizim 3.4) ile füzyon proteini oluşturulmasına ve FLAG peptidinin tespiti yoluyla hedef gen ürünü proteinin takibine imkân vermektedir. Preprotripsin yönlendirici dizisi FLAG dizisinin önünde yer almakta ve füzyon proteinini kültür ortamına yönlendirmektedir. Vektörde promotor olarak sitomegalovirüs (CMV) promotor bölgesi yer almaktadır. Vektör hem bakteriyel replikasyon orijinini hem de SV40 replikasyon orijinini taşımakta, bu sayede hem memeli hem de *Escherichia coli* gibi bakteri sistemlerinde yayılımı sağlamaktadır. Vektörün çoklu klonlama bölgesi (*multiple cloning site*, MCS) HindIII, NotI, EcoRI, BglI, EcoRV, KpnI, XbaI ve BamHI enzim kesim bölgelerini içermektedir.



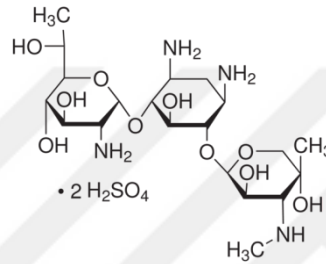
Çizim 3.4. FLAG peptid dizisi. (ApexBio Technology, 2016)

Vektörü içeren hücrelerin seçilmesi, vektör üzerinde bulunan ampisilin direnç geni (amp^r) ve aminoglikozid fosfotransferaz II geni (neo^r) ile mümkün olmaktadır. Ampisilindirenç geni, β -laktamaz adı verilen bir enzimi kodlamaktadır. Bu enzim, penisilin grubu antibiyotiklerde bulunan β -laktam halkasını kırarak antibiyotiği etkisiz kılmaktadır (Çizim 3.5). Ampisilin hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerde hücre duvarının yapımında görev alan transpeptidaz enzimini geri dönüşümsüz olarak inhibe eder, böylelikle bakteriyolitik etki gösterir. Vektörü taşıyan bakteriler ampisilinli ortamda hücre duvarı yapımını dolayısıyla canlılıklarını devam ettirebilir, böylelikle seçilmiş olurlar.



Çizim 3.5. Penisilinde β -laktam halkasının (yeşil) β -laktamaz tarafından kırılmasının şematik gösterimi. (Portland Community College, 2016)

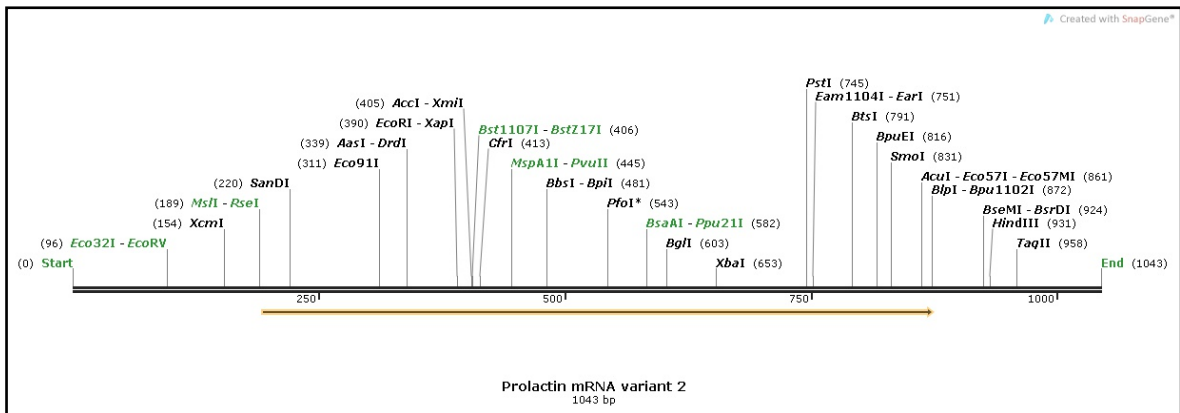
Aminoglikozid fosfotransferaz II geni (neomisin fosfotransferaz II, nptII) ise gram negatif bakterilerin periplazmik boşluğuna salınan aminoglikozid fosfotransferaz II (APH(3')-II) enzimini kodlamaktadır. APH(3')-II, aminoglikozid grubu antibiyotiklerde hidroksil grubunu fosforilleyerek antibiyotiği etkisizleştirmekte, aminoglikozidlere karşı direnci sağlamaktadır. Bu gruba ait antibiyotiklerden biri olan genetisin (G418) (Çizim 3.6), ökaryotlarda sitoplazmik ribozoma (80S) bağlanarak protein sentezinin uzama basamağını engellemektedir. Transfekte edilmiş hücrelerin memeli sisteminde seçilimini sağlamaktadır. Gen aktarımı başarılı olan MKH' ler G418' li ortamda protein sentezini devam ettireceklerinden seçimleri gerçekleştirilebilir.



Çizim 3.6. Genetisinin (G418) yapı formülü (MC Biomedicals, 2015).

3.3.PRL' in Klonlanması

Gen klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere gene özgü primerler tasarlandı. Bu amaçla önce varyant 2' ye ait gen dizisi SnapGene Viewer 2.7.2 programı yardımıyla incelenerek enzim kesim bölgeleri ve translasyona uğrayan bölge (*open reading frame*, ORF) ile seçilen vektöre ait klonlama bölgeleri tespit edildi (Çizim 3.7).



Çizim3.7. PRL mRNA varyant 2' ye ait gen dizisi üzerinde restriksiyon enzim kesim bölgelerinin gösterimi (SnapGene Viewer 2.7.2 programı kullanılarak oluşturuldu.) Sarı ile altı çizili olan kısım ORF' yi göstermektedir.

Klonlama bölgesini kesebilecek enzimlerden yapışkan uç oluşturan, ORF' yi kesmeyen ve çalışmalarda sıklıkla kullanılan HindIII ve BamHI enzimleri tercih edildi. HindIII enziminin kesebileceği dizi genin baş (5') kısmına ve BamHI enziminin kesebileceği dizi de genin sonuna (3') gelecek şekilde genin vektör üzerine oturacağı yöne dikkat edilerek primerler tasarlandı (Çizelge 3.1). Tasarlanan sol (left, forward) ve sağ (right, reverse) primerler Oligo Analyzer 3.1 programıyla analiz edildi.

Çizelge 3.1. Tasarlanan primerlere ait bilgiler. T_m (melting temperature, erime sıcaklığı), primerlerin optimum çalışması için öngörülen erime sıcaklığını temsil etmektedir. Primerlerde altı çizili 6 bazlık bölümler, sol primerde HindIII ve sağ primerde BamHI restriksiyon enzim kesim bölgelerini göstermektedir.

PRİMER	DİZİ (5' – 3')	UZUNLUĞU (BAZ)	T_m (°C)
Sol (<i>Left</i>)	<u>AAGCTT</u> AATGAACATCAAAGGATCGC	25	55,8
Sağ (<i>Right</i>)	<u>GGATCC</u> TTAGCATGGTTTGGTTGTG	23	55,4

Liyofilize halde temin edilen primerler önce 100 μ M' lık ana stok çözelti oluşturmak üzere sulandırıldı. Ardından da PCR kurarken kullanılmak üzere 50 μ M 50 μ l' lik ara stok çözeltilerine seyreltildi, reaksiyonlar bu primer çözeltileriyle kuruldu.

pUC57 içinde temin edilen liyofilize PRL geni de önce 20 μ l distile su (dH_2O) ile sulandırıldı, bu stoktan da 1 μ l alınarak 20' de 1 oranında seyreltildi. PCR kurulurken bu gen çözeltisi kullanıldı.

Gen içermeyen boş pCMV3 plazmidi, NEB C2988 kimlikli kompetent *E. coli* hücrelerine (New England Biolabs, Amerika) üretici firmanın önerdiği yönerge doğrultusunda aktararak plazmidin miktarı çoğaltıldı. Buna göre hücreler önce -80 °C saklama koşulundan alınarak buzda bekletildi. Hücre süspansiyonu eridikten sonra nazikçe karıştırılarak üzerine 10 ng plazmid eklendi. Plazmid eklenmiş hücre süspansiyonu, 30 dakika buzda inkübe edildikten sonra 42 °C' de tam 30 saniye bekletildi. Ardından hemen yeniden buza alınarak 5 dakika daha inkübasyon devam ettirildi. Bu süspansiyonun üzerine 37 °C' de 950 μ l SOC (*super optimal catabolite repression*)besiyeri ilave edildi. 37 °C' de 150 rpm çalkalama ile 1 saat inkübasyon yapılarak hücreler ekime hazır hale getirilen hücreler, plazmiddeki direnç genine uygun olarak ampisilin içeren katı agar petriye ekildi. 37 °C' de 16 saat inkübasyon gerçekleşikten sonra % 0,1 ampisilin içeren 3 ml SOCbesiyeri içine alınarak 32 °C' de 70 rpm çalkalama hızı ile 1 gece sıvı besiyerinde

inkübasyon gerçekleştirildi. Bu aşamadan sonra, elde edilen transforme hücrelerden plazmid izole edildi.

Plazmid izolasyonu için önce sıvı bakteri kültüründen sıvı kısım uzaklaştırıldı, bakteriler pellet halinde elde edildi. RNaz A içeren çözeltiyle sulandırılarak RNA yıkımı gerçekleştirildi. Ardından hücreler lizis çözeltisiyle yıkılarak genetik materyalin açığa çıkarılması sağlandı. İnhibisyon çözeltisi ile bu yıkım reaksiyonu durduruldu ve elde edilen hücre lizati silika tabanlı kolona yüklenerek santrifüjle genetik materyalin kolona tutunması sağlandı. Kolon 2 kere yıkandı ve elüsyon çözeltisiyle kolondan ayrılıp toplanarak plazmid izole edilmiş oldu. İzole edilen plazmidler, boyutunun karşılaştırılabilmesi için *marker (DNA ladder)* ile birlikte (Genaxxon Bioscience, GenLadder 1 kb) jele yüklenerek görüntüleme yapıldı.

Q5 DNA polimeraz enzimi (New England Biolabs, Amerika) kullanılarak PRL için üretici firma tarafından öngörülen ve aşağıda belirtilen koşullarda (Çizelge 3.2, 3.3) PCR kuruldu.

Çizelge 3.2. PRL için gerçekleştirilen, üretici firmanın önerdiği Q5 PCR bileşenleri. (New England Biolabs, 2015) *: Şablon DNA reaksiyonda 1000 ng kullanılmıştır.

BİLEŞEN	MİKTAR (50 µl REAKSİYON İÇİN)	SON KONSANTRASYON
5x Q5 Reaksiyon Tamponu	10 µl	1x
10 mM dNTP	1 µl	200 µM
10 µM sol primer	2.5 µl	0,5 µM
10 µM sağ primer	2.5 µl	0,5 µM
Şablon DNA	Değişken*	<1000 ng
Q5 Polimeraz	0,5 µl	0,02 U/µl
Nükleazsız Su	50 µl' ye kadar	

Çizelge 3.3. Üretici firmanın öngördüğü PCR döngü şartları. *: Bu sıcaklık değeri, kullanılacak primerlere göre hesaplandığında (New England Biolabs, 2015) 67 °C olarak bulunmuştur.

İŞLEM	SICAKLIK	SÜRE
Başlangıç denatürasyonu	98 °C	30 sn
25-30 döngü	98 °C	5-10 sn
	Değişken*	10-30 sn
	72 °C	20-30 sn/kb
Son uzama	72 °C	2 dk

PCR ürünleri, 1x TAE tamponu ile hazırlanan % 1' lik agaroz jele yüklenerek 90 V' ta jelin 2/3' ünü yürütecek kadar (yaklaşık 30-35 dakika) elektroforez yapıldı. Jel görüntülenerek PRL boyutunda (684 bp) gözlenen bant jelden kesildi. Bu PCR ürünü kit yardımıyla (Macherey Nagel, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit) jelden saflaştırıldı.

Bu amaçla önce jel parçası 0,5 ml' lik mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine NTI tamponu eklendi. Tamponun jele her noktadan temas etmesi sağlanarak tüp önceden 50 °C' ye ısıtılmış bloğun üzerine alındı. Isıtılmaya başlanan tüp 2 dakikada bir ters düz edilerek jelin kaybolması gözlemlendi. Jel tamamen kaybolduktan sonra 2 dakika daha ısıtıcı blokta bekletilerek işlem yaklaşık 12 dakikada tamamlandı. Bu içerik kolona yüklenerek içeriğin kolonda tutulması sağlandı. Kolon, NT3 tamponu ile yıkandı ve kolonda tutulan genetik materyal NE tamponu ile toplandı.

Çoğaltılan PRL geni (*insert*) ve izole edilen boş pCMV3 plazmidi (vektör), birbiriyle yapışkan oluşturularak genin plazmide sokulması amacıyla restriksiyon enzimleriyle kesildi. Kesim reaksiyonu, vektör ve *insertin* molarite açısından oranları 1:6 olacak şekilde, 37 °C' de gece boyu sürdürüldü (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. *Insert* ve vektör için kesim reaksiyonu bileşenleri. *Insertin* yoğunluğu düşük olduğundan reaksiyona su eklenmemiştir.

İNSERT KESİM REAKSİYONU BİLEŞENLERİ		VEKTÖR KESİM REAKSİYONU BİLEŞENLERİ	
BİLEŞEN	MİKTAR (20 µl içinde)	BİLEŞEN	MİKTAR (20 µl içinde)
BamHI	1 µl	BamHI	1 µl
HindIII	1 µl	HindIII	1 µl
10x Tampon	2 µl	10x Tampon	2 µl
İnsert	16 µl (0,66 µg)	Vektör	4 µl (2 µg)
Su (ddH₂O)	-	Su (ddH₂O)	12 µl

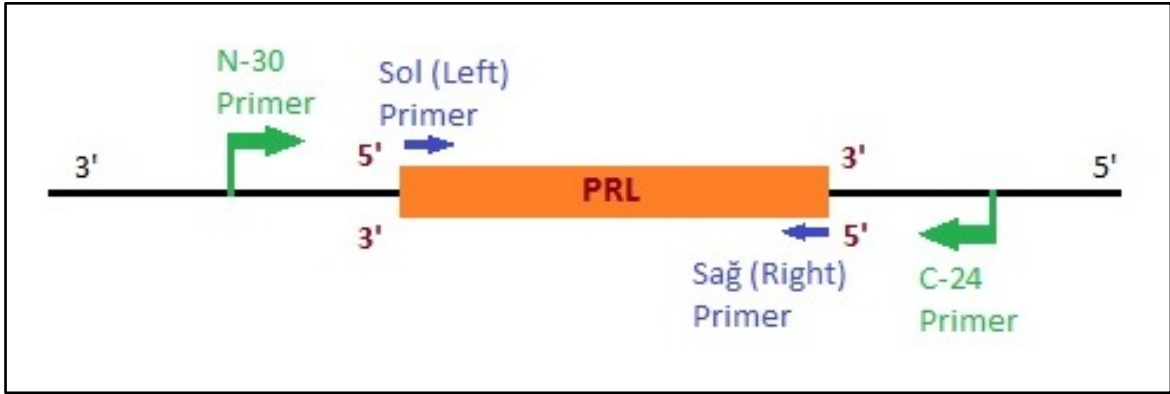
Gece boyu sürdürülen reaksiyon, 80 °C' de 5 dakika enzimlerin inhibe edilmesiyle sonlandırıldı. Kesim reaksiyonu ürünleri, % 1' lik agaroz jelde ve önceden gerçekleştirilen koşullarda elektroforeze tabi tutuldu. Vektör ve *inserte* ait olan bantlar jelde tespit edildi ve bu bantların jelden izolasyonu gerçekleştirildi.

Yapışkan uç oluşturmuş şekilde elde edilmiş olan vektör ve *insert*, ligasyon işlemiyle birleştirildi. Bu amaçla Çizelge 3.5' teki bileşenler ve oranlar kullanılarak ligasyon reaksiyonu 16 °C' de 12 saat boyunca sürdürüldü.

Çizelge 3.5. Ligasyon reaksiyonu bileşenleri (Thermo Scientific, 2015).

BİLEŞEN	ÖNERİLEN (20 µl içinde)	KULLANILAN
Vektör	20 – 100 ng	100 ng (6,5 µl)
İnsert	Vektörle 1:1 ilâ 1:5 oranında	60 ng (0,5 µl)
10x T4 DNA Ligaz Tamponu	2 µl	2 µl
T4 DNA Ligaz	1 Weiss ünite	0,2 µl (=1 Weiss ünite)
Nükleazsız su	20 µl' ye kadar	10,8 µl

Reaksiyon 65 °C' de 10 dakika inhibe edildi ve 50 µl kompetent hücre 2 µl ligasyon ürünü ile transforme edildi. Transforme edilmiş hücre süspansiyonununun 100 µl' si, ampisilin içeren katı agara ekildi. Ekim sonunda petride büyüyen koloniler yeniden ampisilinli LB Broth içine ekildi ve 37 °C' de 1 gün inkübe edildi. Bu kolonilerden plazmid izole edildi (Macherey Nagel, NucleoBond® Xtra Midi Kit). PCR ile plazmidlerden dolu olanlar tespit edildi ve bir sonraki aşamada bu plazmidler için yön tayini yapıldı. Yön tayini için, vektörün üzerinde ancak MCS dışında, N terminale 30 bp uzaklıkta ve C terminale 24 bp uzaklıkta bağlanabilen primerlerle (Çizim 3.8) pozitif ve negatif reaksiyonlar kuruldu (Çizelge 3.6).



Çizim 3.8. Yön tayini için kullanılan tüm primerler ve genin vektör üzerindeki yerinin bir arada gösterimi.

Çizelge 3.6. Yön tayini için kurulan reaksiyonların bileşenleri.

DÜZ YÖN TESPİTİ		TERS YÖN TESPİTİ	
BİLEŞEN	MİKTAR (µl)	BİLEŞEN	MİKTAR (µl)
Tampon	2,5	Tampon	2,5
MgCl ₂	2	MgCl ₂	2
dNTP	0,4	dNTP	0,4
DNA	0,2	DNA	0,2
C-24 primer	0,5	N-30 primer	0,5
Sol primer	0,5	Sol primer	0,5
ddH ₂ O	18,5	ddH ₂ O	18,5
Taq DNA Polimeraz	0,4	Taq DNA Polimeraz	0,4
<i>Toplam Hacim</i>	25	<i>Toplam Hacim</i>	25

Çizelge 3.6' da bileşenleri belirtilmiş reaksiyon kurularak genin düz yönde girdiği koloni tespit edildi. Bu koloniden endotoksinsiz plazmid DNA saflaştırması, kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi (Macherey Nagel, Endotoxin-free Plasmid DNA Purification Kit).

3.4.Gen Aktarımı ve Ortak Kültür İçin Hücrelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonları

3.4.1. Mezenkimal Kök Hücreler

MKH' lerin kültüre edilmeleri için önce hücreler çözdürüldü. Bunun için -152 °C' de donmuş halde bulunan hücreler 37 °C' ye ayarlanmış su banyosunda çalkalama etkisiyle çözüldü. Bu hücre süspansiyonunda bulunan dondurma ajanı ve atık materyallerden kurtulmak için, süspansiyon üzerine hücre kültür besiyeri eklenerek 300 x g' de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak hücreler pellet halinde elde edildi. Hücreler sayılarak deneye uygun hacimde besiyeri ile süspanse edildi.

Hücrelerin kültüründe kullanılan besiyeri içeriği (hazır besiyeri) α -MEM (*Minimum Essential Medium Eagle- α Modification*) (Pan Biotech, Almanya) bazal besiyeri, % 10 FBS (fetal bovin serum) (Gibco, Amerika) ve % 1 penisilin-streptomisin (Gibco, Amerika) kullanılarak oluşturuldu. MKH' lerin pasajlanması esnasındaki yıkamalarda ve farklılaşma besiyerlerinin hazırlanmasında da bu hazır besiyeri bileşimi kullanıldı.

Osteojenik farklılaşma ve hücrelerin fiksasyonu

Hücreler 6 kuyucuklu kültür kabına ekildi. % 80 konfluensiye ulaşana dek hazır besiyeri ile kültüre edildi. Daha sonra hazır besiyerine 10 nM β -gliserofosfat, 10^{-8} M dekzametazon ve 50 μ g/ml askorbik asit eklenmiş farklılaşma besiyeri ile kültür aşaması devam ettirildi. Her 2 günde bir besiyeri değiştirildi. Kültürde morfolojik değişime göre takip edildi. Osteojenik farklılaşma belirteci olarak kabul edilen kalsiyum nodüllerinin görülmesi ile kültür sonlandırılıp hücreler fikse edildi. Fiksasyon, % 70' lik soğuk alkolle oda sıcaklığında 5 dakika muamele ile gerçekleştirildi. Ardından görüntüleme için alizarin red S boyaması yapıldı.

Alizarin red S boyaması

Fikse edilmiş hücrelere dH₂O ile su kazandırıldı. Alizarin red S boyası hücrelere konup 45 sn beklendi. Ardından sırasıyla dH₂O, aseton, aseton-ksilol (1:1) ve ksilol ile muamele edilip hücreler kurumaya bırakıldı. Kapatma sıvısı ile kapatılıp ışık mikroskobu ile görüntü alındı.

Adipojenik farklılaşma ve hücrelerin fiksasyonu

Hücreler 6 kuyucuklu kültür kabına ekildi. % 80 konfluensiye ulaşana dek hazır besiyeri ile kültüre edildi. Daha sonra hazır besiyerine 200 μ M indometazin, 0,5 mM 3-izobütil-1-metilksantin (IBMX) ve 1 μ M dekzametazon eklenmiş farklılaşma besiyeri ile kültür aşaması devam ettirildi. Her 2 günde bir besiyeri değiştirildi. Kültürde morfolojik değişime göre takip edildi. Adipojenik farklılaşma belirteci olarak kabul edilen yağ damlacıklarının görülmesi ile kültür sonlandırılıp hücreler fikse edildi. Fiksasyon için hücrelere önce % 4' lük paraformaldehit (PFA) eklenip 10 dakika bekletildi. Ardından birkaç kez Ca²⁺ ve Mg²⁺ içeren PBS ile yıkandı. Çok kısa bir süre asetonla muamele edildi. Metanol eklenip -20 °C' de 10 dakika bekletildi. PBS ile yıkayıp kurutulduktan sonra görüntüleme için oil red O boyaması yapıldı.

Oil red O boyaması

Hücrelerin üzerine oil red O boyası eklenip oda sıcaklığında 5 dakika beklendi. Birkaç kez dH₂O ile yıkayıp kurutuldu. 4',6 diamidino -2- fenilindol (DAPI) çekirdek boyası kapatılarak floresan mikroskopta görüntü alındı.

3.4.2. Kondrositler

hCA' ların kùltùre edilmeleri için önce hücreler çözdürüldü. Bunun için -196 °C' de donmuş halde bulunan hücreler 37 °C' ye ayarlanmış su banyosunda çalkalama etkisiyle çözüldü. Bu hücre süspansiyonunda bulunan dondurma ajanı ve atık materyallerden kurtulmak için, süspansiyon üzerine hücre kùltür besiyeri eklenerek 300 x g' de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak hücreler pellet halinde elde edildi. Hücreler sayılarak deneye uygun hacimde besiyeri ile süspanse edildi.

Hücrelerin kùltüründe kullanılan besiyeri içeriği (hazır besiyeri) DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12 Medium, 1:1, 1x) (Gibco, Amerika) bazal besiyeri, % 10 FBS (Gibco, Amerika), %1 penisilin-streptomisin (Gibco, Amerika), 50 µg/ml askorbik asit, % 1 temel olmayan aminoasit (NEAA) (Gibco, Amerika) ve 200 mM L-glutamin (Gibco, Amerika) ile oluşturuldu. hCA' ların pasajlanması esnasındaki yıkamalarda ve apoptoz sinyallerinin sulandırılmasında bu hazır besiyeri bileşimi kullanıldı.

İmmunfloresan boyamalar

hCA' ların kendilerine özgü belirteçleri ifade ettiklerini gösterebilmek, gen aktarılmış MKH' lerde aktarımın başarılı olduğunu kanıtlamak ve bunların hücre içindeki yerini belirlemek için hücreler Çizelge 3.7' de belirtilmiş blok serumlar, primer antikorlar ve sekonder antikorlar kullanılarak immün boyamaya tabi tutuldu.

İmmün boyama yapılması amaçlanan hücreler önceden 8 kuyucuklu lamlara ekilerek büyütüldü. Kuyucuklar besiyerinden arındırılmak için Ca²⁺ ve Mg²⁺ içeren PBS çözeltisi ile yıkandı (Invitrogen Corporation, Amerika). Boyama prosedüründeki PBS ile yıkama aşamalarının tamamında bu çözelti kullanıldı. Üreticinin önerdiği oranlar kullanılarak blok serum, primer antikor ve sekonder antikor çözeltileri hazırlandı. Nükleer boyama için blok seruma % 0,1 oranında *tween-20* konarak boyanın hücre içine nüfuz etmesi sağlandı. Önce her bir kuyucuğa yüzeyi kaplayacak kadar blok serum eklenerek sıcak ve nemli ortamda 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki serum atıldı ve yüzeyi kaplayacak kadar primer antikor kondu. Sıcak ve nemli ortamda 2 saat inkübe edildikten sonra PBS ile yıkandı. Ardından yüzeyi kaplayacak kadar primer antikor eklenip karanlıkta ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Bu aşamanın bitiminde ise sırasıyla PBS ve dH₂O ile yıkayıp karanlıkta bekletilerek lamların kuruması sağlandı.

Görüntümeden önce lamalar DAPI ile kapatıldı. Görüntüleme, floresan mikroskopta gerçekleştirildi.

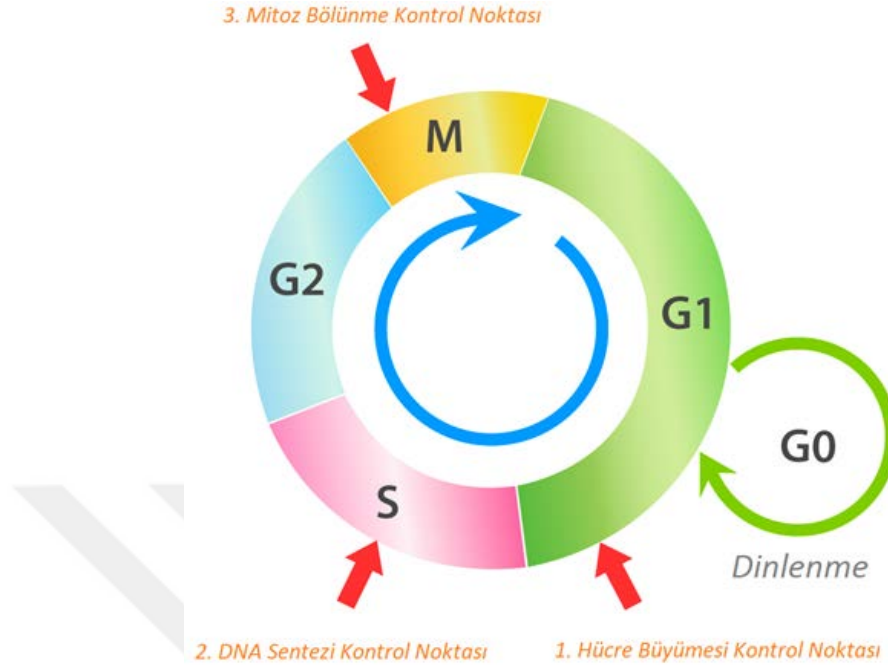
Çizelge 3.7. hCA' ların karakterizasyonu için kullanılan antikor ve serumların listesi. COL1A1: Tip 1 kollajen, COL2A1: Tip 2 kollajen için üretici firma tarafından kullanılmış kısaltmalardır. Serum ve antikorlar, firmanın kataloğunda yer alan orijinal isim ve numaralarıyla belirtilmiştir.

CİNSİ	ADI	FİRMA	KATALOG NO	HÜCREDEKİ YERLEŞİM
Blok serum	Normal goat serum	Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-2043	
	Normal donkey serum	Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-2044	
Primer antikor	Aggrecan (D-20)	Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-16492	Sitoplazmik
	COL1A1 (C-18)	Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-8784	Sitoplazmik
	COL2A1 (M2139)	Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-52658	Sitoplazmik
	Sox-9 (H-90)	Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-20095	Nükleer
Sekonder antikor	Goat anti-rabbit IgG-FITC	Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-2012	
	Donkey anti-goat IgG-FITC	Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-2024	
	Goat anti-mouse IgG ₁ -FITC	Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-2078	

Hücre Döngüsü Analizi

Hücrelerin proliferasyonlarının değerlendirilmesi için hücrenin hangi evrede olduğunu gösteren hücre döngüsü analizi yapıldı. Bu analizde hücrenin G₀, G₁, S, M ve G₂ evrelerinden hangisinde olduğuna, DNA ploidisine göre karar verilir (Çizim 3.14). Bu amaçla kullanılan kitte önerilen yöntem uygun olarak (Becton Dickinson, CycleTEST Plus Kit) hücreler soğuk PBS ile yıkandı. İyonik olmayan bir deterjan içeren lizis tamponu ile hücre membranına tahribat verildi, hücreler patlatılarak hücre içeriği açığa çıkarıldı. Ardından tripsin enzimi yardımıyla hücre iç iskeleti ve çekirdekte bulunan proteinler parçalandı. Ribonükleaz A kullanılarak da hücresel RNA' lar parçalandı. Son olarak da spermin ile muamele edilerek nükleer kromatin yapısı korundu. Propidyum iyodid (PI) boyası kullanılarak DNA içeriğinin floresan lazerlerle görüntülenebilir olması sağlandı.

488 nm dalgaboylu lazerle uyarıldı ve 586/42 detektörle tespit edildi (BD Biosciences, 2015). ModFit LT yazılımı kullanılarak veriler analiz edildi.



Çizim 3.9. Hücre siklusu ve kontrol noktaları (BD Biosciences, 2015) (Türkçe'ye çevrildi).

3.5.Gen Aktarımı

-152 °C' de donmuş halde bulunan insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (MKH) transfeksiyon yapılmak üzere 37 °C' de çözülüp kültür besiyeri ile yıkanarak dondurma ajanlarından ve diğer atık materyallerden kurtarıldı. Kültür ortamında proliferasyon olmaları sağlandıktan sonra enzimatik olarak kaldırılan hücrelerin 400.000' i transfeksiyon için kullanıldı. Bu hücreler 2 µg plazmid yapısıyla, 990 V' ta, 40 ms aralıklı 2 atım halinde elektroporasyon yöntemiyle transfekte edildi (Thermo Fisher Scientific, Neon® Transfection System). Transfeksiyonun hemen sonrasında 6 kuyucuklu kültür kabına ekilen hücreler özel bir ortama tabi tutulmaksızın, her zaman kullanılan kültür besiyeri ile kültüre edildi. Aynı miktardaki transfekte edilmemiş hücrelerin ekilmesiyle bir kuyucukta kontrol grubu oluşturuldu. İlk 2 gün besiyeri değişilmezken ilk besiyeri değişiminden itibaren % 0,4 oranında G418 (Roche, İsveç) içeren hazır besiyerinde kültüre devam edilerek antibiyotik direnci yoluyla gen aktarılmış hücrelerin seçilimi sağlandı. Böylelikle PRL geni aktarılmış insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre hattı (PKİ-MKH) elde edildi.

3.6. Apoptoz Optimizasyonu

İnsan artiküler kondrosit hücrelerinin (hCA) apoptoza sürüklenmesi amacıyla, Adan ve diğ. (2013) belirttiği gibi bir sitokin kokteyli kullanılması amaçlandı. Bu nedenle kokteyl bileşenlerinin farklı konsantrasyonlarıyla WST-1 (*Water-soluble tetrazolium salt-1*; suda çözünebilen tetrazolyum tuzu-1) yöntemi temelli bir optimizasyon deneyi tasarlandı.

Kokteyl bileşenleri olan TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ sitokinlerinin belirtilen makalede yer alan konsantrasyonları, bu konsantrasyonların yarısı ve iki katı olan konsantrasyon değerleri seçildi. Buna göre kombinasyon hesabı yapıldı (Denklem 3.1).

$$\binom{a}{b} = \binom{3}{3} = 27$$

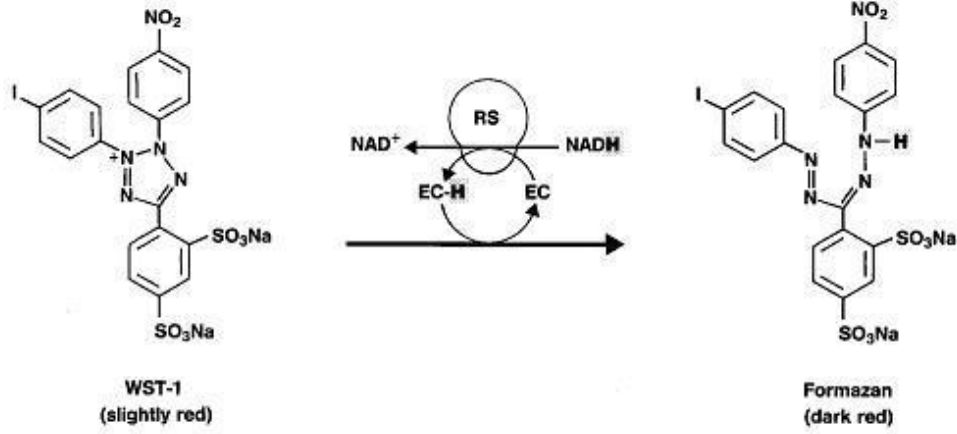
Denklem 3.1. Üç çeşit sitokin için üç farklı konsantrasyon değeri için kombinasyon hesabı. a : sitokin sayısı ve b : her bir sitokin için denenecek konsantrasyon değeri sayısını temsil etmektedir.

Denklem 3.1' e göre üç çeşit sitokin için üçerli kombinasyonları, toplam 27 grupta oluşturuldu. Sinyaller oluşturulduktan sonra WST-1 aşamasına geçildi.

3.6.1. WST-1 Analizi

Bu kolorimetrik testin prensibi, stabil tetrazolyum tuzu WST-1'in öncelikli olarak hücre yüzeyinde meydana gelen hücresel mekanizmalar yoluyla çözünebilen formazan kristallerine parçalanması ve bu nedenle ortaya çıkan renk değişiminin incelenmesine dayanmaktadır (Çizim 3.9). Bahsedilen biyoredüksiyon, büyük ölçüde canlı hücrelerdeki glikolitik NAD(P)H üretimine bağlı olup bu durum formazan boyasının miktarının doğrudan metabolik olarak aktif olan hücre miktarıyla orantılı olmasını sağlamaktadır (Roche, 2016).

Yani daha basite indirgenirse, hücre yüzeyinde meydana gelen ve tetrazolyum tuzunun parçalanmasını sağlayan olaylar hücrenin canlılığıyla ilişkili olacağı için ortama eklenen WST-1 ancak canlı hücreler tarafından formazan kristallerine parçalanabilecektir. Normalde açık kırmızı bir rengi olan WST-1, formazan kristallerine parçalandığında koyu kırmızı renk almaya başlayacaktır. Bu renk değişimi de canlılıkla doğru orantılı olarak değişim gösterecektir.



Çizim 3.10. Tetrazolyum tuzunun formazana parçalanması (Roche, 2016).

Hücelere herhangi bir etki verildiğinde bunun hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi, radyoaktif olmayan bu yöntemle güvenli ve kolay bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Bu değişim uygun bir spektrofotometrik okuyucu ile incelendiğinde kantitatif olarak değerlendirilebilmekte ve yüzde hesabı yapılabilmektedir.

Optimizasyon deneyi için hücreler üzerine apoptotik etkileri incelenecek olan sinyaller ticari olarak edinildi (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. Kullanılan sinyallere ait firma ve katalog numarası bilgileri.

SİNYALİN ADI	FİRMA	KATALOG NO
TNF- α	Biological Industries	30-T223-B
IL-1 β	Biological Industries	30-T208-B
IFN- γ	Biological Industries	30-T206-A

Bu sinyaller için Çizelge 3.9’ de belirtilen konsantrasyonlar seçildi ve sinyal bileşimleri hCA’ lar için kullanılan hazır besiyeri içinde sulandırıldı.

Çizelge 3.9. Optimizasyonda kullanılan konsantrasyon değerleri. Bu değerler 1, 2 ve 3 rakamlarıyla eşleştirilmiş olup Çizelge 3.10’ da belirtilen kodlamada belirteç olarak kullanılmışlardır.

	TNF- α		IL-1 β		IFN- γ
1	12,5 ng/ml	1	5 ng/ml	1	5 ng/ml
2	25 ng/ml	2	10 ng/ml	2	10 ng/ml
3	50 ng/ml	3	20 ng/ml	3	20 ng/ml

hCA’ lar Çizelge 3.10’ daki gibi 96 kuyucuklu kültür kabına (BD Falcon, 6-well Standard Tissue Culture Plates) kuyucuk başına 3500 hücre olacak şekilde kendi besiyerlerinde ekildi. WST-1 ajanının absorbans hesabından çıkarılabildiği amacıyla

yapılacak kör okutma (*blank*) için ilgili kuyucuklara hücre ekilmezken kontrol okutması için hücre ekimi yapıldı. Her bileşim aynı anda 3 kuyucukta tekrarlandı. Bir gün boyunca hücrelerin kültür kabına yapışmaları beklendi. Daha sonra sinyaller Çizelge 3.10’ da gösterilen düzende, 300 µl hacimde, besiyeri değişimi şeklinde hücrelere verildi. Hücreler bu apoptotik sinyallerle 72 saat boyunca kültüre edildi.

Çizelge 3.10. Sinyal bileşimlerinin 96 kuyucuklu kültür kabında temsili gösterimi. Kuyucukların içlerinde üçlü rakamlarla ifade edilen kodlama, üç çeşit sitokin kullanılarak konsantrasyon değerlerini (Çizelge 3.9’ da belirtilen) ifade etmektedir. Kodun ilk rakamı TNF- α için kullanılan konsantrasyonu, ikinci rakamı IL-1 β için kullanılan konsantrasyonu, üçüncü rakamı ise IFN- γ için kullanılan konsantrasyonu simgelemektedir. Sözelimi E4-E5-E6 kuyucuklarını kapsayan “231” kodu TNF- α için 25 ng/ml, IL-1 β için 20 ng/ml ve IFN- γ için 5 ng/ml konsantrasyondaki bileşimin kullanıldığını ifade etmektedir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK			KONTROL			111			112		
B	113			121			122			123		
C	131			132			133			211		
D	212			213			221			222		
E	223			231			232			233		
F	311			312			313			321		
G	322			323			331			332		
H	333											

10x halinde temin edilen WST-1 ajanı (Roche Diagnostics, Cell Proliferation Reagent WST-1), hCA’ ların kültüründe kullanılan bazal besiyeri ile sulandırılarak 1x haline getirildi. Kör okutmada da, hazırlanan bu 1x’ lik WST-1 çözeltisi kullanıldı. 72 saatlik kültürün sonunda apoptotik sinyalleri içeren besiyerinin tamamı çekilerek tüm kuyucuklara eşit hacimde (100’ er µl) 1x WST-1 ajanı eklendi. 37 °C’ de inkübasyona başlandı ve 2,5 saat sonra renk değişiminin yeterli olduğuna karar verilip deney sonlandırıldı. 450 nm ve 630 nm’ de okutma yapıldı. Absorbans değerleri kontrol ile oranlanarak yüzde cinsinden canlılık elde edildi.

3.7.Ortak Kültür

Öncelikle ortak kültür elemanları olan hücreler, flasklar, ayırıcı membranlar (*insert*) (Çizim 3.10) ve kültürün gerçekleştirileceği sinyal içerenve içermeyen besiyerleri, ortak kültür gruplarını oluşturmak üzere hazırlandı.

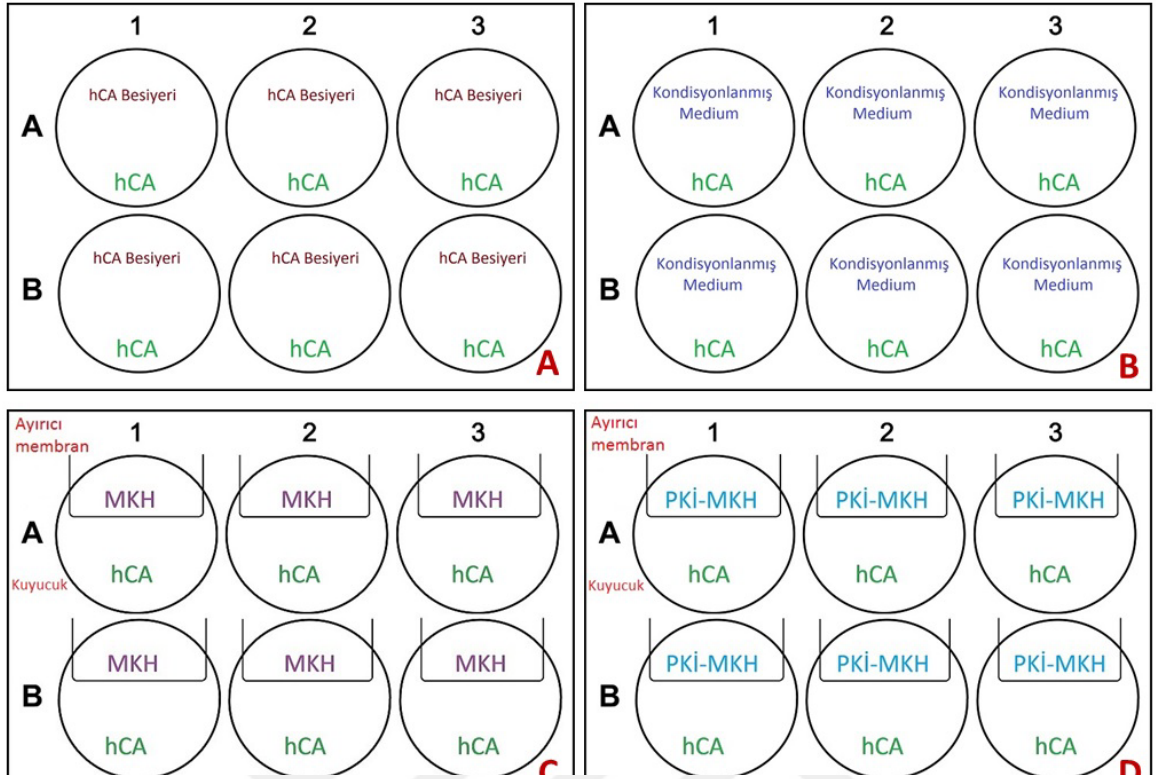


Çizim 3.11. Ortak kültür elemanları. Fotoğrafın üst kısmında 6 kuyucuklu kültür kabı, alt kısmında ise bu kuyucuklara konan ayırıcı membranlar (*insert*) görülmektedir (Bar Naor Ltd, 2016).

Transfekte hücreler (PKİ-MKH) pasaj 3' e kadar büyütülerek kültürde sayıca artırıldı. Aynı anda hCA' lar da MKH' lerle benzer şekilde çözülerek ortak kültüre hazırlandı.

Ortak kültür sistemi 6 kuyucuklu kültür kaplarında (BD Falcon, 6-well standard tissue culture plates) hCA' larla MKH ve PKİ-MKH' lerin birbirleriyle doğrudan temas olmaksızın etkileşmeleri üzerine kurulup 3 µm gözenek çaplı polietilen teraftalat (PET) ayırıcı membranlar (SPL Life Sciences, 6-well PET cell culture inserts with 3 µm pore size) kullanılarak gerçekleştirildi.

Ortak kültür, gen aktarılmış ve aktarılmamış MKH' lerle kurulan 2 gruba ek olarak MKH' lerin kullanılmadığı kontrol grubu ile yürütüldü (Çizim 3.11). Aynı zamanda kondisyonlanmış besiyeri grubu da oluşturuldu ancak tez çalışması kapsamında değerlendirmeye alınmadı. Kültürün 1, 4. ve 7. günlerinde sonlandırılmak üzere deney her bir grup için 3 ayrı kültür kabında yürütüldü. Belirtilen günlerde deney sonlandırılarak hücrelerden ve kültür ortamından analizler yapıldı.

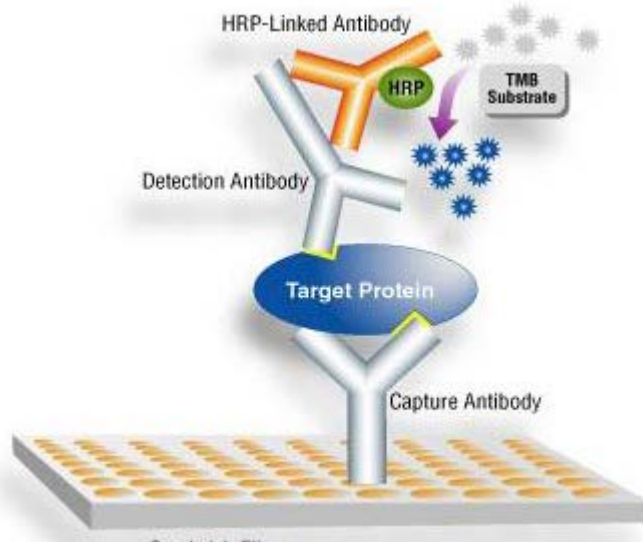


Çizim 3.12. Ortak kültür gruplarının şematize gösterimi. Çemberler hCA' ların ekildiği kuyucukları temsil etmektedir. MKH gruplarının ekildiği ayırıcı membranlar da kuyucukların üzerinde dikdörtgenimsi bir şekilde gösterilmiştir. Kültür kapları; **A:** hCA' ların kendi besiyerleri ile kültürü (Kontrol grubu), **B:** hCA' ların kondisyonlanmış besiyeri ile kültürü, **C:** hCA' ların membran varlığında MKH' lerle kültürü, **D:** hCA' ların membran varlığında PKİ-MKH' lerle kültürü.

3.8.Ortak Kültür Sonrası Testler

3.8.1. ELISA

Kültür ortamından PRL' in tayini için enzim bağlı immunosorbent analizi (ELISA) yapıldı (USCN Life Sciences, ELISA Kit for Prolactin). Sandviç ELISA yöntemi temelli çalışan bu kitle, PRL' e spesifik ve biyotinle konjuge edilmiş bir antikorla önceden kaplanmış olan kuyucuklara örnek eklendikten sonra yalnızca PRL, *horse radish* peroksidaz (HRP) enzimi konjuge edilmiş avidin ve biyotin konjuge edilmiş antikorun var olduğu kuyucuklarda TMB substratının parçalanmasıyla oluşan renk değişiminin gözlenmesi yoluyla PRL tayini gerçekleştirilmektedir (USCN Life Sciences, 2015) (Çizim 3.12).

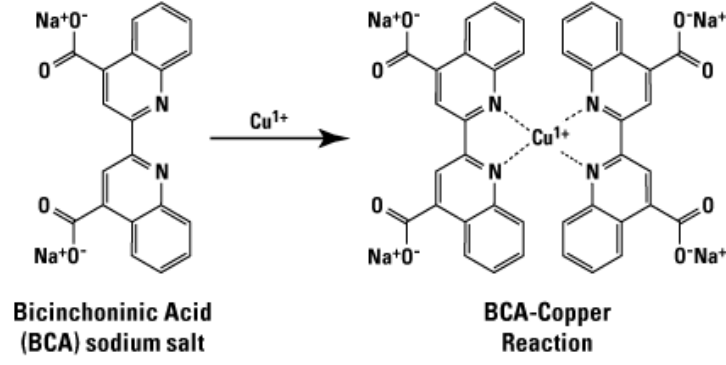


Çizim 3.13. Sandviç ELISA yönteminin prensibi (Wuhan EIAab Science, 2015).

PRL tayini için ELISA yapılacak olan kondisyonlanmış besiyerleri kültür ortamından çekilip santrifüj tüplerine toplandı. 1000 x g' de 20 dakika santrifüj edilip küçük partiküllerden arındırıldı. Kit prosedürüne uygun olarak tüm reaktifler ve standartlar hazırlandı. PRL' e özgü antikorla kaplı kuyucuklara 100' er µl örnek veya standart konup 37 °C' de 2 saat inkübe edildi. Sonraki adımda 100' er µl PRL' e özgü biyotin konjuge edilmiş antikor kuyucuklara eklenip 37 °C' de 1 saat inkübe edildi. Kuyucuktaki tüm çözeltiler aspire edilip yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Ardından 100' er µl avidin konjuge edilmiş HRP eklenip 37 °C' de 30 dakika inkübe edildi. Kuyucuklardaki çözelti aspire edilip yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. 90' ar µl TMB substrat çözeltisi eklenip 37 °C' de 15-25 dakika inkübe edildi. İnkübasyon esnasında kontrol edilerek renk değişimi gözlemlendikten sonra enzim-substrat arasındaki tepkimeyi sonlandırmak için 50' şer µl sülfürik asit eklendi. Hemen ardından spektrofotometrik okuyucuda 450 nm' de ölçüm alındı (USCN Life Sciences, 2015).

3.8.2. Bisinkoninik Asit (BCA) Analizi ile Toplam Protein Tayini

PRL' in ortama salınan toplam proteinler içinde yüzde kaçlık dilimi oluşturduğunu tespit etmek için bisinkoninik asit (BCA) analizi ile toplam protein tayini yapıldı (iNtRON Biotechnology, SMART BCA Protein Assay Kit). Bu yöntem kolorimetrik olup BCA ile bakır iyonlarının şelatlaşması yoluyla ortaya çıkan renk değişiminin tespiti yoluyla protein miktarının ölçümü gerçekleştirilmektedir (Çizim 3.13).



Çizim 3.14. BCA analizinin temelini oluşturan reaksiyonun gösterimi. (Thermo Fisher Scientific, 2016)

İki molekül BCA ile bakır iyonları şelatlaştığında ortaya mor bir renk çıkar. Bu reaksiyon ürünü de 562 nm’ de en kuvvetli ışımayı verir. Bu dalgaboyunda absorbands değerleri alınıp konsantrasyonları bilinen standartlarla karşılaştırma yapılarak toplam protein miktarı tayin edilir.

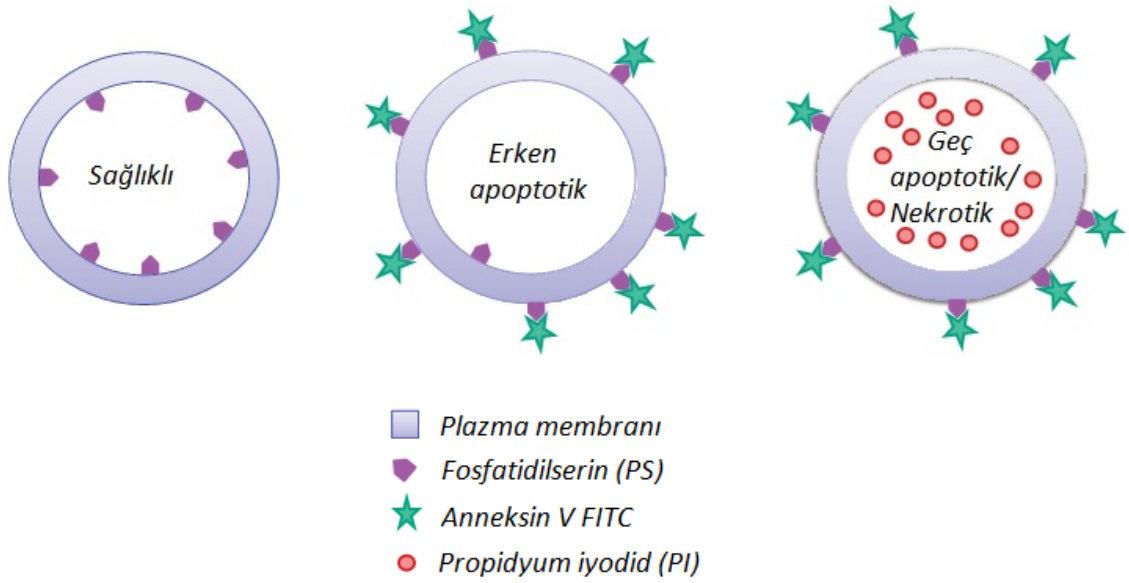
Kit prosedürüne uygun olarak (iNtRON Biotechnology, SMART BCA Protein Assay Kit), önce bovin serum albümin (BSA) kullanılarak ve seri dilüsyonlar yapılarak standart çözeltileri hazırlandı. Ardından çalışma çözeltisi, A ve B çözeltileri kullanılarak hazırlandı. Protein tayini yapılacak olan kondisyonlanmış besiyerleri kültür ortamından çekilip santrifüj tüplerine toplandı. 1000 x g’ de 20 dakika santrifüj edilip küçük partiküllerden arındırıldı. Bu örnekler 10 kat sulandırıldı. 96 kuyucuklu kültür kabına kitte belirtilen şekilde standartlar, örnekler ve çalışma çözeltisi eklendi. Tüm bileşenler 37 °C’ de 30 dakika inkübe edildi. Mikroplaka okuyucuda 562 nm dalgaboyunda absorbands değerleri ölçüldü.

3.8.3. Anneksin V Analizi

Apoptoz tayini için anneksin V analizi yapıldı. Bu test, membranın iç kısmında bulunan fosfatidilserinin (PS) membranın dışına yerleşmesi ve bu PS’ in tespitine dayanmaktadır (Çizim 3.15). Anneksin V boyası ise membran yüzeyinde bulunan PS’ e yüksek bağlanma eğiliminde olan, Ca^{2+} a bağımlı olarak fosfolipitlere bağlanan bir proteindir ve birçok florokromla konjuge edilebilmektedir. Propidyum iyodid (PI) canlı hücreler tarafından hücre içine alınmayan ancak apoptozun ilerlemiş safhalarında membran bütünlüğünün kaybolması nedeniyle hücre içine alınan bir boyadır. PS’ in hücre membranına lokalize olması erken apoptoz belirteci olup geç apoptotik olaylara yol açmaktadır. Dolayısıyla eğer incelenen hücre anneksin V ve PI açısından negatifse hücre apoptotik değildir. Erken apoptotik hücreler anneksin V pozitifliği ile PI negatifliği

gösterirlerken geç apoptotik ya da ölü hücreler her ikisi açısından pozitiflik gösterirler (BD Biosciences, 2015).

Literatürde yer alan yöntemlere göre (Fang ve diğ. 2014, Harding ve diğ. 2015) hücreler 2 kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra 1x bağlayıcı tampon çözeltisi (binding buffer) ile sayısı 1×10^6 /ml olacak şekilde tek hücre süspansiyonu haline getirildi. Bu hücre süspansiyonuna 5 μ l Annexin V ve 5 μ l PI eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildikten sonra akım sitometri cihazıyla birlikte çalışan BD FACSuite yazılımı kullanılarak analiz gerçekleştirildi.



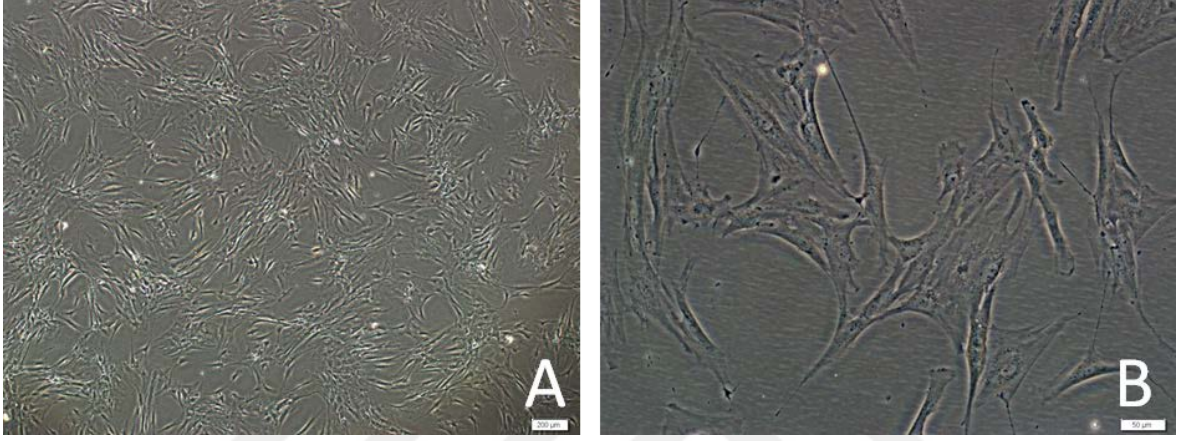
Çizim 3.15. Anneksin V boyamasının prensibi (BD Biosciences, 2015) (Türkçe'ye çevrildi).

4. BULGULAR

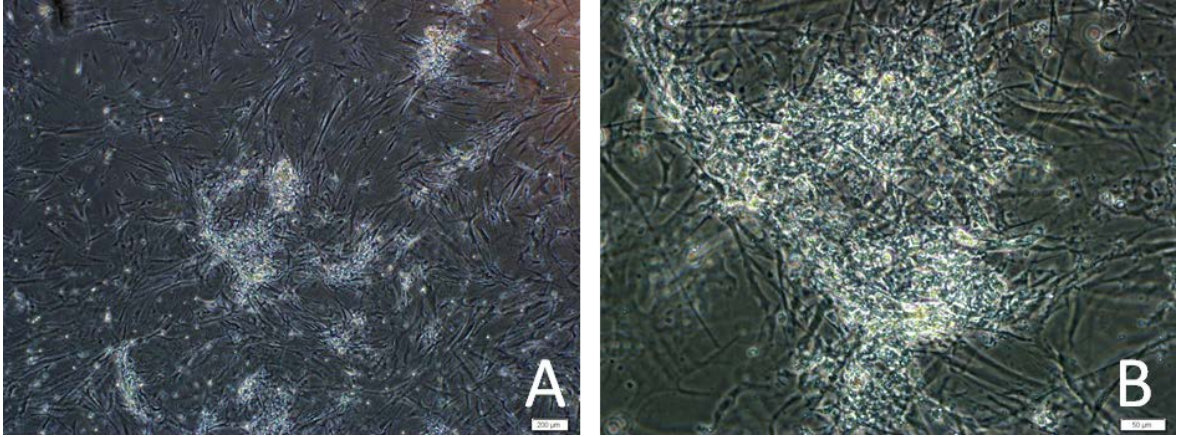
4.1.Hücreler ve Karakterizasyonlarına Ait Görüntüler

4.1.1. Mezenkimal Kök Hücreler

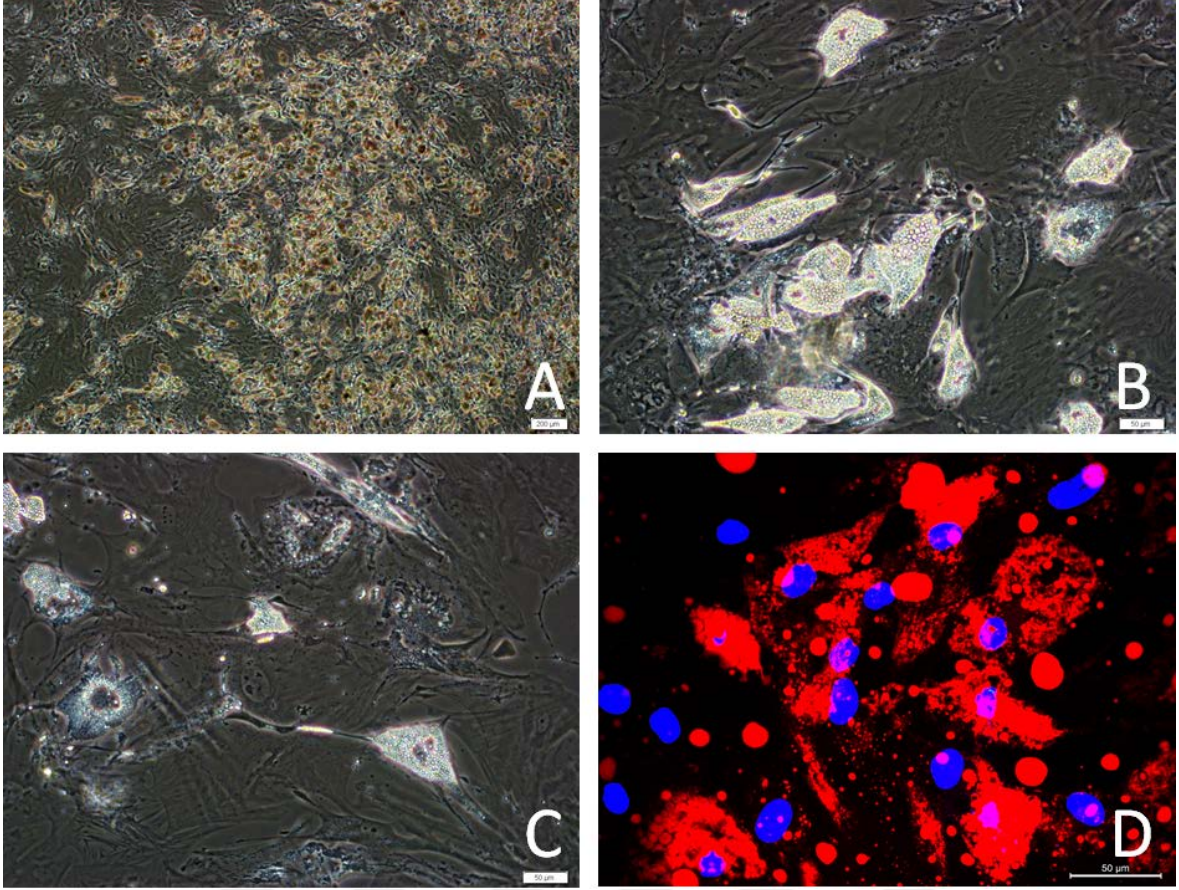
Deneysel olarak kullanılan MKH' ler kültürde morfolojilerine (Çizim 4.1), adipojenik ve osteojenik farklılaşmalarına (Çizim 4.2, Çizim 4.3), akım sitometri yöntemiyle ise yüzey belirteçleri ile sitoplazmik belirteçlere göre (Çizim 4.4) karakterize edildi.



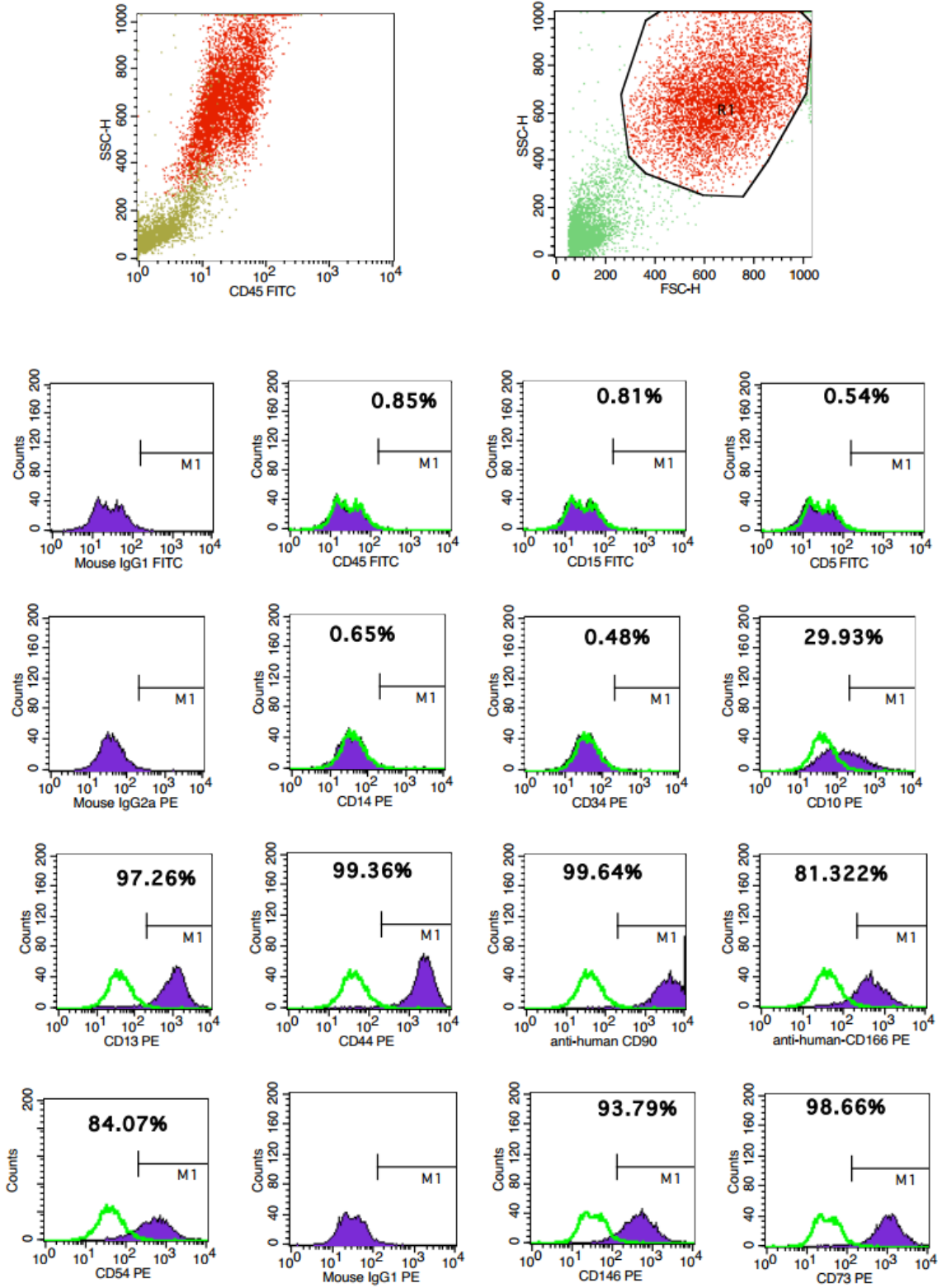
Çizim 4.1. MKH' lerin kültür ortamında alınan görüntüleri (Olympus, IX71). **A:** 10x büyütmede alınan görüntü (ölçek çubuğu 200 µm), **B:** 40x büyütmede alınan görüntü (ölçek çubuğu 50 µm). Fotoğraflarda MKH' lerin sitoplazmadaki granüllü yapısı ile iğsi şekilleri seçilmektedir.



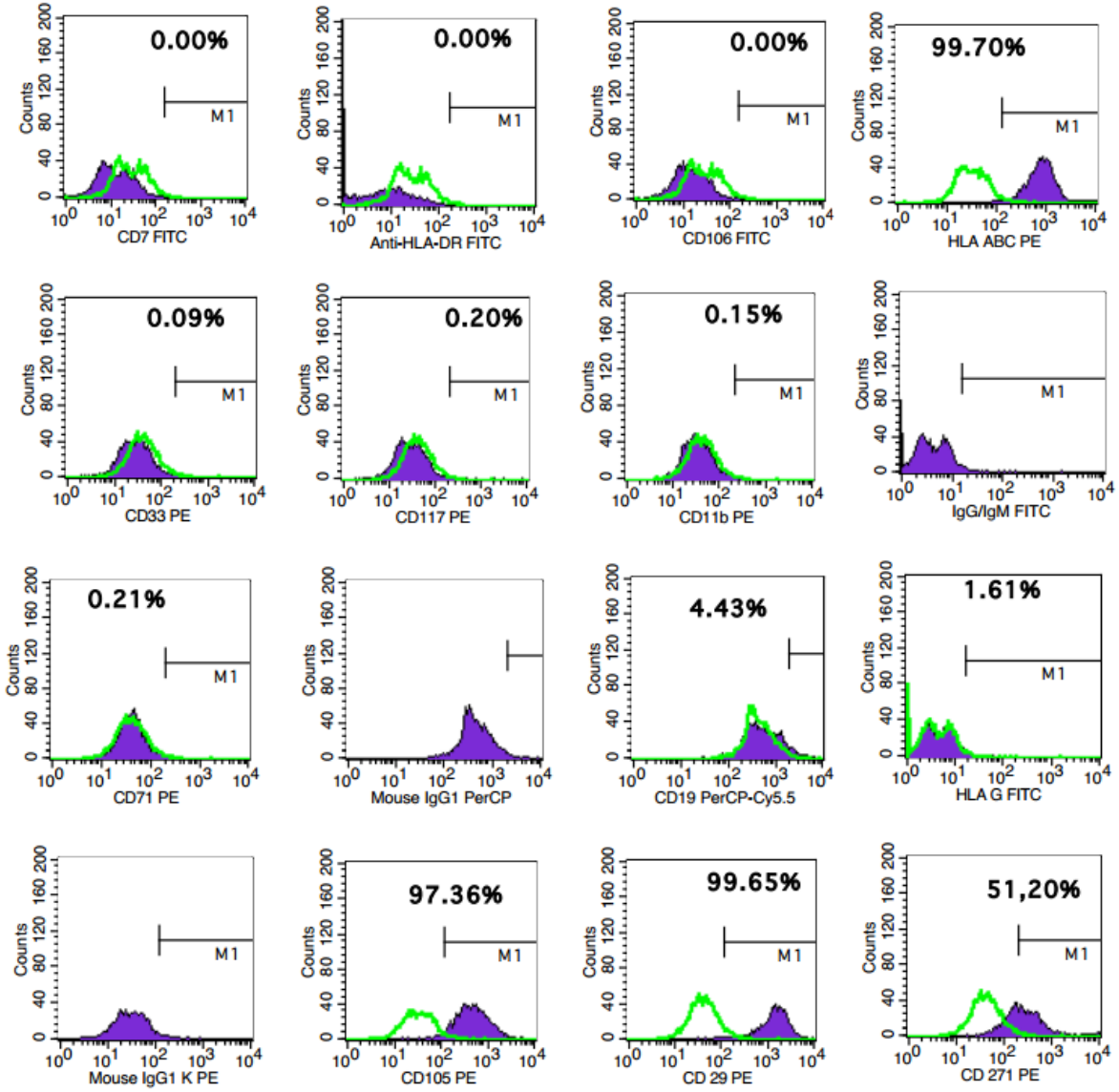
Çizim 4.2. Osteojenik farklılaşmaya sürüklenen MKH' lerin kültür ortamında alınan görüntüleri. (Olympus, IX71). **A:** 10x büyütmede alınan görüntü (ölçek çubuğu 200 µm), **B:** Aynı alanın 40x büyütmede alınan görüntüsü (ölçek çubuğu 50 µm). Fotoğraflarda kalsiyum nodüllerine ait görünüm, hücrelerin arasında yer alan parlak kısımlar halinde seçilmektedir.



Çizim 4.3. Adipojenik farklılaşmaya sürüklenen MKH' lerin kültür ortamında alınan görüntüleri (Olympus, IX71) ile Oil red O boyamasının görüntüsü (Leica, DMI4000 B). **A:** 10x büyütmede alınan görüntü (ölçek çubuğu 200 μm), **B, C:** 40x büyütmede alınan görüntüler (ölçek çubuğu 50 μm), **D:** Oil red O ile boyanmış örneğin floresan mikroskopta alınan görüntüsü (ölçek çubuğu 50 μm). A fotoğrafında hücrelerin ürettiği yağ damlacıkları sarı-koyu sarı şekilde seçilirken daha büyük büyütmelerde alınan B ve C fotoğraflarında hücre sitoplazmasında yağ damlacıkları parlak sarı-beyaz renklerde ve üzüm salkımı görünümünde seçilebilmektedir. D fotoğrafında Oil red-O boyaması ile yağ damlacıkları kırmızı, hücre çekirdekleri ise DAPI ile mavi boyanmıştır.



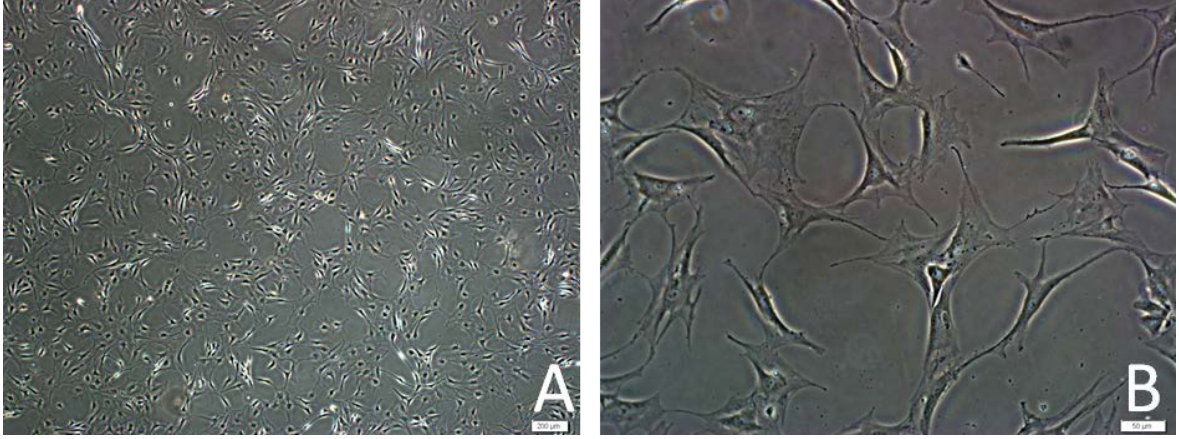
Çizim 4.4. MKH' lerin yüzey belirteçleri ile sitoplazmik belirteçlerine göre akım sitometri cihazı (BD Biosciences, FACSCalibur) ile elde edilmiş sonuçlarına ait grafik. Grafiklerde % 90' ın üzerinde popülasyonun CD105, CD73, CD29, CD13, CD44, CD90, CD146, CD166, HLA-ABC belirteçlerini taşıdığı, buna karşın % 1' in altında popülasyonunun CD7, HLA-DR, CD106, CD104, CD14, CD34, CD33, CD117, CD11b, CD45, CD15, CD5 ve CD71 belirteçlerini taşıdığı tespit edildi (grafiklerin devamı takip eden sayfadadır).



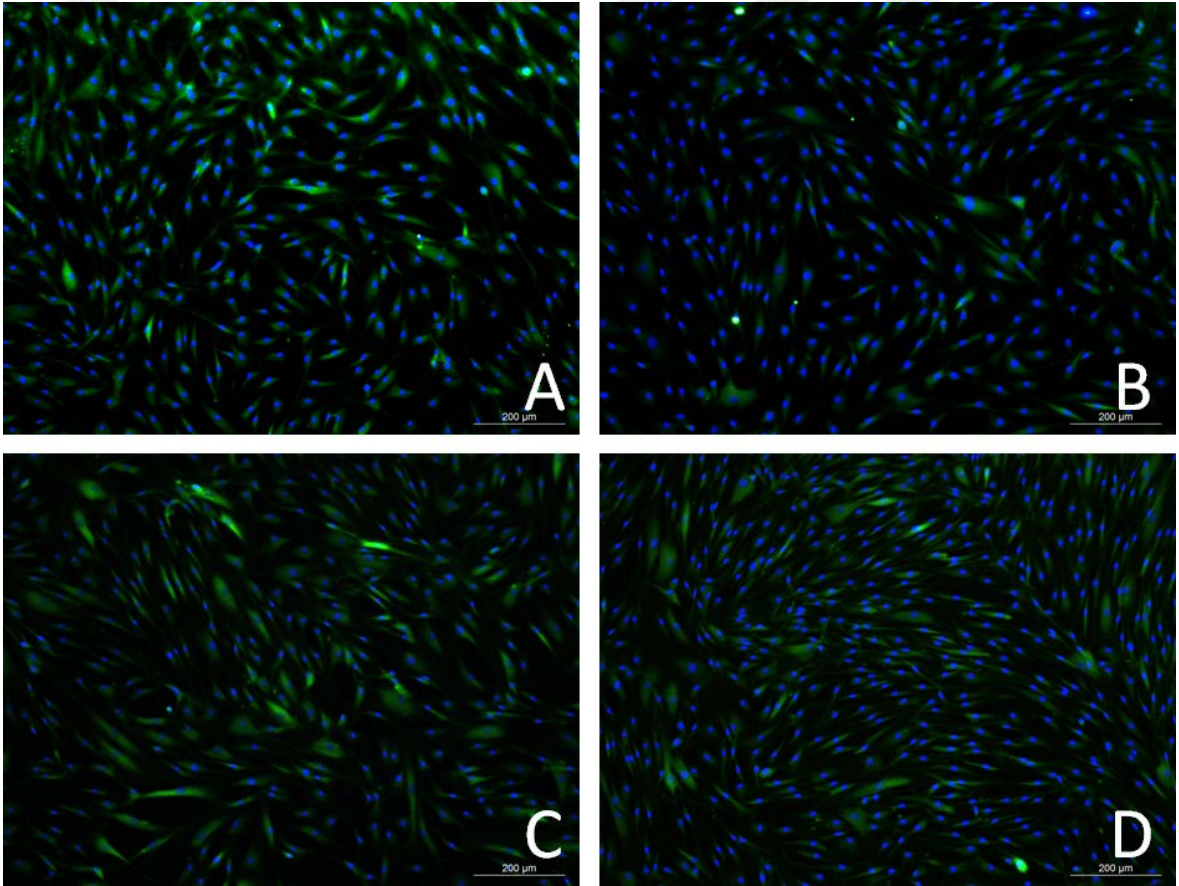
Çizim 4.4. (devamı) MKH' lerin yüzey belirteçleri ile sitoplazmik belirteçlerine göre akım sitometri cihazı (BD Biosciences, FACSCalibur) ile elde edilmiş sonuçlarına ait grafik. Grafiklerde % 90' ın üzerinde popülasyonun CD105, CD73, CD29, CD13, CD44, CD90, CD146, CD166, HLA-ABC belirteçlerini taşıdığı, buna karşın % 1' in altında popülasyonunun CD7, HLA-DR, CD106, CD14, CD34, CD33, CD117, CD11b, CD45, CD15, CD5 ve CD71 belirteçlerini taşıdığı tespit edildi.

4.1.2. Kondrositler

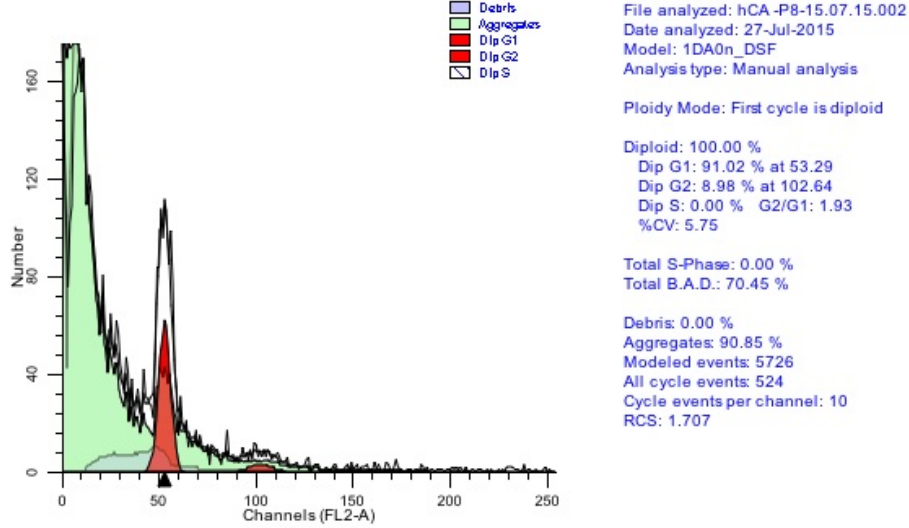
Deneyleerde kullanılan hCA' lar bir üretici firma tarafından temin edilmiş olmalarına rağmen uzun süre kültür ortamında tutulup çoğaltıldıkları için karakterlerini kaybetmediklerini kanıtlamak üzere kültürde morfolojik olarak gözlemlendi (Çizim 4.5). Karakterleri açısından pozitif belirteçler olan agrekan, tip 2 kollajen ve Sox-9 açısından immunfloresan boyamaya tabi tutuldu (Çizim 4.6). Hücre döngüsü analizi ile döngünün hangi evresinde oldukları tespit edildi (Çizim 4.7). Anneksin V analizi ile de apoptotik olup olmadıkları incelendi (Çizim 4.8).



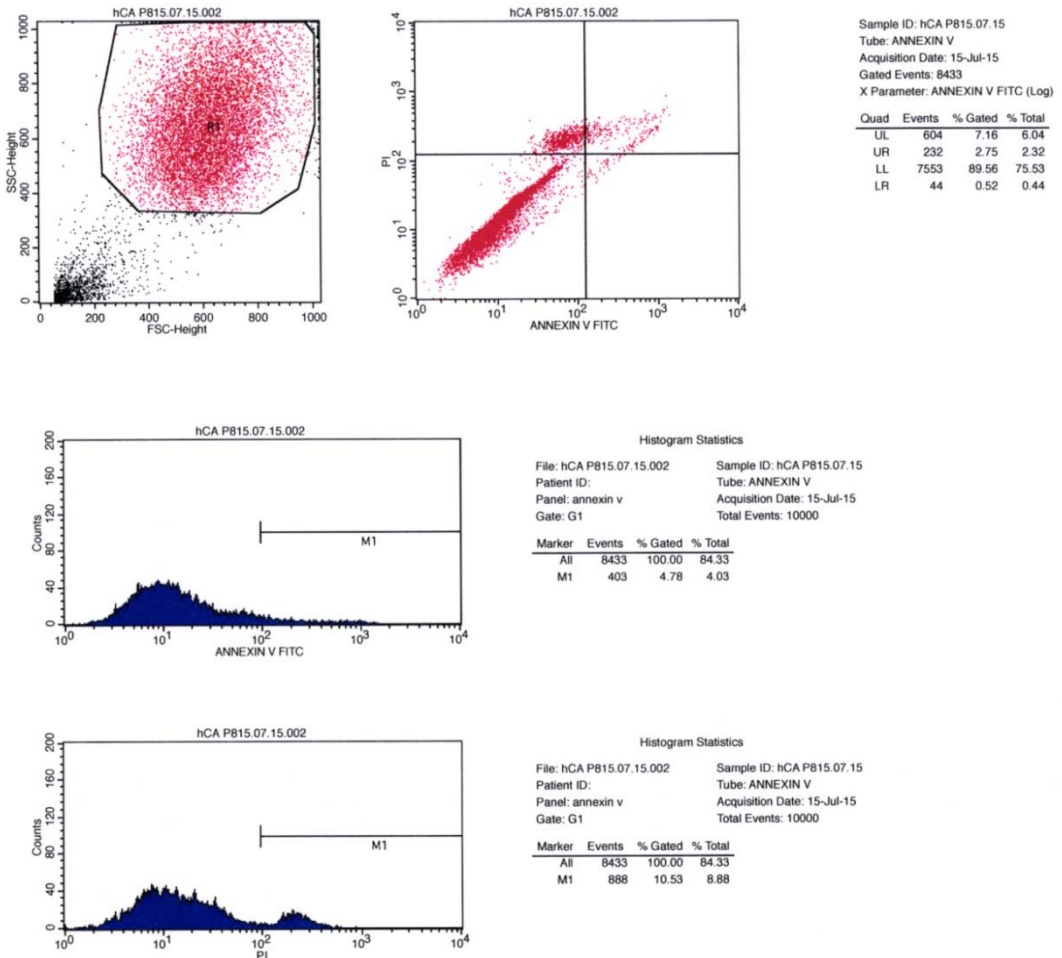
Çizim 4.5. hCA' ların kültür ortamında alınan görüntüleri (Olympus, IX71). **A:** 10x büyütmede alınan görüntü (ölçek çubuğu 200 µm), **B:** 40x büyütmede alınan görüntü (ölçek çubuğu 50 µm). Düzenli olarak gerçekleştirilen morfolojik incelemelerde hücrelerin proliferere oldukları ve hücre yapılarını yaşlanmadan korudukları gözlemlenmiştir.



Çizim 4.6. İmmunfloresan olarak boyanan hCA' lara ait görüntüler (Leica, DMI4000 B). **A:** Agrekan, **B:** Tip 1 kollajen (COL1A1), **C:** Tip 2 kollajen (COL2A1), **D:** Sox-9 boyamasına aittir. Bu belirteçlerin her biri floresan izotiyosiyanat (FITC) konjuge boyalarla boyanmış olup yeşil renk ile gözlenmişlerdir. Hücre çekirdekleri 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile mavi boyanmıştır. Boyamalarla hücrelerdeki sitoplazmik agrekan, tip 1 kollajen, tip 2 kollajen ve Sox-9 varlığı gösterilmiştir.



Çizim 4.7.Sıvı azotta bulunan hCA' ların çözdürülmesi sonrası gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi verileri. Grafiğe göre agregatlar gözlenmiş ancak ölçüm alınan sağlıklı hücrelerin % 91.02 oranında diploid G1 fazda oldukları tespit edilmiştir.

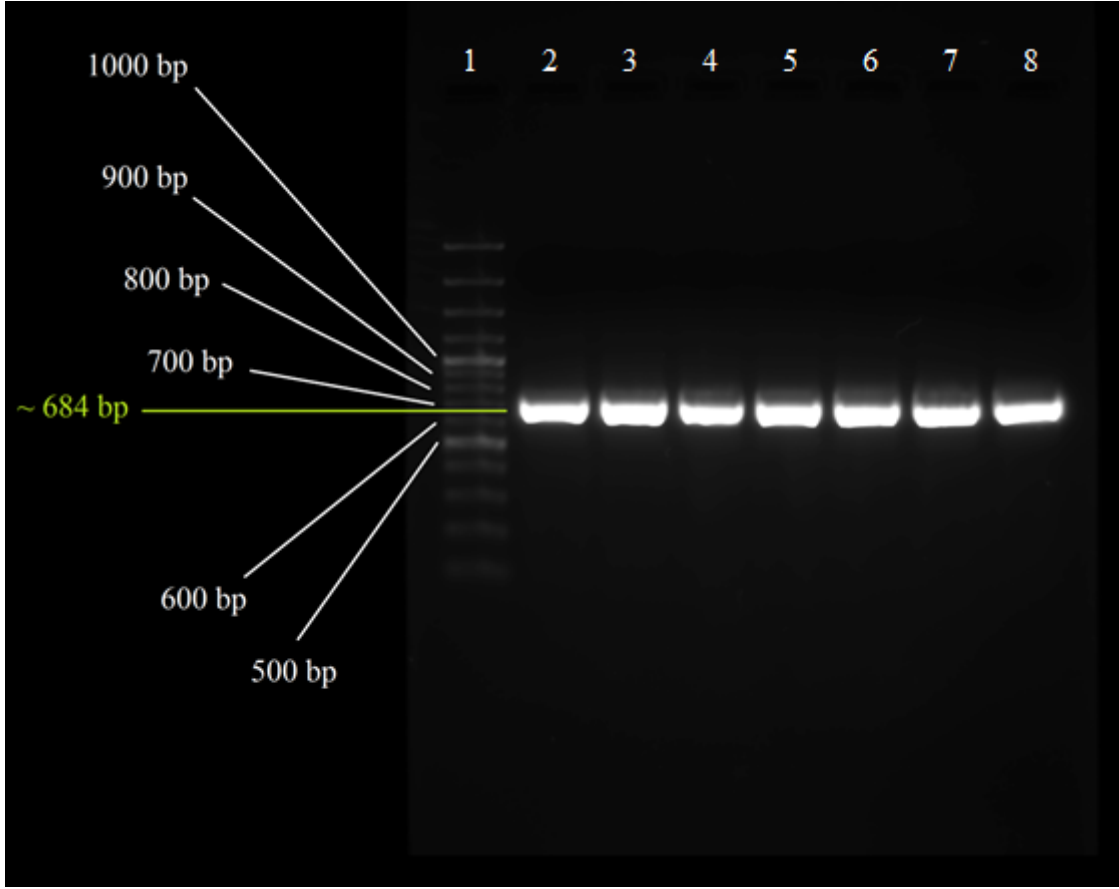


Çizim 4.8.Sıvı azotta bulunan hCA' ların çözdürülmesi sonrası gerçekleştirilen anneksin V analizi verileri. Grafiğe göre hücrelerin % 89,56' sını canlı, % 7,16' sını ölü ve % 2,75' i apoptotiktir.

4.2.PRL' in Klonlanması

4.2.1. Q5 DNA Polimerazla PRL' in Çoğaltılmasına Ait PCR Ürünlerinin Jel Görüntüsü

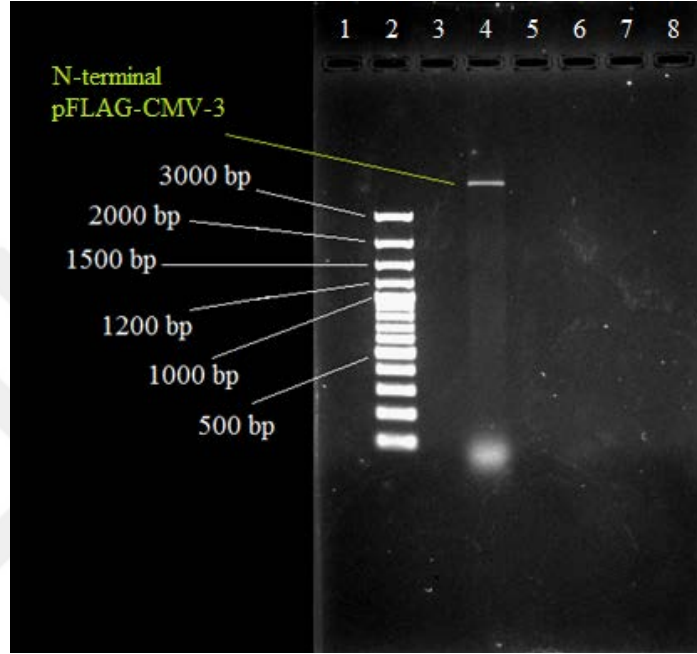
PCR ürünleri jele yüklenip MF-ChemiBIS 3.2 soğutmalı görüntüleme sistemi (DNR Bio-Imaging Systems) ve bu sistemle entegre çalışan GelCapture yazılımı (DNR Bio-Imaging Systems) kullanılarak görüntüleme yapıldı. Görüntüleme, PRL' in uzunluğuna (684 bp) (Çizim 3.2) denk gelen bantın varlığı tespit edildi (Çizim 4.9).



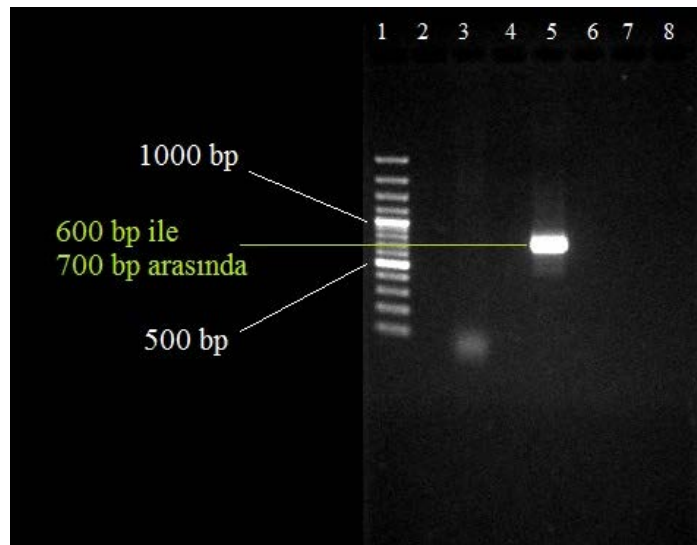
Çizim 4.9. PCR ürünlerinin yüklendiği jele ait görüntü. İlk kuyucuğa marker yüklenmiş olup diğer kuyucukların tamamına PCR ürünleri yüklenmiştir. Markerda her bantın karşılık geldiği DNA uzunluğu belli olup diğer kuyucuklardaki ürünün boyutu karşılaştırmayla bulunabilmektedir. Bu karşılaştırma ile kuyucuklara yüklenen PCR ürününe ait bantın 600 ilâ 700 baz çifti arasında olduğu ve beklenen sonuçla örtüştüğü görülmektedir.

4.2.2. Restriksiyon Enzim Kesimiyle İnsert ve Vektörün Hazırlanması

Yapışkan uç oluşturmak üzere vektör ve insertin kesim reaksiyonlarından elde edilen ürünler jele yüklendi (Çizim 4.10, Çizim 4.11). MF-ChemiBIS 3.2 soğutmalı görüntüleme sistemi (DNR Bio-Imaging Systems) ve bu sistemle entegre çalışan GelCapture yazılımı (DNR Bio-Imaging Systems) kullanılarak görüntüleme yapıldı. Beklenen uzunluklarda insert ve vektöre ait bantlar tespit edildi.



Çizim 4.10. N-terminal pFLAG-CMV-3 vektörünün kesim ürününe ait jel görüntüsü. Marker 2 numaralı kuyucuğa yüklenmiş olup 4 numaralı kuyucuğa yüklenen kesim ürününde 3000 bp' den büyük ve 500 bp' den küçük olarak gözlenen bantlar, kesimin başarılı olduğunu göstermektedir.



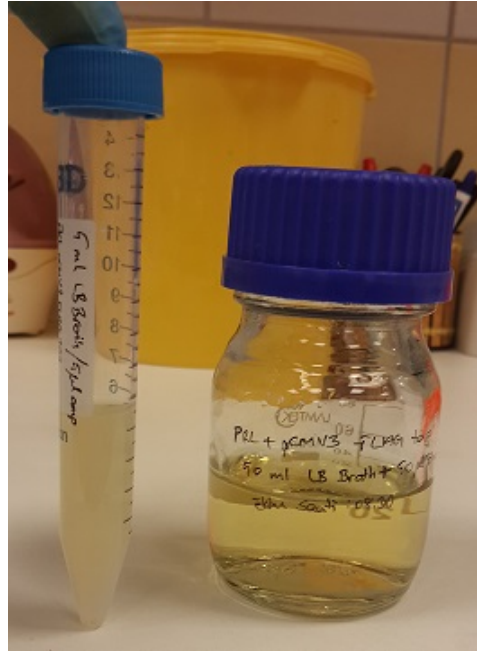
Çizim 4.11. PRL' in kesim ürününe ait jel görüntüsü. Marker 1 numaralı kuyucuğa yüklenmiş olup 5 numaralı kuyucuğa yüklenen kesim ürününde 600-700 bp arasında gözlenen bantlar, kesimin başarılı olduğunu göstermektedir.

4.2.3. Ligasyon Ürünüyle Transforme Edilen Hücrelerin Katı Agar ve LB Broth Besiyerlerindeki Koloni Görüntüleri

Transforme edilen hücreler kültüre alındıktan sonra katı ve sıvı besiyerlerindeki koloni oluşumu takip edildi (Çizim 4.12, Çizim 4.13).



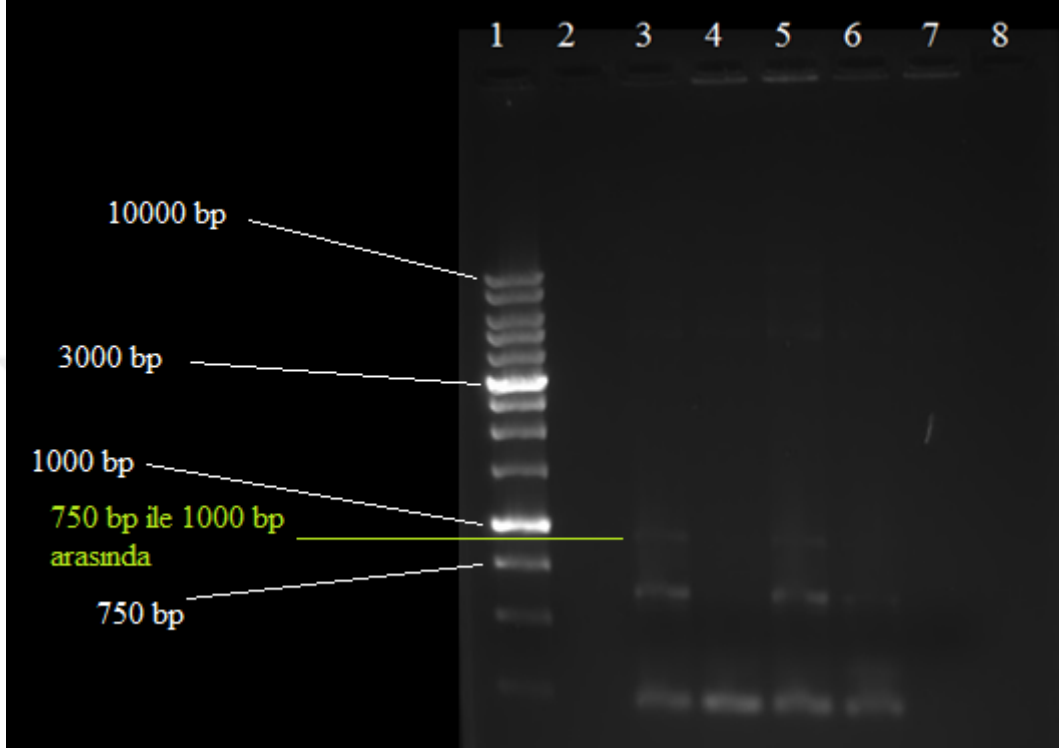
Çizim 4.12. Transforme edilen hücrelerin ampisilinli katı agardaki koloni görüntüsü. Katı agarda tek düşen ve düzgün şekilli koloniler seçilerek LB Broth besiyerinde çoğaltılmıştır.



Çizim 4.13. Transforme edilen hücrelerin ampisilinli LB Broth sıvı besiyerinde çoğalmalarına ait görüntüsü. Fotoğrafta sağdaki şişede henüz koloni ekimi gerçekleştirilmemiş LB Broth besiyeri şeffaf olarak görünmektedir. Soldaki 15 ml' lik santrifüj tüpünde ekim yapılmış ve koloni üretilmiştir. Burada LB Broth besiyerindeki bulanıklaşmayla orantılı olarak koloni oluşumu takip edilmiştir.

4.2.4. Dolu Plazmidlerin PCR ile Tespitine Ait Jel Görüntüsü

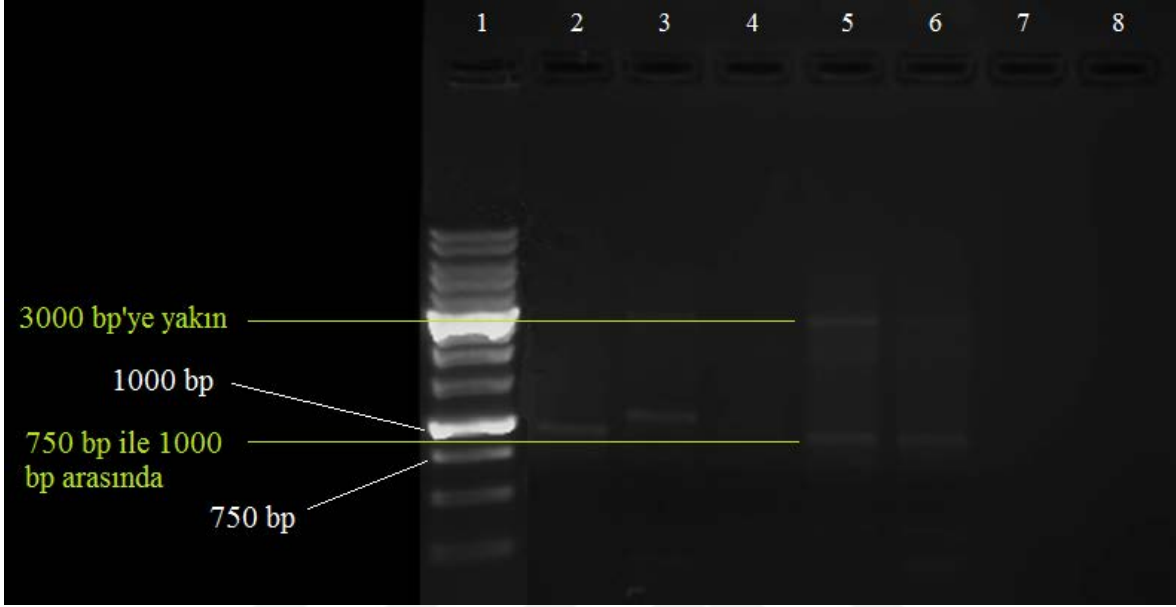
Transforme edilen *E. coli*'lerden izole edilen plazmidler PRL açısından incelenmek üzere marker ile (Promega, 1 kb DNA ladder) jele yüklendi. Jel görüntülenerek transformasyonun başarılı olduğu gruplar tespit edildi (Çizim 4.14).



Çizim 4.14. Dolu plazmidlerin tespiti için gerçekleştirilen koloni PCR jel görüntüsü. Marker 1. kuyucuğa yüklenmiş olup 3, 4, 5, 6 ve 7 numaralı kuyucuklarda 5 adet koloni incelenmiştir. 7 numaralı kuyucuğa yüklenen koloni hiçbir şekilde amplifiye olmazken 3 ve 5 numaralı kuyucuklara yüklenen kolonilerde 750 bp ile 1000 bp arası bant görülmüştür. Bu bant N-30 ve C-24 primerleri kullanıldığında alınması gereken 872 bp' lik bant ile uyuşmaktadır. Bu haliyle incelendiğinde 3 ve 5 numaralı kuyucuklara yüklenen kolonilerin PRL açısından pozitif oldukları görülmektedir. Ancak 5 numaralı kuyucuğa yüklenen koloniden alınan bantların daha net olması nedeniyle bu koloni üzerinde durulmuştur.

4.2.5. Yön Tayini Jel Görüntüsü

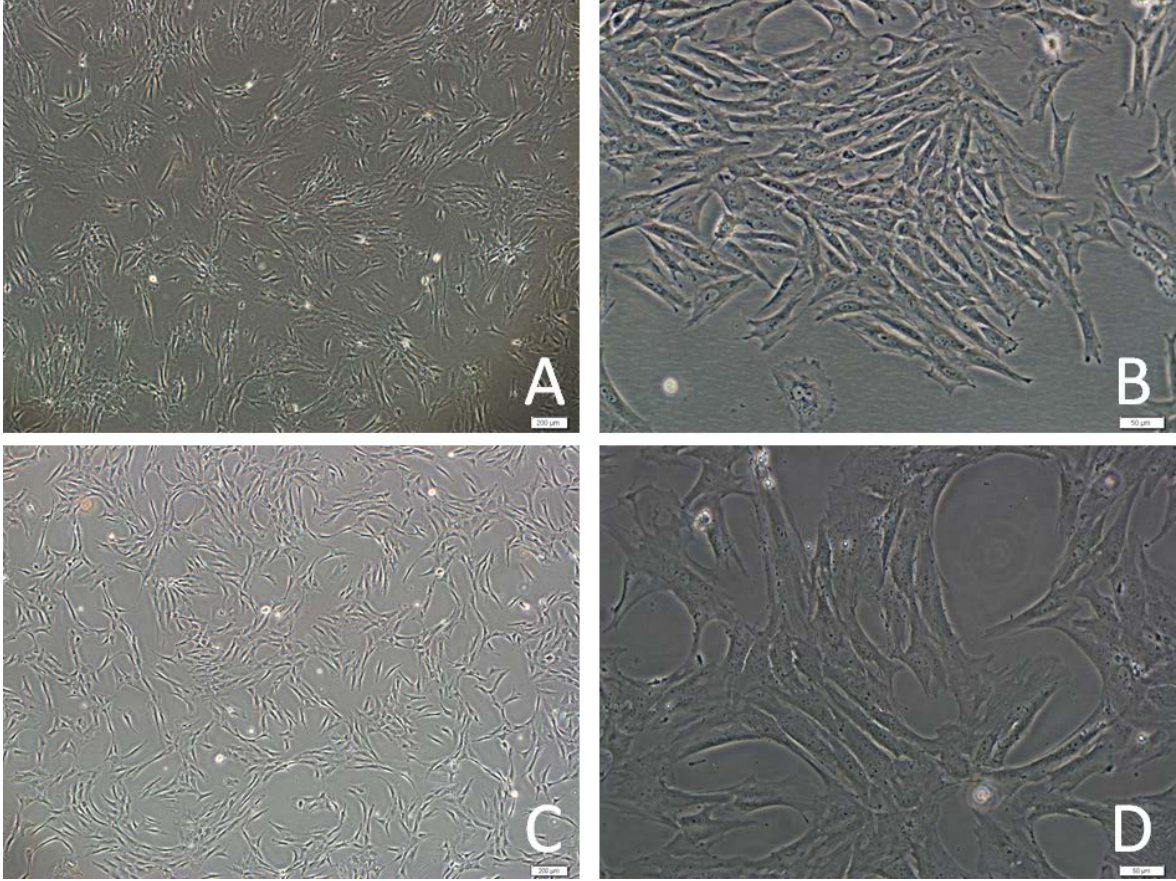
Dolu olduğu tespit edilen plazmidlerde vektör yapısıyla sokulan genin yön tayini için kurulan PCR ürünleri jele yüklenerek düz yönde plazmidin girdiği koloniler tespit edildi (Çizim 4.15).



Çizim 4.15. Yön tayini için kurulan PCR' a ait jel görüntüsü. Marker 1. kuyucuğa yüklenmiş olup 2, 3, 4, 5 ve 6 numaralı kuyucuklarda 5 adet koloni incelenmiştir. Bant görüntülerine bakıldığında 2, 5 ve 6 numaralı kuyucuklara yüklenen kolonilere ait plazmidlere genin düz yönde girdiği tespit edilmiştir.

4.3.Gen AktarımıSonrası Hücre Görüntüleri

Gen aktarımından sonra hücreler kültürde morfolojileri açısından takip edildi (Çizim 4.16). Hücrelerin koloni oluşturmaya devam edebildikleri ve seçici besiyeri ortamında canlılıklarını korudukları gözlemlendi.



Çizim 4.16. Gen aktarılmamış (MKH) ve gen aktarılmış MKH (PKI-MKH) gruplara ait kültür görüntüleri (Olympus, IX71). **A:** MKH grubundan 10x büyütmede alınan görüntü (ölçek çubuğu 200 μ m), **B:** MKH grubundan 40x büyütmede alınan görüntü (ölçek çubuğu 50 μ m). **C:** PKI-MKH grubundan 10x büyütmede alınan görüntü (ölçek çubuğu 200 μ m), **D:** PKI-MKH grubundan 40x büyütmede alınan görüntü (ölçek çubuğu 50 μ m). Alınan görüntülerde hücrelerin gen aktarımından sonra da granüllü yapılarını, morfolojilerini ve koloni oluşturma potansiyellerini korudukları gözlemlenmiştir.

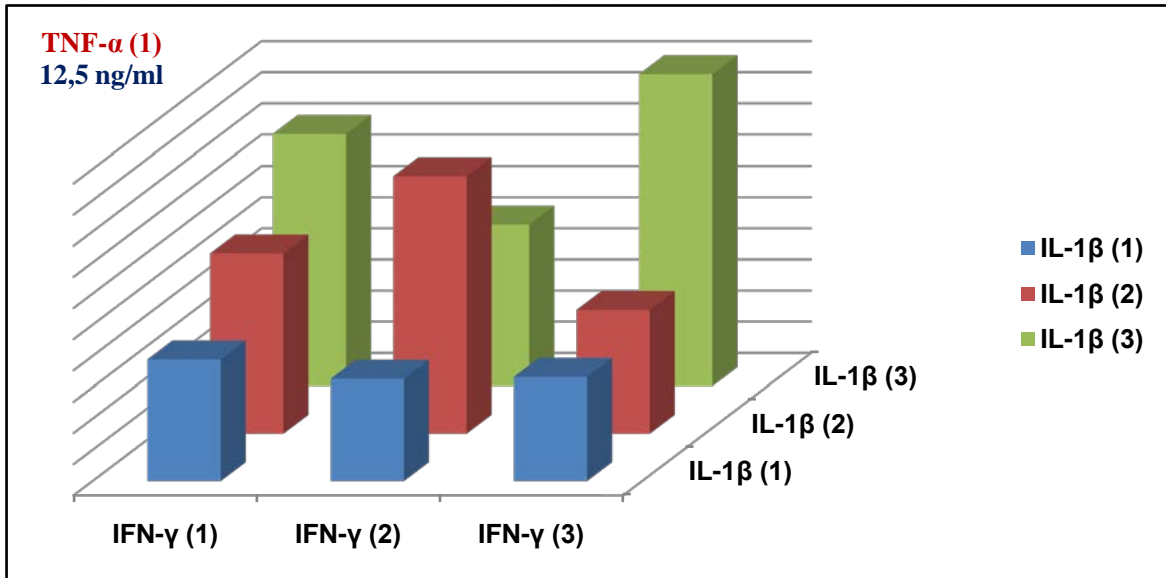
4.4.Apoptoz Optimizasyonu WST-1 Sonuçları ve Grafikleri

Absorbans değerleri kontrol ile oranlanarak canlılık yüzde cinsinden elde edildi, çizelgeler (Çizelge 4.1, 4.2, 4.3) ve grafikler (Çizim 4.17, 4.18, 4.19) oluşturuldu.

Çizelge 4.1.TNF- α 'nın birinci konsantrasyon değerinde (12,5 ng/ml) IL-1 β ve IFN- γ 'nın değişiminin canlılığa olan etkisi. Çizelgedeki değerler yüzde cinsinden canlılığı ifade etmektedir.

TNF- α (1) **IFN- γ (1)** **IFN- γ (2)** **IFN- γ (3)**

	IFN- γ (1)	IFN- γ (2)	IFN- γ (3)
IL-1β (1)	69,46	66,37	66,66
IL-1β (2)	78,88	91,27	69,80
IL-1β (3)	90,40	75,91	110,64

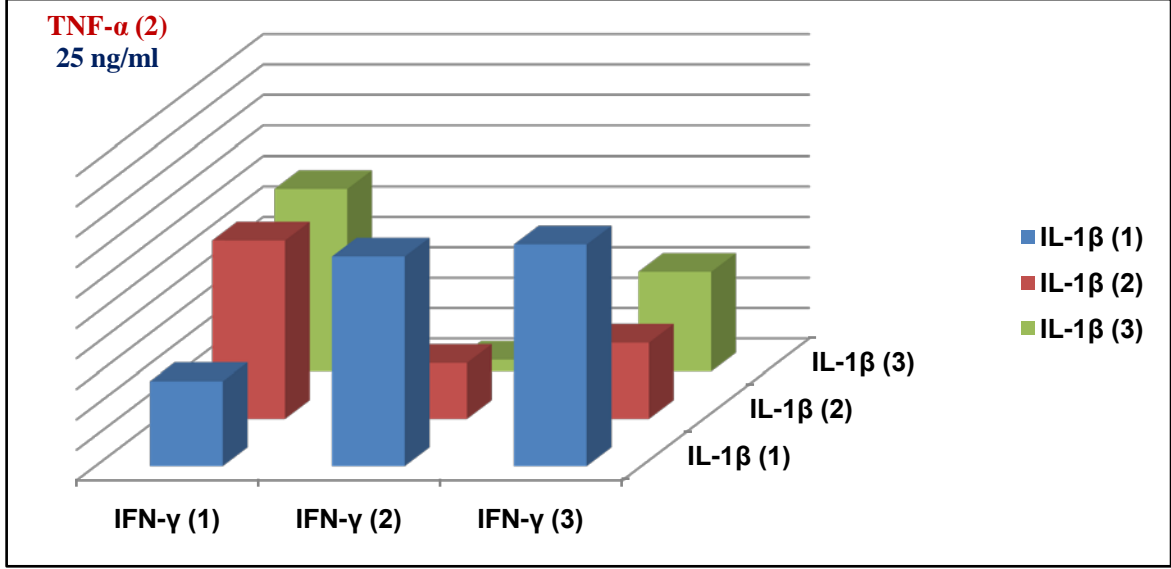


Çizim 4.17. TNF- α 'nın birinci konsantrasyon değerinde (12,5 ng/ml) IL-1 β ve IFN- γ 'nın değişiminin canlılığa olan etkisine ait grafik. Grafikteki değerler yüzde cinsinden canlılığı ifade etmektedir.

Çizelge 4.2.TNF- α 'nın ikinci konsantrasyon değerinde (25 ng/ml) IL-1 β ve IFN- γ 'nın değişiminin canlılığa olan etkisi. Çizelgedeki değerler yüzde cinsinden canlılığı ifade etmektedir.

TNF- α (2) **IFN- γ (1)** **IFN- γ (2)** **IFN- γ (3)**

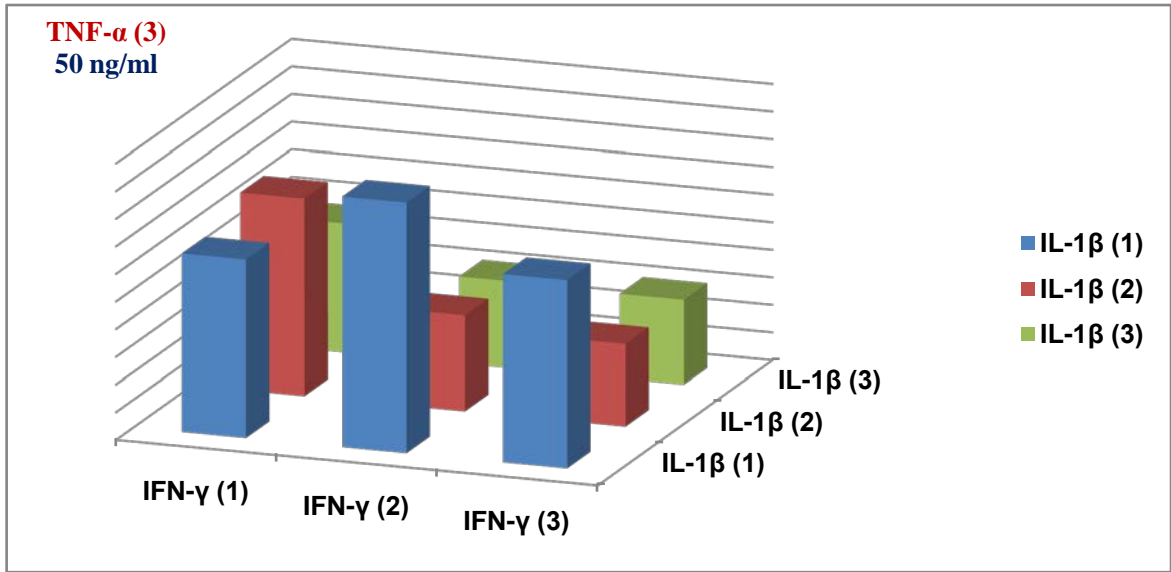
	IFN- γ (1)	IFN- γ (2)	IFN- γ (3)
IL-1β (1)	63,93	84,40	86,38
IL-1β (2)	79,29	59,16	62,47
IL-1β (3)	80,01	51,91	66,37



Çizim 4.18. TNF- α 'nın ikinci konsantrasyon değerinde (25 ng/ml) IL-1 β ve IFN- γ 'nın değişiminin canlılığa olan etkisine ait grafik. Grafikteki değerler yüzde cinsinden canlılığı ifade etmektedir.

Çizelge 4.3. TNF- α 'nın üçüncü konsantrasyon değerinde (50 ng/ml) IL-1 β ve IFN- γ 'nın değişiminin canlılığa olan etkisi. Çizelgedeki değerler yüzde cinsinden canlılığı ifade etmektedir.

TNF- α (3)	IFN- γ (1)	IFN- γ (2)	IFN- γ (3)
IL-1 β (1)	82,28	95,34	84,03
IL-1 β (2)	85,77	67,36	64,92
IL-1 β (3)	73,41	65,76	65,36



Çizim 4.19. TNF- α 'nın üçüncü konsantrasyon değerinde (50 ng/ml) IL-1 β ve IFN- γ 'nın değişiminin canlılığa olan etkisine ait grafik. Grafikteki değerler yüzde cinsinden canlılığı ifade etmektedir.

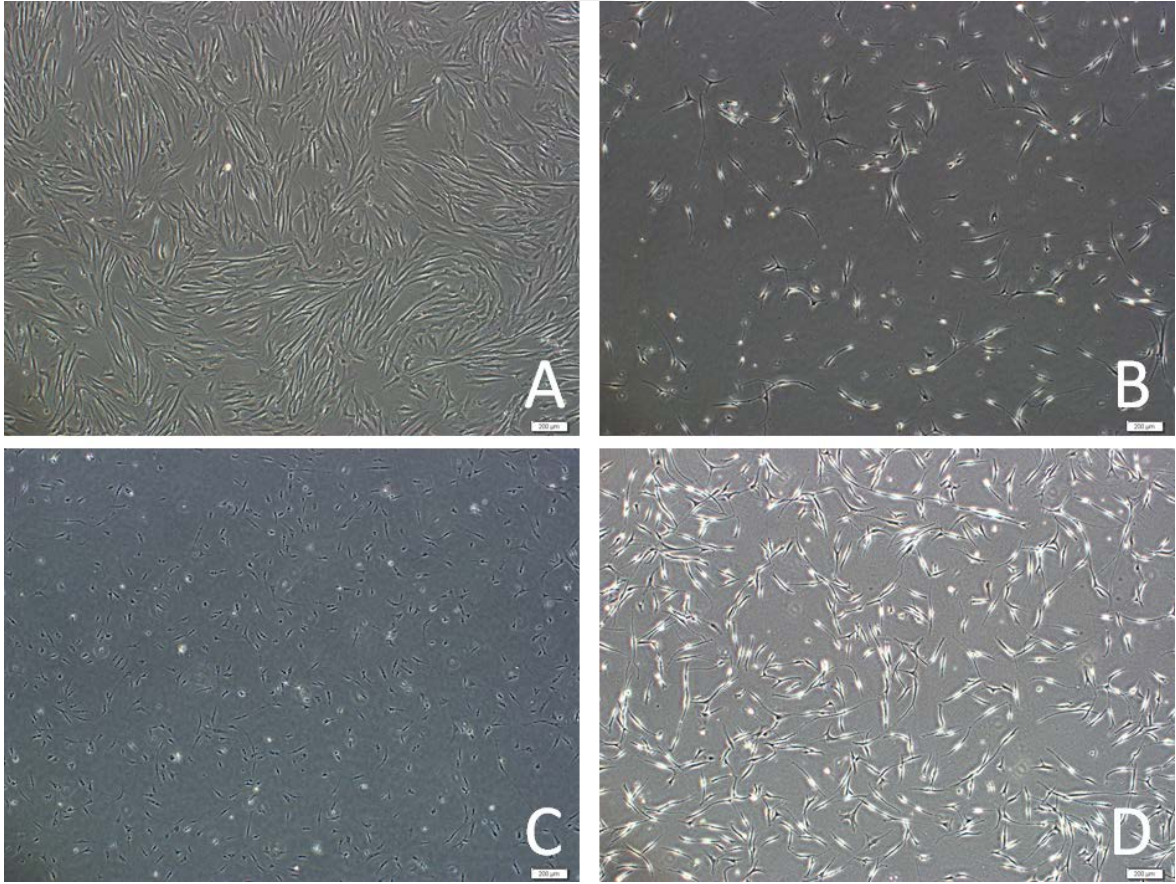
Tüm bu değerler ve grafikler incelendiğinde canlılıkta en çok azalma yapan grubun “232” koduyla belirtilen, TNF- α için 25 ng/ml, IL-1 β için 20 ng/ml ve IFN- γ için 10 ng/ml konsantrasyonda olduğu bileşime ait olduğu görülmektedir. Bu grup bileşim uygulandığında hücrelerin canlılığının % 51,91’ e düştüğü gözlemlendi. Bu nedenle hCA’ ların apoptoza sürüklenmesinde bu konsantrasyonun kullanılmasına karar verildi.

4.5.Ortak Kültür Sonrası

4.5.1. Morfolojik Gözlemler

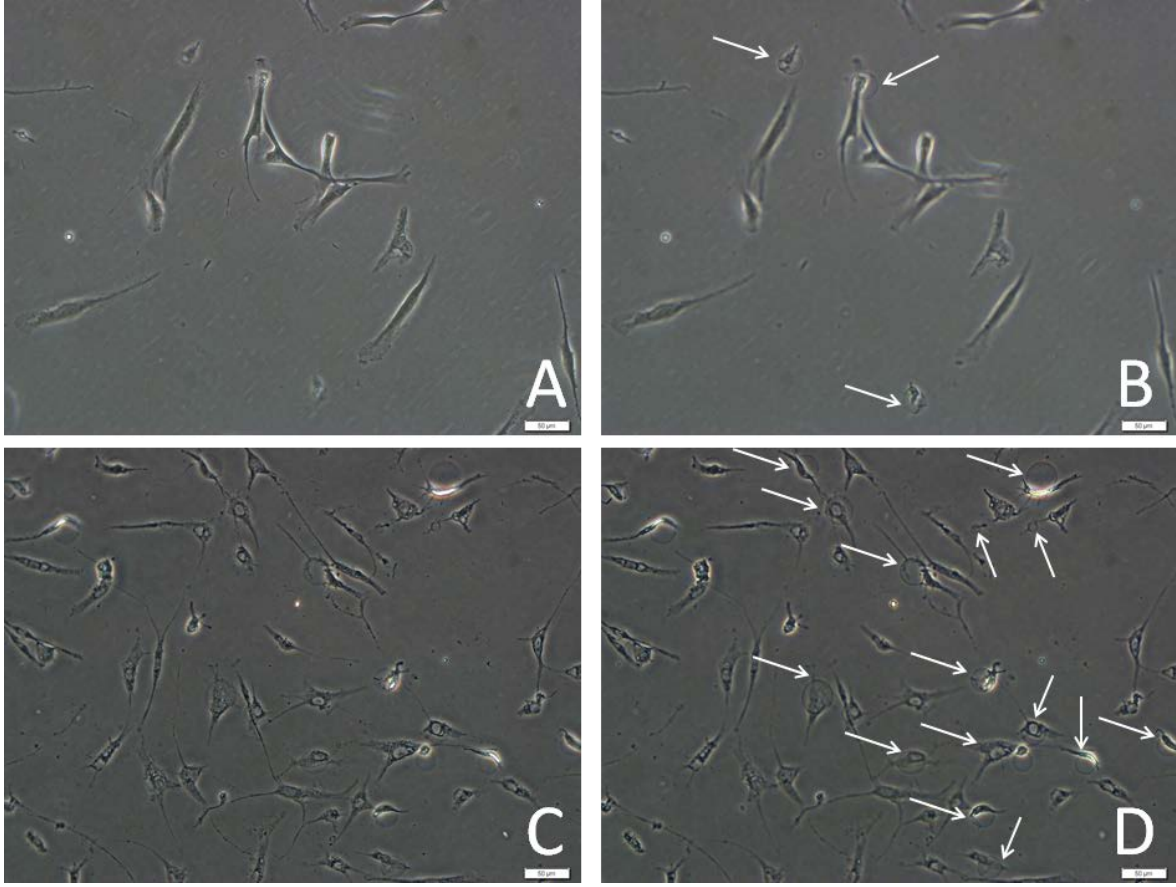
Ortak kültür için oluşturulmuş tüm gruplar, hCA’ ların morfolojileri ve apoptotik cisimciklerin varlığı açısından mikroskopta incelendi (Olympus, IX71).

Apoptoz sinyalinin verilmesini takip eden ilk günün sonunda hCA’ larda belirgin morfolojik değişimler gözlemlendi. Fotoğraflar incelendiğinde kontrol grubunda büyük bir değişim olmadığı görüldü. Bunun yanında MKH grubu hCA’ larda sayıca azalmadan çok sitoplazmanın küçülmesine rastlandı (Çizim 4.20).



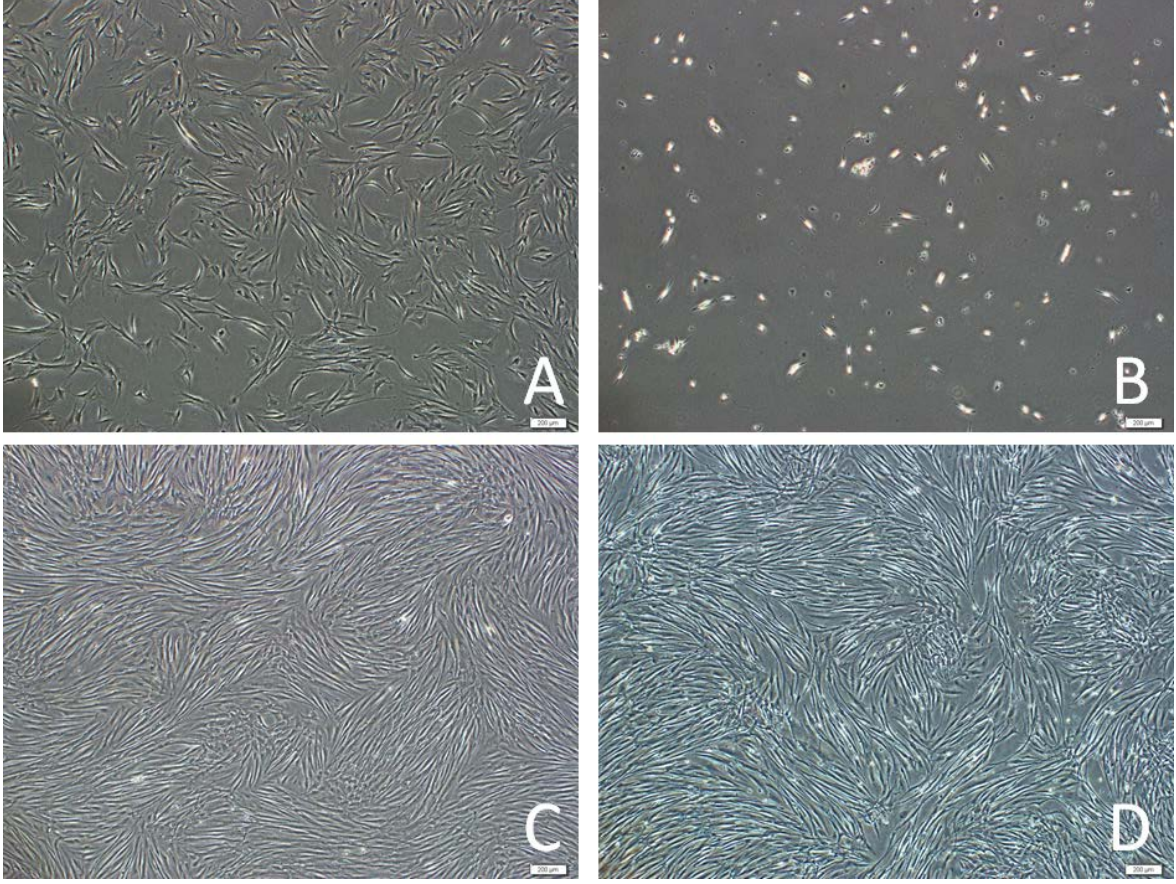
Çizim 4.20. Ortak kültür sonrası 1. günde hCA’ lara ait kültür fotoğrafları (Olympus, IX71). **A:** Kontrol grubu, **B:** Kondisyonlanmış besiyeri grubu, **C:** MKH grubu, **D:** PKI-MKH grubu. Tüm fotoğraflarda ölçek çubukları 200 μ m.

Gruplar 40x büyütme ile mikroskopta incelendiğinde ilk günün sonunda kontrol ve PKİ-MKH gruplarında apoptotik cisimciklere rastlanmadı. MKH grubunda çekirdeğin içinde boşluklu bir görüntü seçildi (Çizim 4.21).



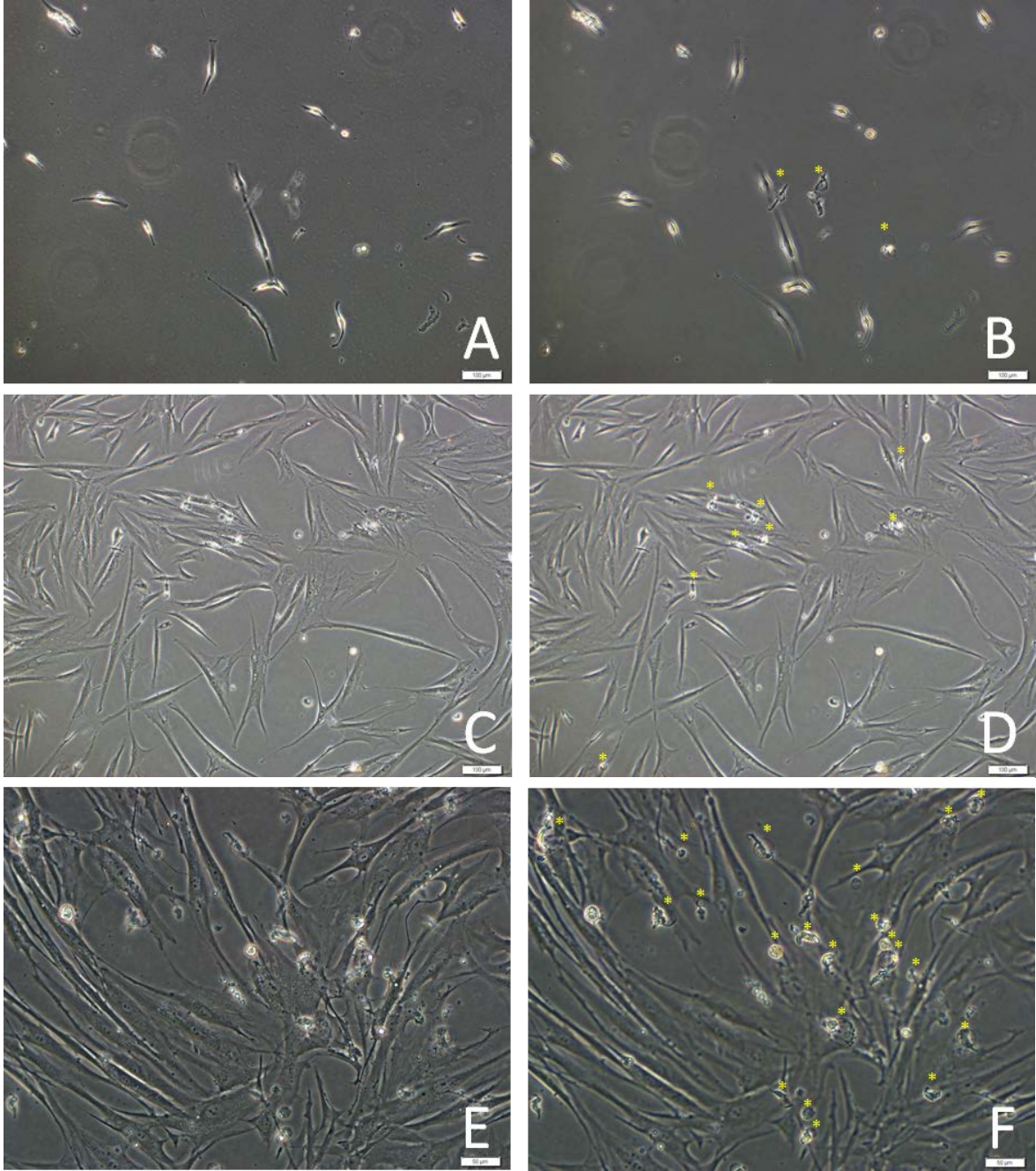
Çizim 4.21. Ortak kültür sonrası 1. günde hCA' lara ait apoptotik cisimcik fotoğrafları (Olympus, IX71). **A:** Kondisyonlanmış besiyeri grubu (hücelere netlenmiş fotoğraf), **B:** Kondisyonlanmış besiyeri grubu (cisimciklere netlenmiş fotoğraf), **C:** MKH grubu (hücelere netlenmiş fotoğraf), **D:** MKH grubu (cisimciklere netlenmiş fotoğraf). Tüm fotoğraflarda ölçek çubukları 50 µm. Cisimcikler beyaz okların ucunda yuvarlak halde seçilmektedir. Apoptotik cisimcikler yalnız bu gruplarda gözleendiği için diğer gruplara ait fotoğraflar konmamıştır.

Kültürün 7. gününde kontrol, MKH ve PKİ-MKH gruplarında hücre sayısının arttığı görüldü. MKH ve PKİ-MKH gruplarında hücrelerin kültür kabının neredeyse tamamını kapladıkları, buna karşın kontrol grubundaki artışın bu seviyeye gelmediği gözlemlendi (Çizim 4.22).



Çizim 4.22. Ortak kültür sonrası 7. günde hCA' lara ait kültür fotoğrafları (Olympus, IX71). **A:** Kontrol grubu, **B:** Kondisyonlanmış besiyeri grubu, **C:** MKH grubu, **D:** PKİ-MKH grubu. Tüm fotoğraflarda ölçek çubukları 200 µm.

Kontrol grubunda apoptotik cisimcikler seçilmedi. MKH ve PKİ-MKH grupları kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında PKİ-MKH grubunun besiyerinde daha fazla apoptotik cisimcik olduğu görüldü (Çizim 4.23).



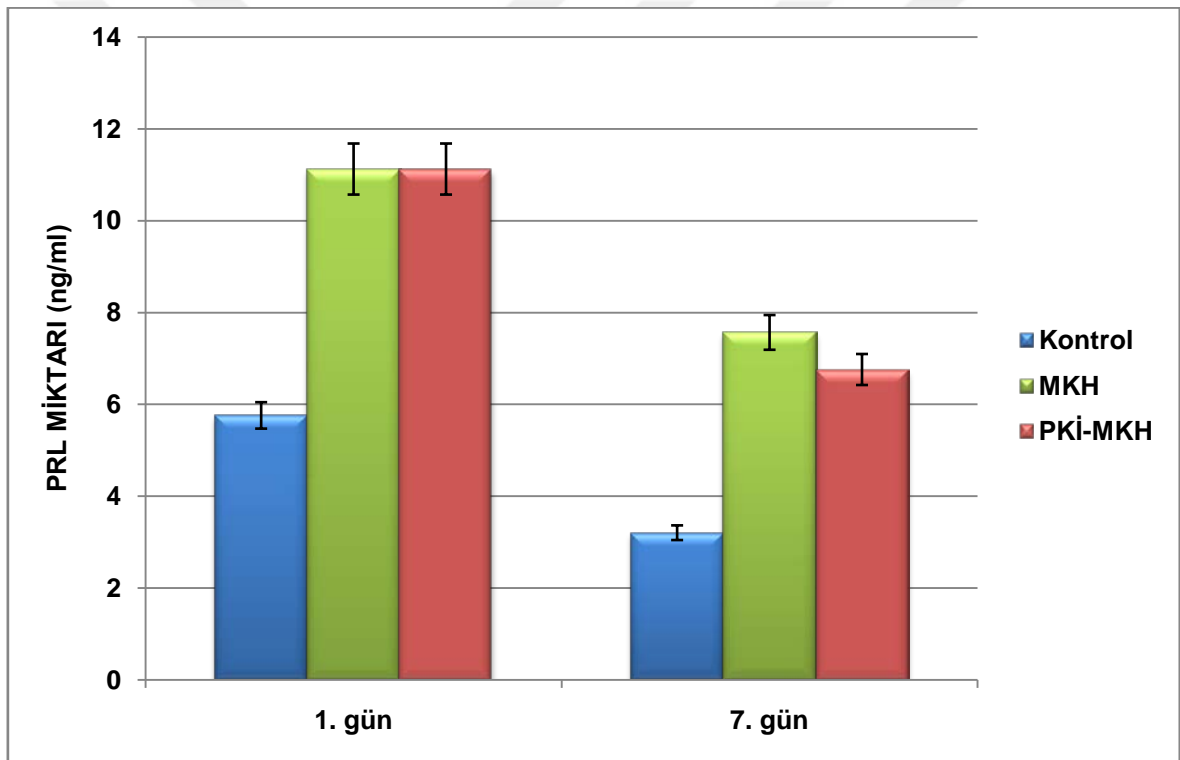
Çizim 4.23. Ortak kültür sonrası 7. günde hCA' lara ait apoptotik cisimcik fotoğrafları (Olympus, IX71). **A:** Kondisyonlanmış besiyeri grubu (hücelere netlenmiş fotoğraf), **B:** Kondisyonlanmış besiyeri grubu (cisimciklere netlenmiş fotoğraf), **C:** MKH grubu (hücelere netlenmiş fotoğraf), **D:** MKH grubu (cisimciklere netlenmiş fotoğraf). **E:** PKİ-MKH grubu (hücelere netlenmiş fotoğraf), **F:** PKİ-MKH grubu (cisimciklere netlenmiş fotoğraf). A, B, C ve D fotoğraflarında ölçek çubukları 100 µm; E ve F fotoğraflarında ölçek çubukları 50 µm. Cisimcikler sarı yıldızların hemen altında yuvarlak halde seçilmektedir. Apoptotik cisimcikler yalnız bu gruplarda gözlemlendiği için kontrol grubuna ait fotoğraflar konmamıştır.

4.5.2. ELISA ve BCASonuçları

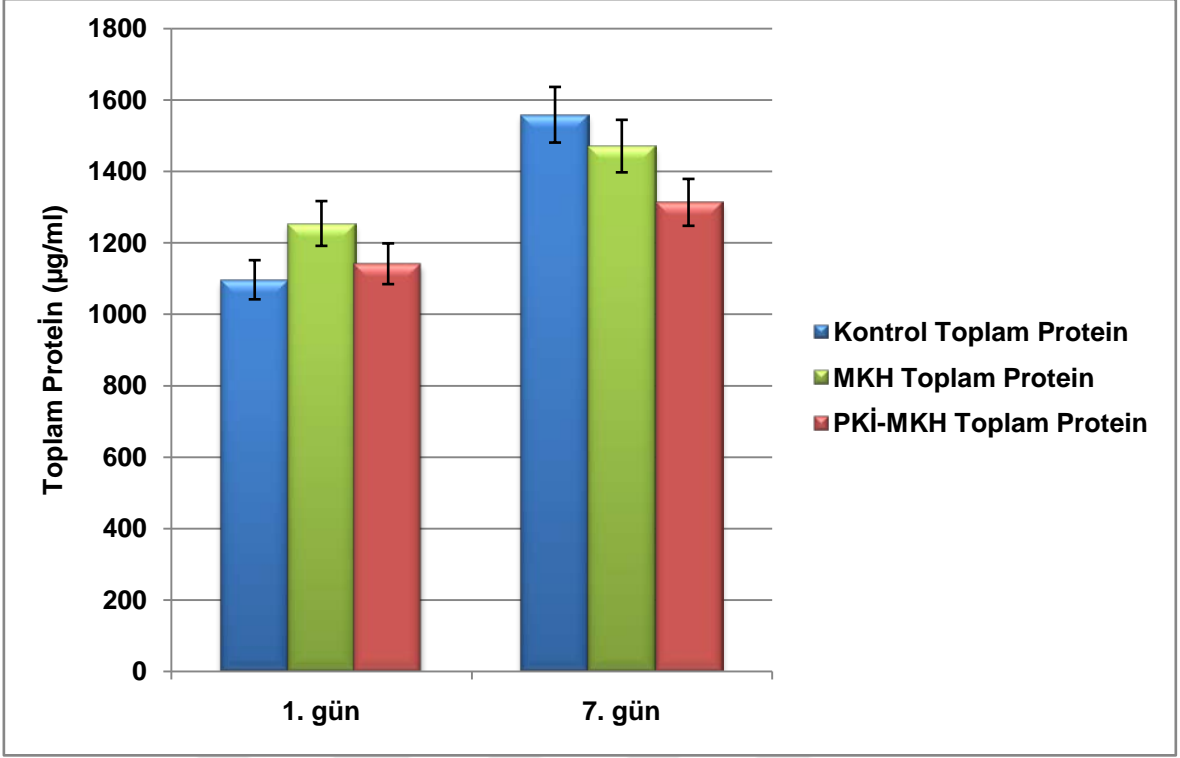
Ortak kültür sonunda kültür ortamında bulunan PRL seviyesini belirlemek için yapılan ELISA sonucunda gruplar birbirleriyle karşılaştırıldı (Çizim 4.24). Aynı örneklerdeki toplam protein miktarı BCA ile ölçülüp grafiğe döküldü (Çizim 4.25). Son olarak toplam proteinler içinde PRL miktarı yüzde olarak ifade edildi (Denklem 4.2) (Çizim 4.26).

$$\text{Yüzde PRL Miktarı} = \frac{PRL}{TP} \times 100$$

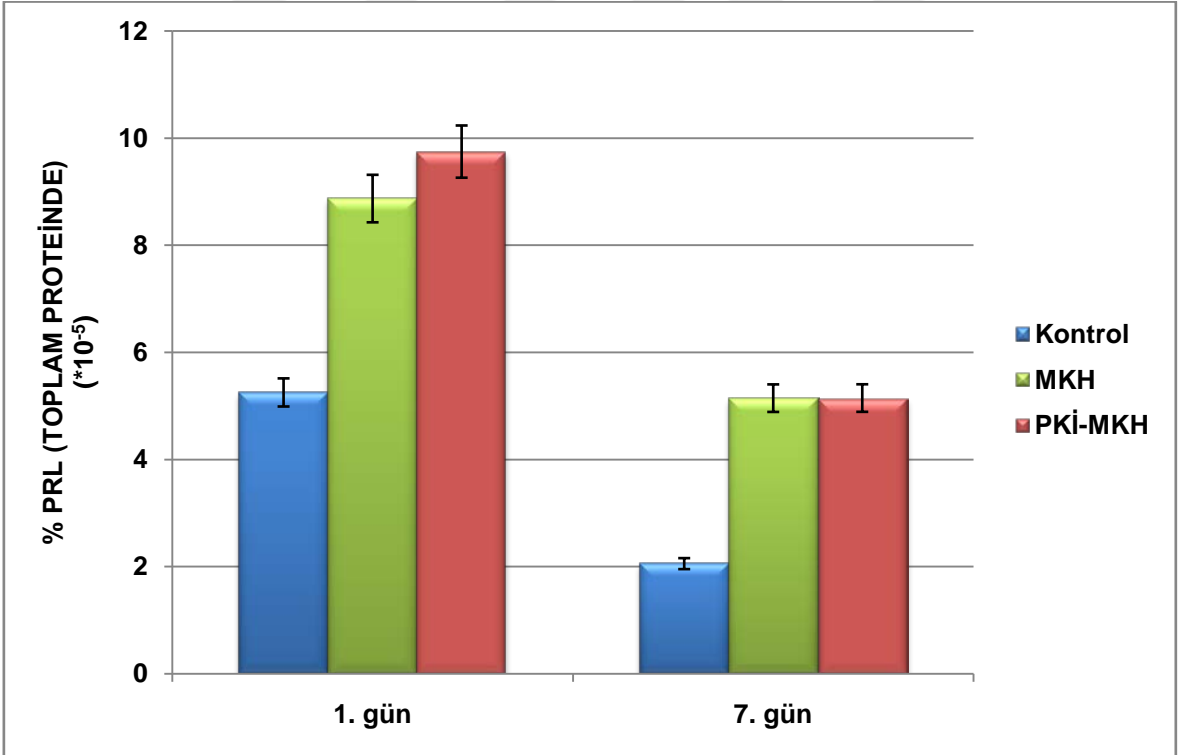
Denklem 4.2. Yüzde cinsinden PRL miktarının ifadesi. Denklemde *PRL*: ELISA sonucu elde edilen PRL miktarı (µg/ml) ve *TP*: Aynı örneklerdeki toplam protein miktarını (µg/ml) temsil etmektedir.



Çizim 4.24. ELISA sonucu PRL seviyelerinin karşılaştırılması. Alınan besiyeri örneklerinde PRL' in tüm gruplarda düştüğü görülmektedir. Bununla birlikte kontrol grubundaki seviye en düşüktür.



Çizim 4.25. BCA sonucu toplam protein miktarlarının karşılaştırılması. Grafiğe göre tüm grupların toplam protein miktarı artmaktadır.



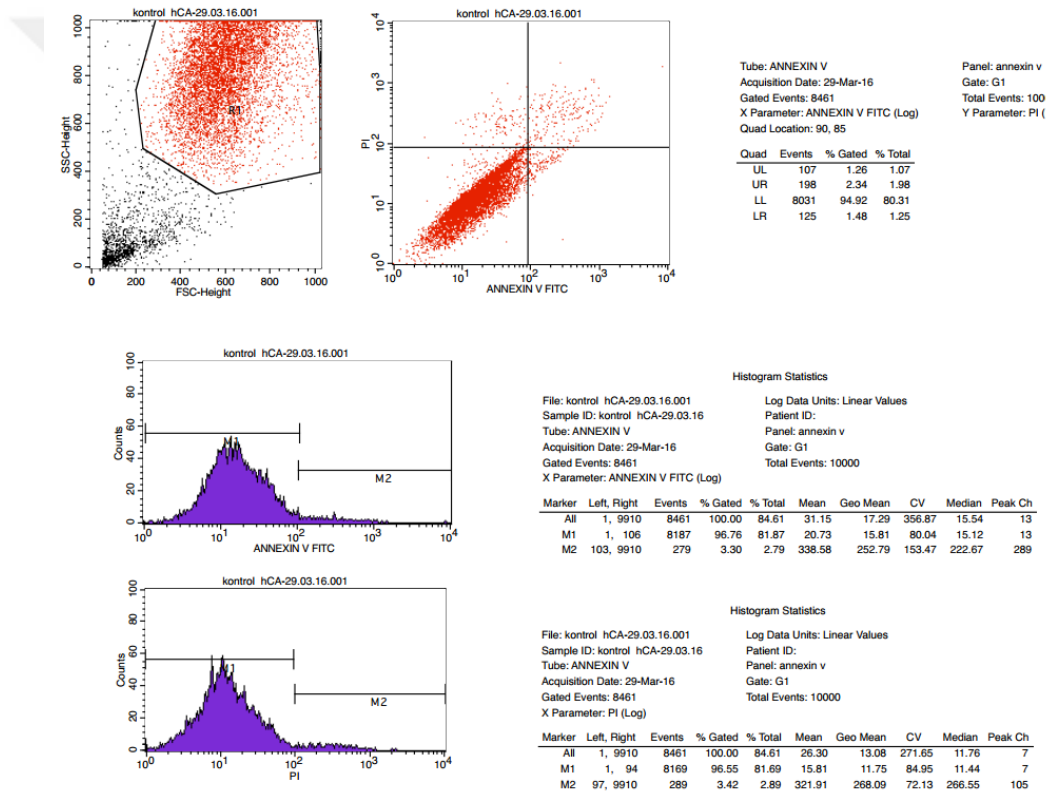
Çizim 4.26. Toplam protein miktarı içinde ile PRL' in yüzde olarak ifadesi. Değerler 10^5 ile çarpılarak grafikte ifade edilmiştir. Buna göre toplam proteinler içinde PRL yüzdesi PKİ-MKH grubunda en yüksek olup 7. gün MKH grubu ile hemen hemen eşit hale gelmiştir. Kontrol grubunda ise PRL yüzdesi düşmüştür.

4.5.3. Anneksin V Analizi Sonuçları

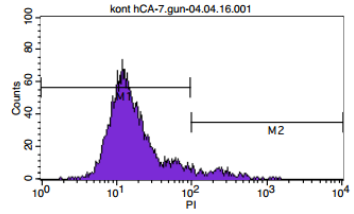
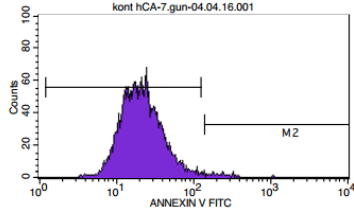
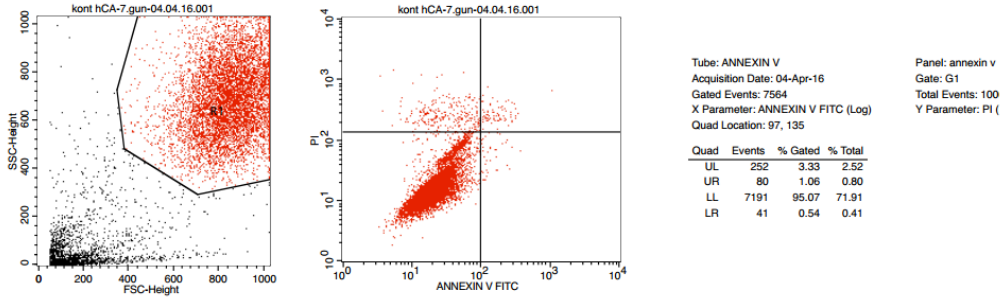
Ortak kültürün sonunda kültür kabında kalan hCA' lar toplanarak anneksin V analizine tabi tutuldu (Çizim 4.27, 4.28, 4.29, 4.30, 4.31, 4.32). Tüm grupların verileri bir arada gösterilip (Çizelge 4.4) yüzde cinsinden canlılık (Çizim 4.33) Denklem 4.3' te belirtilen şekilde ifade edildi. Ayrıca apoptotik hücrelerin toplam yüzdesi de günler (Çizim 4.34, 4.35) ve gruplar (Çizim 4.36, 4.37) arasında karşılaştırıldı.

$$\text{Yüzde Canlılık} = \frac{a}{a + b} \times 100$$

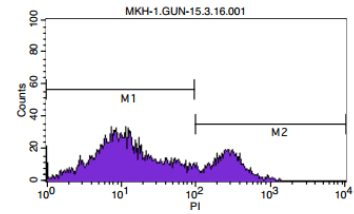
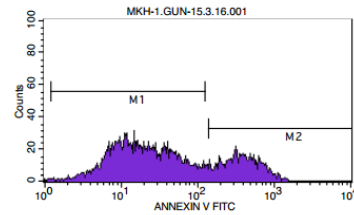
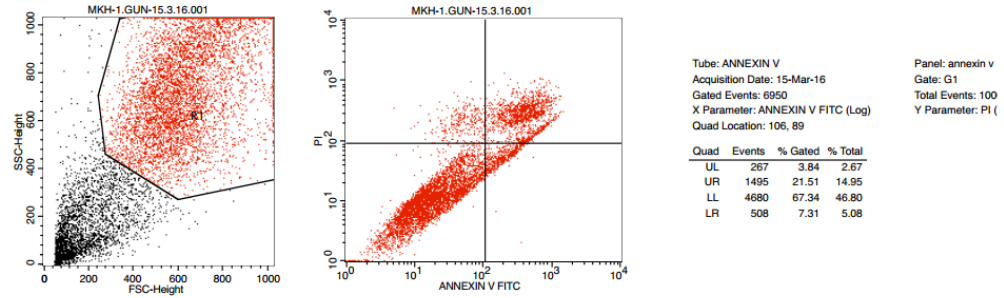
Denklem 4.3. Yüzde cinsinden canlılığın ifadesi. Denklemde a: canlı hücrelerin sayısını, b: geç apoptotik hücrelerin sayısını temsil etmektedir.



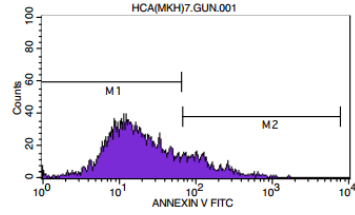
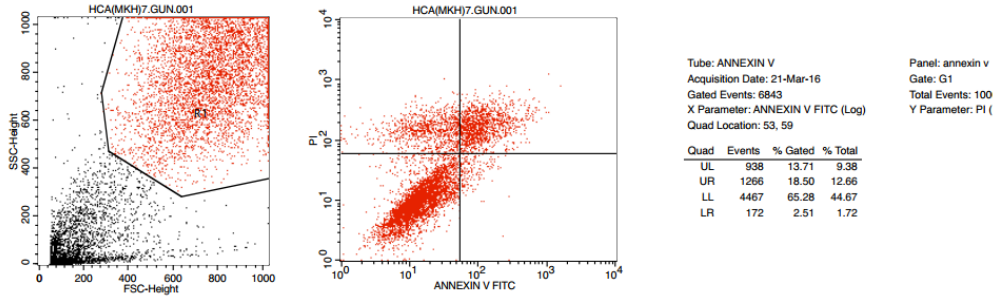
Çizim 4.27. Kontrol grubu 1. gün anneksin V analizi verileri. Hücrelerin % 2,34' ünün apoptotik olduğu görülmektedir.



Çizim 4.28. Kontrol grubu 7. gün anneksin V analizi verileri. Hücrelerin % 1,06' sının apoptotik olduğu görülmektedir.

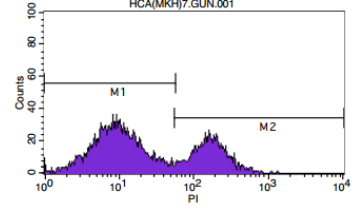


Çizim 4.29. MKH grubu 1. gün anneksin V analizi verileri. Hücrelerin % 21,51' inin apoptotik olduğu görülmektedir.



Histogram Statistics
Log Data Units: Linear Values
Patient ID:
Panel: annexin v
Gate: G1
Total Events: 10000

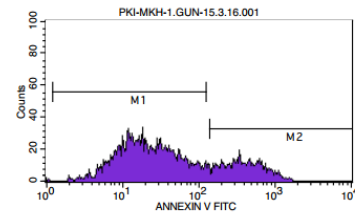
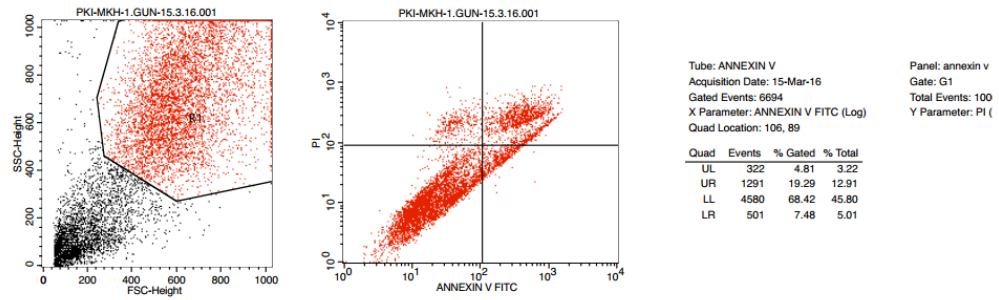
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	6843	100.00	68.43	43.40	21.73	174.87	17.47	11
M1	1, 65	5628	82.24	56.28	19.02	14.77	73.92	14.07	11
M2	67, 7704	1181	17.26	11.81	158.95	132.37	80.18	116.52	100



Histogram Statistics
Log Data Units: Linear Values
Patient ID:
Panel: annexin v
Gate: G1
Total Events: 10000

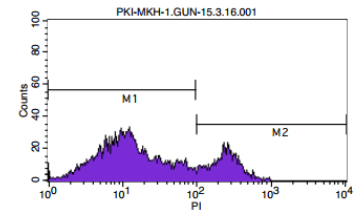
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	6843	100.00	68.43	65.89	23.51	144.23	14.86	8
M1	1, 56	4615	67.44	46.15	12.33	9.40	81.19	9.14	8
M2	54, 9910	2244	32.79	22.44	175.97	155.67	54.86	155.38	152

Çizim 4.30. MKH grubu 7. gün anneksin V analizi verileri. Hücrelerin % 18,50' sinin apoptotik olduğu görülmektedir.



Histogram Statistics
Log Data Units: Linear Values
Patient ID:
Panel: annexin v
Gate: G1
Total Events: 10000

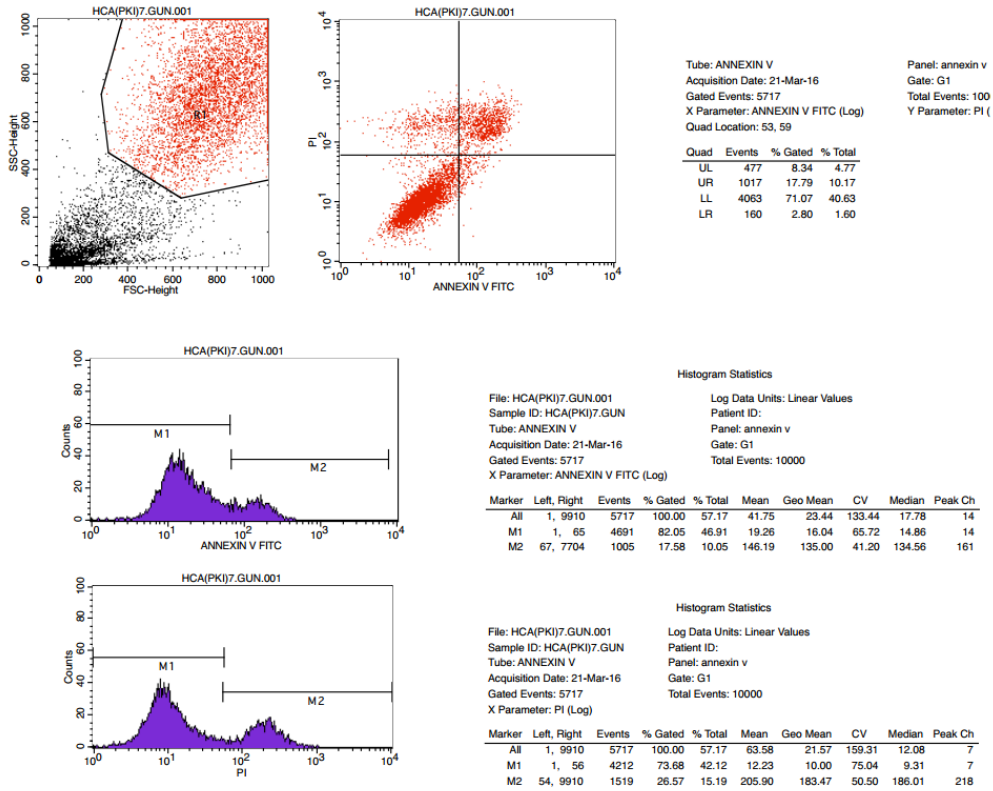
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	6694	100.00	66.94	127.64	42.72	165.28	31.06	17
M1	1, 123	4998	74.66	49.98	29.05	20.86	86.43	19.72	17
M2	137, 9910	1625	24.28	16.25	431.02	372.67	56.57	365.17	324



Histogram Statistics
Log Data Units: Linear Values
Patient ID:
Panel: annexin v
Gate: G1
Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	6694	100.00	66.94	72.18	23.46	155.82	15.19	12
M1	1, 94	5104	76.25	51.04	17.94	11.60	104.72	10.75	12
M2	97, 9910	1582	23.63	15.82	247.05	226.11	44.91	230.82	224

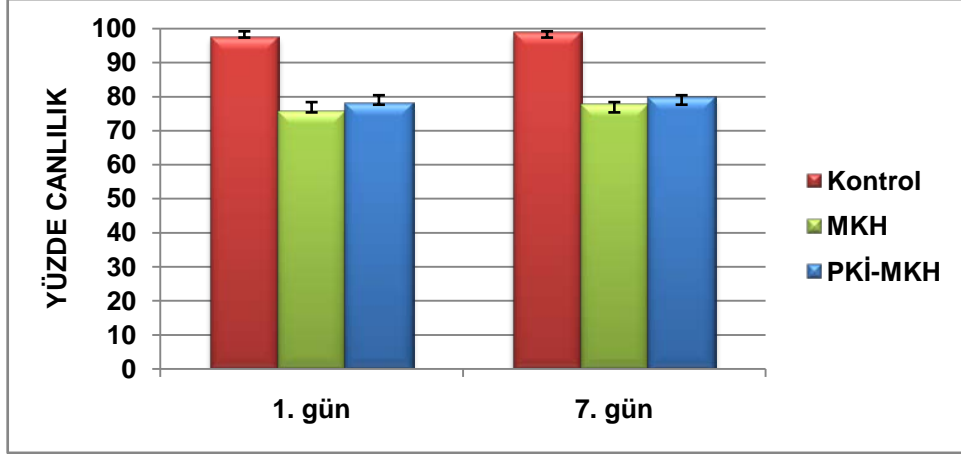
Çizim 4.31. PKI-MKH grubu 1. gün anneksin V analizi verileri. Hücrelerin % 19,29' unun apoptotik olduğu görülmektedir.



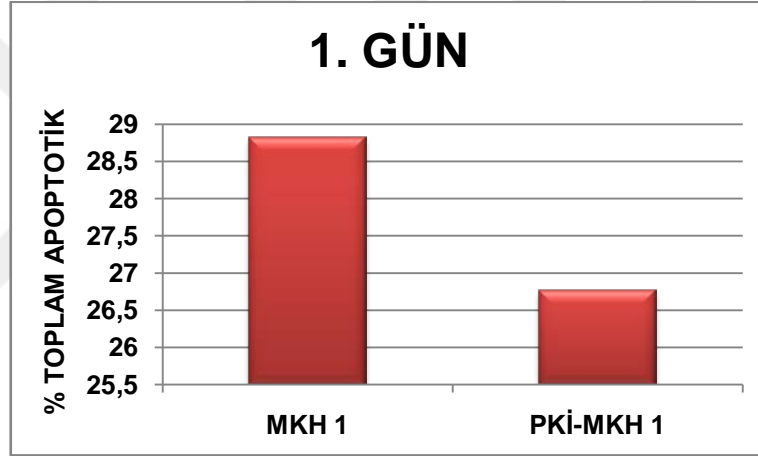
Çizim 4.32. PKI-MKH grubu 7. gün anneksin V analizi verileri. Hücrelerin % 17,79' unun apoptotik olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.4. Tüm grupların anneksin V analizi verileriyle oluşturulmuş çizelge. Tüm değerler dot-plot grafiğinde kapılanan vakalara ait yüzde değerleridir. Canlılık, Denklem 4.2' ye göre hesaplanarak yüzde cinsinden ifade edilmiş ve kullanılan veriler denklemde a ve b değişkenleriyle ifade edilmiştir. Renkler yüzde değerlerine göre Excel (Microsoft Office 2010) programı tarafından otomatik atanmış olup yeşil renk yüksek canlılığı ve sarı renk orta seviye canlılığı göstermektedir.

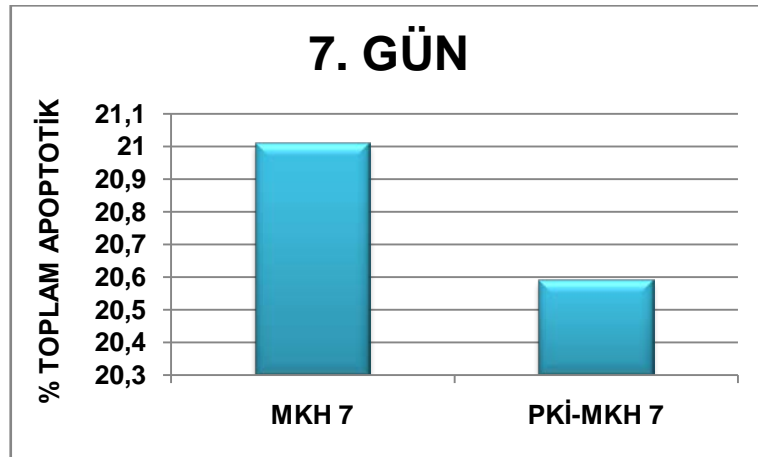
DEĞERLER GRUPLAR	NEKROTİK	GEÇ APOPTOTİK (a)	CANLI (b)	ERKEN APOPTOTİK	CANLILIK (YÜZDE)
KONTROL 1	1,26	2,34	94,92	1,48	97,59
KONTROL 7	3,33	1,06	95,07	0,54	98,90
MKH 1	3,84	21,52	67,34	7,31	75,78
MKH 7	13,71	18,5	65,28	2,51	77,92
PKI-MKH 1	4,81	19,29	68,42	7,48	78,01
PKI-MKH 7	8,34	17,79	71,07	2,8	79,98



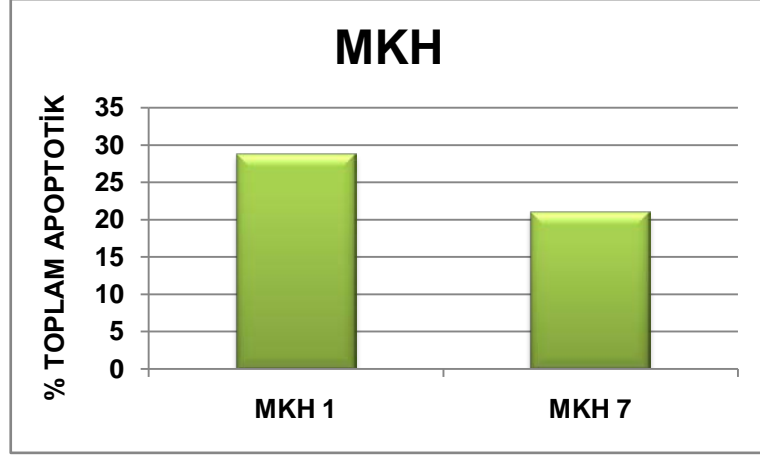
Çizim 4.33. Tüm grupların anneksin V analizlerinden hesaplanan yüzde canlılık değerleri. Çizelge 4.4’ te belirtilmiş olan değerler grafiğe döküldüğünde MKH ve PKİ-MKH ile ortak kültürün gerçekleştirildiği gruplarda canlılığın arttığı ancak kontrol grubuna göre düşük kaldığı görülmektedir.



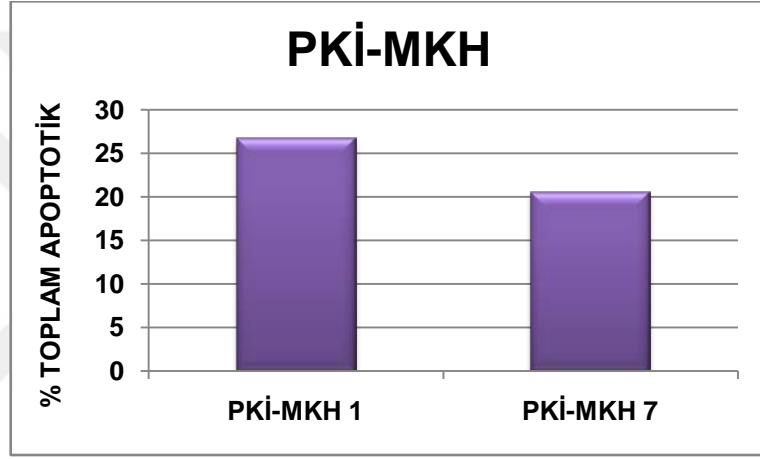
Çizim 4.34. 1. günde MKH ve PKİ-MKH gruplarına ait toplam apoptotik hücrelerin yüzdesi. Grafikteki veriler, erken ve geç apoptoz yüzdeleri toplanarak oluşturulmuştur.



Çizim 4.35. 7. günde MKH ve PKİ-MKH gruplarına ait toplam apoptotik hücrelerin yüzdesi. Grafikteki veriler, erken ve geç apoptoz yüzdeleri toplanarak oluşturulmuştur.



Çizim 4.36. MKH grubunun 1. ve 7. gündeki toplam apoptotik hücrelerin yüzdesi. Grafikteki veriler, erken ve geç apoptoz yüzdeleri toplanarak oluşturulmuştur.



Çizim 4.37. PKİ-MKH grubunun 1. ve 7. gündeki toplam apoptotik hücrelerin yüzdesi. Grafikteki veriler, erken ve geç apoptoz yüzdeleri toplanarak oluşturulmuştur.

5. TARTIŞMA

Günümüzde birçok rahatsızlık vücutta bulunan dokuların dejenerasyonu ve hücrelerin apoptoza gitmeleri yahut apoptoz mekanizmalarının bozulması nedeniyle meydana gelmektedir. İskelet kas sistemi rahatsızlıkları da bu hastalıkların önemli bir koludur. Bu rahatsızlıklar içinde *osteogenesis imperfecta*, kemik defektleri, tendon ve ligament zedelenmeleri, DMD, osteoartrit ve römatooid artrit gibi motor fonksiyonları ciddi manada etkileyen ve etkilenen bireyleri kısıtlayan hastalıklar sayılabilir (Hui ve diğ. 2009, Thomas ve diğ. 2007, Kon ve diğ. 2012, Adan ve diğ. 2013).

Her yaştan bireyin çeşitli yollarla etkilendiği bu rahatsızlıklar üzerine birçok tedavi önerisi geliştirilmiştir. Bunların içinde cerrahi operasyonlar, doku mühendisliği yaklaşımları (Schmitt ve diğ. 2012), PRP enjeksiyonu (Centeno ve diğ. 2008, Rha ve diğ. 2012, Everts ve diğ. 2006), PRF enjeksiyonu (Everts ve diğ. 2006), kortikosteroid enjeksiyonu, hyaluronik asit enjeksiyonu gibi yöntemler bulunmaktadır (Kon ve diğ. 2012, Orth ve diğ. 2014).

Osteoartritte hasar fiziksel etkilerle ortaya çıkmakta ve ortamdaki sağkalım sinyalleri yetersiz olduğu için rejenerasyon gerçekleşmemektedir (Zamli ve diğ. 2011, Thomas ve diğ. 2007, Goggs ve diğ. 2003). Römatooid artrit ise otoimmün ataklar söz konusudur.

Tedavi için kök hücrelerin doğrudan kullanımı ya da kök hücreleri uyarıcı faktörlerin mikroçevreye kazandırılması dikkat çeken ve üzerinde çalışmalar bulunan bir konudur. Örneğin PRP ve PRF, kök hücreleri uyaran biyosinyal moleküllerini yoğun bir şekilde buldukları için tedavi elemanı olarak tercih edilmektedirler (Centeno ve diğ. 2008, Rha ve diğ. 2012, Everts ve diğ. 2006). Etik sorununun olmaması, üretim ve çoğaltımının kolay olması dolayısıyla tedavi elemanı olarak tercih edilen mezenkimal kök hücreler; antiapoptotik, immunsupresif, antienflamatuar, antifibroz özellikleri, diğer kök hücreler üzerindeki düzenleyici etkileri, kemoatraktan salgılamaları ve damar oluşumunu desteklemeleriyle klinik kullanımlarda değer kazanmışlardır (Silva Meirelles ve diğ. 2009).

Ancak ortopedik rahatsızlıklarda PRL'in ortama dışarıdan eklenmesi yoluyla kullanımı dışında, kök hücrelere gen aktarımı yoluyla kazandırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle mevcut tez çalışmasıyla PRL' in MKH' lere aktarımıyla hücre davranışlarının incelenmesi ve ortak kültürdeki antiapoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla gerçekleştirilen deneylerde toplam 3 tip hücre kullanılmıştır. İlk hücre grubu olan MKH' ler, önceden izole edilmiş hücreler olup kültür ortamına alındıktan sonra farklılaşmalarına ve yüzey belirteçlerine göre yeniden karakterize edilmişlerdir. Morfolojik olarak yapılan karşılaştırmalarda (Crisostomo ve diğ. 2008) hücrelerin MKH benzeri şekillerini korudukları görülmüştür. Sitoplazmada ve çekirdekte görülen granüllü yapı da yine hücrelerin aktif olduklarını ve karakterlerini kaybetmediklerini göstermektedir. Osteojenik farklılaşmada kalsiyum nodülleri ve adipojenik farklılaşmada yağ damlacıklarını salgılamışlar, böylelikle farklılaşma yeteneklerini de korudukları kanıtlanmıştır. Akım sitometri analizinde hücreler hem pozitif hem negatif belirteçlere göre analiz edilmiştir. CD105, CD73, CD29, CD13, CD44, CD90, CD146, CD166, HLA-ABC ifadesi açısından % 90' ın üzerinde pozitiflik görülürken, buna karşın % 1' in altında popülasyonunun CD7, HLA-DR, CD106, CD14, CD34, CD33, CD117, CD11b, CD45, CD15, CD5 ve CD71 açısından % 1' in altında pozitiflik görülmüştür ki bu sonuç negatiflik olarak değerlendirilmektedir. Bu sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında sonuçların tutarlı olduğu görülmüştür (Dominici ve diğ. 2006, Nery ve diğ. 2013, Rasini ve diğ. 2013). Morfolojik takip, farklılaşma analizleri ve belirteçlerin ifadesi bir arada değerlendirildiğinde hücrelerin MKH karakterinde ve sağlıklı hücreler oldukları görülmüştür.

İkinci hücre grubu olan hCA' lar ticari olarak satın alınma yoluyla temin edilmiştir. Fakat deneylerin gerçekleştirilebilmesi için çok fazla miktarda hCA' ya ihtiyaç duyulmuş, bu nedenle de hücreler uzun süre kültürde tutulmuşlardır. Morfolojik olarak kondrosit benzeri yapılarını korudukları görülmüştür (Duan ve diğ. 2015). Ancak nükleer yerleşim göstermesi gereken Sox9' un sitoplazmik boyandığı görülmüştür. Yapılan literatür araştırmasında, kültürde erken dönem farklılaşan kondrositlerin nükleer ve sitoplazmik Sox9 ifadesi gerçekleştirebildikleri görülmüştür (Chakravarty ve diğ. 2011) Aslen kondrosit öncülleri olan bu hücreler uzun süre kültürde tutulduklarında kondrosite dönüşme eğilimine girmiş olabilirler. Bu da onların sitoplazmik olarak Sox9 ifadesi gerçekleştirmelerini açıklar. Marlovits ve diğ. (2004) uzun süre tek tabaka halindeki (monolayer) kültürde tutulmuş olan hCA' larda tip 1 ve tip 2 kollajen ifadelerini incelemişlerdir. Grubun elde ettikleri bulgulara göre tip 2/tip 1 oranı başta çok yüksekken tip 1 kollajenin gen ekspresyonu 100 kata kadar artmış ve tip 2/tip 1 oranı 0,1 ilâ 1 seviyesine düşmüştür. Bu, tip 1 kollajen ifadesinin yüksek miktarda artması manasına

gelmektedir. Dolayısıyla immunfloresan boyamalarda tip 1 kollajenin sitoplazmik olarak görülmesi bu durumla açıklanabilir. (Shahdavar ve diğ. 2008).

Hücreler çözdürüldükten sonra apoptoz ve hücre döngüsü açısından teste tabi tutulmuştur. Bu amaçla gerçekleştirilen aneksin V ve hücre döngüsü analizleri birlikte değerlendirildiğinde hCA' lar için hücre ölümlerinin gerçekleştiği ancak kalan canlı hücrelerin sağlıklı oldukları görülmüştür. Aynı zamanda bu hücrelerin anöploidi göstermedikleri ve canlılık oranlarının yüksek olduğu sonucuna varılabilir. Yine de ölü hücrelerin var olması, dondurma-çözme işlemiyle alakalıdır. Birçok kaynakta dondurma-çözme işleminin hücrelere değişik yollarla hasar verdiği ve belli oranlarda hücre ölümlerine neden olduğu belirtilmiştir (Alessandrino ve diğ. 1999, Liseth ve diğ. 2005). Aynı zamanda hücrelerin depolandıkları sürenin uzaması da onlardaki hasarı arttıran bir etmen olabilmektedir (Baust ve diğ. 2015).

Hücre döngüsü analizlerinin değerlendirilmesinde G2/G1 oranı önemli bir kriterdir. Bu oranın sağlıklı hücrelerde 2' den az çıkması beklenir (Rabinovitch, 2016). Yapılan analizde (Çizim 4.8) bu oranın 1.93 çıkması da hücrelerin sağlıklı olduklarının önemli bir göstergesidir.

Üçüncü grup hücreler olan PKİ-MKH' ler gen aktarımı ile elde edilmiştir. Gen aktarımı elektroporasyon sistemi kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntemde hücrelere bir elektrik şok verilerek hücre yüzeyinde ve çekirdek zarında geçici olarak porlar açılmıştır. Bu porların açılmasından sonra hücreler normal besiyerinde kültüre edilerek canlılıklarını korumaları sağlanmıştır. Ancak her hücre canlılığını koruyamamış ve ölümler görülmüştür. Bu ölümlerin görülmesi prosesin doğal bir sonucu olup (Potter ve diğ. 2010)geni içeren hücreler gen aktarım seçiliminde canlı olarak kalıp deneyde kullanılmışlardır. Bu hücrelerin koloni oluşturmaya devam ettikleri ve MKH morfolojisini sürdürdükleri görülmüştür. Bu nedenle gen aktarımının başarılı olduğu söylenebilir. Ancak literatürde PRL geni aktarılmış MKH olmadığı için bu hücreler açısından protein salımı, proliferasyon hızı ya da kültürdeki morfolojileri açısından herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Hücrelerin apoptoza sürüklenmesi için değişik yöntemler önerilmiştir. Buna göre hücreler temel olarak biyolojik veya kimyasal yolla apoptoza sürüklenir (Abcam, 2014). Ayrıca hücrelerin yetersiz besi ortamında bulunmaları da apoptoza sürükleyici bir etmendir (Kulkarni ve diğ. 1994, Braun ve diğ. 2011). Bu tez çalışmasıyla özellikle osteoartrit ve romatoid artrit hedef alınmıştır. Bu hastalıklar fiziksel hasarlar ve otoimmün

ataklar neticesinde hücreleri etkilemektedir. Bu durumları en iyi taklit edecek olan da hücrelerin biyolojik ajanlarla apoptoza sürüklenmesidir. Yapılan literatür araştırmasında kondrositlerin apoptoza sürüklenmesi için TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ sitokinlerinin kullanımına rastlanmıştır. Bahsi geçen çalışmada sitokinler 25 ng/mlTNF- α , 20 ng/ml IL-1 β ve 5 ng/mlIFN- γ konsantrasyonlarında kullanılmıştır. Yürütülen tezde hücrelerden ya da kullanılan malzemelerden kaynaklanabilecek farklılıkları ortadan kaldırmak için apoptoz şartları optimize edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre 25 ng/mlTNF- α , 20 ng/ml IL-1 β ve 10 ng/mlIFN- γ kullanılarak hazırlanan bileşimin, diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında en iyi etkiyi yaparak hücre canlılığını % 51,91' e düşürdüğü görülmüştür. Bulunan bu bileşim literatürle karşılaştırıldığında (Adan ve ark. 2013) yalnızca IFN- γ konsantrasyonunun daha yüksek kullanıldığı görülmüştür. Yani literatürdekine yakın bir sonuç elde edilmiştir. Bu nedenle hCA' ların apoptoza sürüklenmesinde bu konsantrasyonun kullanılmasına karar verilmiştir.

Ortak kültür öncesi hücrelerin hazırlanma aşamasında hCA' lar flasklara aynı yoğunlukta ekilmiştir. Fotoğraflar incelendiğinde 1. günün sonunda kontrol grubunda sayıca azalma çok az olup apoptotik cisimciklere rastlanmamıştır. Bunun yanında MKH grubu hCA' larında sitoplazmanın küçülmesine rastlanmaktadır. 40x büyütme fotoğraflar incelendiğinde, MKH grubundaki hCA' ların çekirdeğinin boşluklu bir hal aldığı fark edilmiştir. Sitoplazmanın azalması ve çekirdekte kromatin yoğunlaşması apoptozun belirteçleri olarak kabul edilmektedir (Lotz ve diğ. 1999). Bu nedenle morfolojilerine bakılarak MKH grubunun apoptoza gittiği söylenebilir. PKİ-MKH grubunda hücre ölümleri olsa da apoptotik cisimciklere rastlanmamıştır. Bu gruba ait hücrelerin etrafında çok belirgin bir parlama fark edilmektedir. Normalde bu parlama hücrelerin ölmeleri ya da bölünmeleri esnasında kültüre edildikleri yüzeyden kalkmaları nedeniyle meydana gelir. Bu durum anneksin V verileri ile birlikte değerlendirildiğinde hücrelerin apoptoza gitmeleri sebebiyle parlama gösterdikleri sonucuna varılabilir. MKH grubu hücreleriyle karşılaştırıldığında bu parlamanın yalnız PKİ-MKH grubunda görülmesi, bunun PRL' e bağlı bir nedenle meydana geldiğini düşündürmektedir. Bu grupta PRL apoptozu engellemeye çalışıyor ve bu nedenle de hücreler sitoplazma küçülmesine direniyor olabilirler.

Kültürün 7. gününde hücrelerin yeniden proliferere oldukları görülmektedir. MKH ve PKİ-MKH ile ortak kültüre alınmış hCA' lar kültür kabının neredeyse tamamını kaplamış, buna karşın kontrol grubunda bu seviyede bir artış olmamıştır. MKH ve PKİ-MKH

grupları kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında PKİ-MKH grubunun besiyerinde daha fazla apoptotik hücre olduğu görülmüştür.

Kültür fotoğrafları incelendiğinde bleblerden çok apoptotik cisimciklerin varlığı görülmektedir. Bu durum da geç apoptotik hücrelerin yüzdelерinin erken apoptotik hücrelerin yüzdelерinden fazla olmasıyla örtüşmektedir. Ortamda makrofajlar gibi fagositik hücrelerin olmayışı nedeniyle apoptotik cisimcikler besiyerinde bulunmaya devam etmektedirler.

Fakat burada gruplar arasında değerlendirilmesi gereken önemli bir başka veri, kültürün sonunda 1. güne oranla nekrozdan ne kadar korunduklarıdır. Anneksin V verilerine bakılıp 7. gün nekroz yüzdesi ile 1. gün nekroz yüzdesi oranlanırsa bu konuda bir fikir edinilebilir. Bu oranlar değerlendirildiğinde, nekrozun kontrol grubunda 2,03 katına, MKH grubunda 3,5 katına ve PKİ-MKH grubunda 1,73 katına çıktığı görülmektedir. MKH grubunun canlılığının ve apoptoz oranlarının azaldığı da göz önünde bulundurulduğunda bu gruptaki hCA' ların nekroza doğru gittiği anlaşılmaktadır. Burada nekroza sürükleyici etmen, MKH grubunda meydana gelen kontakt inhibisyonu olabilir. PKİ-MKH grubunda nekrozun artması da yine bu durumla açıklanabilir. Ancak PRL varlığında hem canlılık artmıştır hem de nekroza gitme oranı daha düşük kalmıştır. MKH grubu ile PKİ-MKH grupları karşılaştırıldığında PKİ-MKH grubu hücrelerinde daha çok apoptotik cisimcik görülmesi de bu durumu desteklemektedir.

Kültür ortamında kullanılan besiyeri, ortamla ilgili değişiklikleri gözle görülür seviyede takip edebilmek amacıyla fenol kırmızısı içeren bir bazal besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır. Fenol kırmızısı, ortamda toksik maddelerin birikmesi ve besinin azalmasıyla oluşan pH değişimine cevaben renk değiştirir. Kültürün ilk gününde gruplar arasında besiyerinin rengi açısından belirgin bir değişiklik görülmezken son gün PKİ-MKH grubunun besiyerinin sarı renk aldığı görülmüştür (veri gösterilmedi). Aslında apoptoz ve nekroz oranlarına bakıldığında hücrelerin besiyerinde böyle bir renk değişimi göstermesi beklenmeyebilir. Çünkü MKH ve PKİ-MKH gruplarının günler arasındaki farklılıkların birbirine yakın değişim gösterdiği söylenebilir. Hatta MKH grubunun kültürün 7. gününde nekroz açısından daha fazla bir yüzdeye sahip olduğu görülmektedir. Ancak PKİ-MKH grubunun besiyerinde gözle görülebilir kritik bir renk değişimi meydana gelirken diğer gruplarda böylesi bir değişim gerçekleşmemiştir. Bu durum besiyerinde PRL' in varlığı ile de ilişkilendirilemez çünkü ELISA ve BCA sonuçları birlikte değerlendirildiğinde PRL yüzdesinin günler arasında azalma gösterdiği bulunmuştur. Hatta

MKH ve PKİ-MKH grupları arasında PRL yüzdesi 7. günde eşitlenmiştir. Sayılan bu nedenler dışında besiyerinde görülen bu renk değişimini gerçekleştirebilecek en kuvvetli ihtimal, PKİ-MKH' lerin metabolizmasının gen aktarımı sonucu MKH' lere nazaran artması nedeniyle ortamda besin maddelerinin tükenmesi ve toksik madde salımının artmasıdır. Herhangi bir hücreyle kültür yaparken kültür kabındaki besiyeri uzun süre değişilmediğinde, eğer fenol kırmızısı gibi bir renk indikatörü de varsa renk değişimi gözlenir ve bu değişim artık besiyerinin değişmesi gerektiğinin bir göstergesidir. Böyle bir besi ortamı, toksik maddeler ortamdan uzaklaştırılmadığı için hücreler üzerinde stres oluşturur. Aynı zamanda besin maddelerinin tükenmesi de hücreleri açlığa sürüklediği için hücreler üzerinde daha fazla stres oluşturur ve apoptoz yolakları uyarılır. Kontrol grubunda ortamdaki besini tüketen tek grup hücre varken ortak kültür gruplarında hCA' ların yanı sıra MKH ve PKİ-MKH' ler de aynı ortamdan beslenmektedir. Bu gruplara apoptoz sinyaliyle uyarı yapılırken kontrol grubuna bu uyarının yapılmamış olması da kontrolle kıyaslandığında hücreleri apoptozla yönlendirecek çok daha fazla etkinin var oluşu demektir. Dolayısıyla 7. günde besiyerinde görülen bu renk değişimi ile apoptotik cisimciklerin varlığı arasında, hücre metabolizmasının artmasına karşın ortamdaki besin miktarının yetersiz kalması üzerinden bir ilişki kurulabilir.

Elde edilen veriler PKİ-MKH' lerin metabolizmalarının artmış olduğu gerçeğiyle birlikte yeniden değerlendirildiğindeyse, hücrelerin normalden fazla strese maruz kalmalarına rağmen canlılık, apoptoz ve nekroz açısından bu yüzdeleri gösterdikleri anlaşılmaktadır. Hatta MKH grubu hCA' ların canlılıklarına nazaran PKİ-MKH grubu hCA' ların canlılığında bir artma bile görülmüştür ki bu, PRL' in kondrosit apoptozuna karşı koruyucu etkisinin de bir kanıtıdır.

Kondrositlerle MKH' lerin ortak kültürünün gerçekleştirildiği çalışmalar incelendiğinde hücrelerin çok değişik şekillerde kültüre edildikleri, bunlar arasında hücrelerin pellet kültürünün, değişik doku iskeleleriyle birlikte kullanımının, iki boyutlu ve üç boyutlu kültürlerinin, birbirleriyle doğrudan fiziksel temas ederek ya da temas olmaksızın kültürlerinin olduğu görülmektedir (de Windt ve diğ. 2014, Hubka ve diğ. 2014). İncelenen bir çalışmada (Yang ve diğ. 2012) çalışmacılar hCA' ların MKH üzerindeki kondrojeneze yönlendirici etkilerini incelemek üzere ortak kültür yapmışlardır. Bu amaçla ayırıcı membran kullansalar da MKH' leri kültür kaplarına, hCA' ları ise pellet olarak ayırıcı membranlara ekmişlerdir. Çalışmanın sonucunda hCA/MKH oranının 63:1 olarak kullanılması durumunda MKH' lerden farklılaşan hCA' ların morfolojik, fenotipik

ve davranışsal olarak hCA benzeri özellikleri en yüksek olarak taşıdıklarını görmüşlerdir. Bir başka çalışmada (Bian ve diğ. 2011) hCA' lar ve MKH' ler ortak kültüre alınırken fotoenkapsülasyon yöntemiyle hyaluronik asit hidrojel doku iskeleleri içine enkapsüle edilerek kullanılmışlardır. Oluşturulan iki gruptan birinde hCA' lar ve MKH' ler ayrı ayrı enkapsüle edilip aynı kuyucukta kültüre edilirken diğerinde hücreler karışım halinde enkapsüle edilerek kültüre alınmışlardır. Bu karışımda MKH/hCA oranı 4:1 olarak kullanılmıştır. Alınan ölçümlerde karışım halinde enkapsüle edilen doku iskelerinin Young modülü, dinamik modülü, GAG seviyeleri ve kollajen içeriğinin ayrı enkapsüle edilmiş jellerden daha yüksek değerler gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu jellerde MKH hipertrofinin belirteci olarak kabul edilen kollajen 10 depolanmasının da diğer gruptan anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur.

Bu tip yöntemlerde MKH ile hCA sayılarının birbirine oranları önemli olmaktadır. Bu çalışmalar hipotezleri açısından incelendiğinde ise genellikle ortak kültür sonunda MKH' lerin kondrogenezinin nasıl etkilendiğinin incelendiği görülmektedir. Mevcut tez çalışmasının hipotezi bu çatıda oluşturulmamış ve ortak kültür için böyle bir oran gözetilmemiştir. Hücreler yalnızca tek katmanlı olarak (*monolayer*) kültüre edilmişlerdir. Eğer bu hücreler bahsi geçen çalışmalardaki gibi üç boyutlu kültüre alınmak istenirse, bunun için de bir optimizasyon çalışması yapılması gereklidir.

Apoptoz ile ilgili çalışmalarda hücreler bu çalışmada olduğu kadar makro düzeyde değil daha moleküler düzeyde incelenirse önemli bulgular elde edilebilir. Bunlardan biri kantitatif *real time* PCR (qRT-PCR) ile apoptoz gen panelinin incelenmesidir. Bir diğeri ise *microarray* panelleri ile apoptotik genlerin taranmasıdır. Bu şekilde hücrelerin apoptoza gitmeleri esnasında aktifleşen genler ve yolaklar hakkında sayısal veriler alınıp yorum yapılabilir ve biyoinformatik analiz gerçekleştirilebilir. Ancak bunlar maliyet gerektiren testler oldukları için bu çalışma kapsamında gerçekleştirilememiştir.

Apoptoz çalışmalarında apoptotik cisimciklerin ya da hücrelerde meydana gelen değişimlerin incelenmeleri için taramalı elektron mikroskopisinin (TEM) kullanımına rastlanmıştır. Ancak mevcut imkanlar dahilinde TEM kullanılmadığı için yalnız faz kontrast mikroskopisi ile apoptoz morfolojik olarak takip edilmeye çalışılmıştır. Buradan elde edilen fotoğraflar ise TEM' den alınacak olan fotoğraflara nazaran daha kaba ve az detay içeren fotoğraflar olup hücre içindeki değişimleri gözlemlemekten uzaktır. Çekirdekteki makro değişimler, sitoplazma, vakuol ve cisimcik oluşumu gözlenebilse de

organel seviyesindeki değişimler incelenemediği için birçok detay elde edilememiştir. Bu nedenle literatürle karşılaştırılacak daha az veri elde edilmiştir.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasıyla, PRL ve MKH'lerin antiapoptotik özelliklerinden yararlanılarak kondrosit apoptozuna engel olup olamayacaklarının incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla önce MKH'lere elektroporasyon yoluyla PRL geni aktarılmıştır. Ardından hCA'lar ile gen aktarılmış MKH'ler doğrudan temas olmaksızın ortak kültüre alınmıştır. Ortak kültürde hücelere TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ sitokinlerinden oluşan bir kokteyl verilerek hücreler apoptoza sürüklenmiştir. Ardından morfolojik değerlendirme yapılmış, serum PRL seviyeleri ölçülmüş ve anneksin V analizi yapılarak elde edilen veriler bir arada değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak gen aktarımıyla oluşturulmuş PKİ-MKH'ler koloni oluşturma yeteneklerini ve MKH benzeri morfolojilerini korumuşlardır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda elde edilen en önemli veri, PRL geni aktarılan MKH'lerin, yani PKİ-MKH'lerin proliferasyon hızının normal MKH'lere göre artmış olduğudur.

Ortak kültürün ilk gün verileri değerlendirilerek PRL'in kondrosit apoptozuna karşı engelleyici etki gösterdiği söylenebilir. Son gün verileri değerlendirildiğinde ise hücreleri nekrozdan da korudukları görülmüştür. Bu sonuçlar PRL'in hücre ölümü üzerindeki düzenleyici etkisini kanıtlamaktadır.

Çalışmada ortak kültür metoduyla ilgili bazı gözlemlerde bulunulmuştur. Mevcut çalışmada apoptoz sinyalleri 0. günde verilmiş ve kültür ortamı bir daha değiştirilmemiştir. Kültürün son gününde besiyerinin PKİ-MKH grubunda sarardığı görülmüştür. Burada açlık nedeniyle oluşan stres hücrelerin apoptoza gitmelerine neden olmuştur. Halbuki kültür ortamı son güne kadar yeterli olsaydı, PKİ-MKH'ler bu stres faktöründen uzak olup doğal davranışlarını sergilemeye devam edebilirlerdi. Besiyerinin değişilmemesi ayrıca apoptoz sinyallerinin de ortamda tükenmesi manasına gelebilir. Bu nedenlerden dolayı böyle bir ortak kültür gerçekleştirilirken besiyeri her gün ya da iki günde bir değiştirilmelidir. Besi ortamından gerçekleştirilecek olan ELISA ve BCA gibi testler için de her gün toplanan besiyerleri biriktirilmeli ve günbegün veya kültür sonunda kümülatif olarak değerlendirme yapılmalıdır.

Ortak kültürde gözetilmesi gereken bir başka sınırlayıcı faktör de kontakt inhibisyonudur. Yapılan çalışmayla PKİ-MKH'lerin metabolizmasının MKH'lardan daha hızlı olduğu bulunmuştur. Bu nedenle bu hücrelerin kök hücre olduğu göz önünde

bulundurularak kontakt inhibisyonundan kaçınılmalı ve kültür süresi gözetilerek hücre ekim sayısı belirlenmelidir.

Deneyde ortak kültür sonrası analizlere yetecek kadar hücre çıkması için bir deney grubu birden fazla 6 kuyucuklu kültür kabında yürütülmüştür. Ancak bu da zaman ve iş yükü açısından zorlayıcı olup işlemler esnasında vakit kaybına neden olmaktadır. Bu nedenle öneri, ortak kültür ortamının iyi tanımlanması, işlemlerin gözden geçirilerek uygun bir sırayla yapılması ve grupların farklı zamanlarda birebir aynı muameleden geçirilerek kültüre alınmasıdır. Eğer ortam iyi tanımlanır ve işlemler her defasında aynı şekilde gerçekleştirilirse, hücreler arasında ciddi bir farklılık yoksa, birbiriyle karşılaştırılabilecek güvenilirlikte sonuçlar elde edilir ve iş yükü zamana yayılabilir. Böylelikle ortak kültür yöntemi de optimize edilmiş olur.

Mevcut tez çalışmasıyla PRL genini devamlı ifade eden bir MKH hattı oluşturulması, bu hücrelerin kültürdeki davranışlarının gözlenmesi, hCA' larla birlikte ortak kültüre alındıklarında nasıl davrandıklarının gözlenmesi ve ortak kültür için yöntem önerisinde bulunulması amaçlanmıştır. Bulgular ve sonuçlar incelendiğinde gen aktarımının başarılı olduğu görülmektedir. Çalışmayla PKİ-MKH' ler elde edilmiş, tek başlarına ve ortak kültürdeki proliferasyonları gözlemlenip farklar ortaya konmuştur. Aynı zamanda kullanılan yöntem de tartışılmış ve eksiklerin ne olabileceği belirlenerek önerilerde bulunulmuştur. Dolayısıyla hedeflenenlerin tamamına ulaşıldığı söylenebilir.

İleriki çalışmalarla PKİ-MKH' lerin davranışlarını anlamak için kültürde daha çok gözlem yapılmalıdır. Bu çalışmada PRL' in MKH farklılaşması üzerine etkisi incelenmemiştir. Ancak PRL' in etkisi olduğu bilinen bu proses üzerine de incelemelerde bulunulmalıdır. Başka hastalık modellerindeki kullanımlarını araştırmak için bu hastalıklarla ilişkili hücrelerle *in vitro*da ortak kültürleri yapılp potansiyelleri ortaya konmalıdır. Bunlar da yapıldıktan sonra hücrelerin *in vivo* deneylerine geçilmeli ve hayvan sistemlerinde kullanımları araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- 6 well plates with inserts. X-Zell Biotech ağ sayfası. Son erişim tarihi:19.05.2016. <http://www.x-zell.co.th/home.php?cat=4011>
- Adan N, Guzman-Morales J, Ledesma-Colunga MG ve diğ. Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis. *J Clin Invest*,2013; 123(9):3902–3913.
- Alessandrino EP, Bernasconi P, Caldera D ve diğ. Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: Analysis of 126 cases. *Bone Marrow Transplant*, 23:533–537; 1999.
- Alvarez CV, Garcia-Lavandeira M, Garcia-Rendueles MER ve diğ. Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *J Mol Endocrinol*, 2012 49, R89–R111
- Alwattar BJ, Schwarzkopf R, Kirsch T. Stem Cells in Orthopaedics and Fracture Healing. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 2011; 69(1), 6-10.
- Andia I, Maffuli N. Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 2013; 9, 721-730.
- Arandjelovic S, Ravichandran KS. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol*, 2015; 16(9):907-17
- Batsali AK, Kastrinaki MC, Papadaki HA ve diğ. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2013; 8(2):144-55.
- Baust JM, Corwin WL, VanBuskirk R ve diğ. Biobanking: The Future of Cell Preservation Strategies. *Adv Exp Med Biol*, 2015;864:37-53.
- Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD ve diğ. Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol Metab*, 2006; 17(3):110-6.
- Beresford PJ, Xia Z, Greenberg AH ve diğ. Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *J.Immunity*, 1999;10:585–594.
- Bian L, Zhai DY, Mauck RL ve diğ. Coculture of Human Mesenchymal Stem Cells and Articular Chondrocytes Reduces Hypertrophy and Enhances Functional Properties of Engineered Cartilage. *Tissue Eng Part A*, 2011; 17(7-8): 1137–1145.
- Binart N, Ormandy CJ, Kelly PA. Mammary gland development and the prolactin receptor. *Adv Exp Med Biol*, 2000; 480:85-92.
- Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol*, 1995;5:21–6.

- Bratton DL, Fadok VA, Richter DA ve diğ. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem*, 1997;272:26159–65.
- Braun F, Bertin-Ciftci J, Gallouet A-S ve diğ. Serum-Nutrient Starvation Induces Cell Death Mediated by Bax and Puma That Is Counteracted by p21 and Unmasked by Bcl-xL Inhibition. *PLoS One*, 2011; 6(8): e23577.
- Brooks CL. Molecular Mechanisms of Prolactin and Its Receptor. *Endocrine Reviews*, 2012; 33: 504–525.
- Canbay E, Norman M, Kilic E ve diğ. Prolactin stimulates the JAK2 and focal adhesion kinase pathways in human breast carcinoma T47-D cells. *Biochem J*, 1997; 15;324 (Pt 1):231-6.
- Cell Cycle and DNA Content Analysis Using the BD Cycletest Assay on the BD FACSVerse™ System. Wang Y, McIntyre C, Mittar D. BD Biosciences ağ sitesi. Son erişim tarihi: 04.12.2015. https://wwwbdbiosciences.com/documents/BD_Instruments_FACSVerse_CellCycle_DNA_Analysis_App>Note.pdf
- Centeno CJ, Busse D., Kisiday J. ve diğ. Increased Knee Cartilage Volume in Degenerative Joint Disease using Percutaneously Implanted, Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Pain Physician*, 2008; 11(3), 343-353.
- Chakravarty G, Rider B, Mondal D. Cytoplasmic compartmentalization of SOX9 abrogates the growth arrest response of breast cancer cells that can be rescued by trichostatin A treatment. *Cancer Biology & Therapy*, 11:1, 71-83.
- Chemistry of Protein Assays. Thermo Fisher Scientific ağ sitesi. Son erişim tarihi: 18.05.2016. <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html>
- Chughtai N, Schimchowitsch S, Lebrun JJ ve diğ. Prolactin induces SHP-2 association with Stat5, nuclear translocation, and binding to the beta-casein gene promoter in mammary cells. *J Biol Chem*, 2002; 23;277(34):31107-14.
- Cooke PS, Holsberger DR, Witorsch RJ ve diğ. Thyroid hormone, glucocorticoids, and prolactin at the nexus of physiology, reproduction, and toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008; 194, 309–335.
- Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA ve diğ. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF κ B- but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294: C675–C682, 2008.
- Da Silva Meirelles L, Fontes AM, Covas DT. ve diğ. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2009; 20, 419-427.
- Das AK, Gupta P, Chakraborty D. Physical methods of gene transfer: Kinetics of gene delivery into cells: A Review. *Agri. Review*, 2015;36 (1):61-66.

- de Wert G, Mummery C. Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. *Hum. Reprod*, 2003;18 (4): 672-682.
- de Windt TS, Hendriks JAA, Zhao X ve diğ. Concise Review: Unraveling Stem Cell Cocultures in Regenerative Medicine: Which Cell Interactions Steer Cartilage Regeneration and How? *Stem Cells Transl Med*, 2014; 3(6): 723–733
- Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System. (Hingorani R, Deng J, Elia J ve diğ.) BD Biosciences ağ sitesi. Son erişim tarihi: 04.12.2015. https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSVerse_Apoptosis_Detection_AppNote.pdf
- Devi YS, Halperin J. Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014; 382, 400–410.
- Ding DC, Chang YH, Shyu WC. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant*, 2015;24(3):339-47.
- Docheva D, Haasters F, Schieker M. Mesenchymal Stem Cells and Their Cell Surface Receptors. *Current Rheumatology Reviews*, 2008; 4(3), 155-160.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, ve diğ. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006;8,315-317.
- Draca S. Prolactin as an immunoreactive agent. *Immunology and Cell Biology*, 1995; 73, 481-483.
- Duan L, Ma B, Liang Y ve diğ. Cytokine networking of chondrocyte dedifferentiation in vitro and its implications for cell-based cartilage therapy. *Am J Transl Res*, 2015;7(2):194-208.
- ELISA: Direct and Indirect “Sandwich” ELISA General Protocols. Wuhan EIAab Science Co.,Ltd. ağ sitesi. Son erişim tarihi: 04.12.2015. <http://www.eiaab.com/info/detail/456>
- Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, 2007; 35(4): 495–516.
- Everts PAM, Knape TA, Weibrich G ve diğ. Platelet-Rich Plasma and Platelet Gel: A Review. *The Journal of The American Society of Extra-Corporeal Technology*, 2006; 38, 174-187.
- Fafián-Labora J, Fernández-Pernas P, Fuentes I ve diğ. Influence of age on rat bone-marrow mesenchymal stem cells potential. *Scientific Reports*, 2015; 5:16765.
- Feig C, Peter ME. How apoptosis got the immune system in shape. *Eur. J. Immunol*, 2007. 37: S61–70.
- Fernandez ML, Iglesias MM, Biron VA ve diğ. Protective effect of prolactin and placental lactogen on NO-induced Nb2 lymphoma cell apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003; 416, 249–256.
- Fiers W, BeyaertR, Declercq W ve diğ. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*, 1999;18(54):7719-30.
- FLAG tag Peptide. ApexBio Technology ağ sayfası. Son erişim tarihi: 01.03.2016. <http://www.apexbt.com/flag-peptide.html>
- Flint DJ, Boutinaud M, Whitelaw CBA ve diğ. Prolactin inhibits cell loss and decreases matrix metalloproteinase expression in the involuting mouse mammary gland but fails to prevent cell loss in the

mammary glands of mice expressing IGFBP-5 as a mammary transgene. *J Molr Endocrinol*, 2006; 36, 435–44.

For 6 well plates. Bar Naor Ltd ağ sitesi. Son erişim tarihi: 18.05.2016.
http://barnaorcom.ipage.com/index.php?route=product/category&path=2390_2499_2500

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A ve diğ. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*, 2000; 80(4), 1523-1631.

Fresno Vara JA, Cáceres MAD, Silva A ve diğ. Src Family Kinases Are Required for Prolactin Induction of Cell Proliferation. *Mol Biol Cell*, 2001; 12(7): 2171–2183.

Gafni Y, Turgeman G, Liebergal M ve diğ. Stem cells as vehicles for orthopedic gene therapy. *Gene Therapy*, 2004; 11, 417-426.

Gelse K, von der Mark K, Aigner T ve diğ. Articular Cartilage Repair by Gene Therapy Using Growth Factor–Producing Mesenchymal Cells. *Arthritis & Rheumatism*, 2003; 48(2), 430-441.

Geneticin. MP Biomedicals ağ sitesi. Son erişim tarihi 20.12.2015.
<http://www.mpbio.com/product.php?pid=02158782&country=215>

Gnecchi M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Methods Mol Biol*, 2009; 482:281-94

Goffin V, Binart N, Touraine P ve diğ. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu Rev Physiol*, 2002; 64:47-67.

Goggs R, Carter SD, Schulze-Tanzil G ve diğ. Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. *The Veterinary Journal*, 2003; 166, 140-158.

Hanspers K, Digles D ve diğ. Prolactin Signaling Pathway (*Homo Sapiens*). WikiPathways ağ sitesi. Son erişim tarihi: 08.11.2015 <http://www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP2037>

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000; 407:770–6.

Henson PM, Hume DA. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol*, 2006; 27(5):244-50

Hubka KM, Dahlin RL, Meretoja VV ve diğ. Enhancing Chondrogenic Phenotype for Cartilage Tissue Engineering: Monoculture and Coculture of Articular Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014; 20(6): 641–654.

Hui JHP, Azura M, Ortho MS ve diğ. Review Article: Stem Cell Therapy in Orthopaedic Surgery: Current Status and Ethical Considerations. *Malaysian Orthopaedic Journal*, 2009; 3(1), 4-12.

İnan S, Özbilgin K. Kök Hücre Biyolojisi. *Sağlıkta Birlik*, 2009; 1(5), 11-23.

Induction of apoptosis in cells. Abcam ağ sitesi. Son erişim tarihi: 01.03.2014
<http://www.abcam.com/protocols/induction-of-apoptosis-in-cells>

- Introduction to Cell Cycle Analysis. Rabinovitch P. Phoenix Flow Systems, Inc ağ sitesi. Son erişim tarihi: 24.04.2015. <http://www.phnxflow.com/Introduction%20to%20Cell%20Cycle%20Analysis.pdf>
- Ivkovic A, Hudetz D, Vukasovic A ve diğ. Gene Therapy in Articular Cartilage Repair. Emans PJ, Peterson L (Ed) *Developing Insights in Cartilage Repair*. London, 2014.
- Jones CH, Hill A, Chen M ve diğ. Contemporary Approaches for Nonviral Gene Therapy. *Discov Med*, 2015;19(107):447-54.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972;26(4):239-57.
- Kim KT, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, 2010; 397:3173–3178
- King JA, Miller WM. Bioreactor Development for Stem Cell Expansion and Controlled Differentiation. *Curr Opin Chem Biol*, 2007; 11(4): 394–398.
- Knoepfler PS. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells*, 2009; 27: 1050–1056.
- Kochendoerfer SK, Krishnan N, Buckley DJ ve diğ. Prolactin regulation of Bcl-2 family members: increased expression of bcl-x_L but not mcl-1 or bad in Nb2-T cells. *J Endocrinol*, 2003; 177,265–273
- Kon E, Filardo G, Dronic M ve diğ. Non-surgical treatment of early knee osteoarthritis. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 2012; 20, 436-449.
- Kulkarni GV, McCulloch CA. Serum deprivation induces apoptotic cell death in a subset of Balb/c 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci*, 1994;107 (Pt 5):1169-79.
- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N ve diğ. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol*, 2003;171:4672–9.
- Lakshmi U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood Reviews*, 2005; 19, 29-38.
- Lecture 6: Antimicrobial Drugs. Portland Community College ağ sitesi. Son erişim tarihi: 02.12.2015. spot.pcc.edu/~jvlope/b/bi234/lec/6_antimicrobials/
- Lee RC, Walters JA, Reyland ME ve diğ. Constitutive activation of the prolactin receptor results in the induction of growth factor-independent proliferation and constitutive activation of signaling molecules. *J Biol Chem*, 1999; 9;274(15):10024-34.
- Liseth K, Abrahamsen JF, Bjørsvik S ve diğ. The viability of cryopreserved PBPC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft. *Cytotherapy* 7(4):328–333; 2005.
- Longo UG, Petrillo S, Franceschetti E ve diğ. Stem Cells and Gene Therapy for Cartilage Repair. *Stem Cells International*, 2012, 9 sayfa (<http://dx.doi.org/10.1155/2012/168385>).
- Lotz M, Hashimoto S, Kühn K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 1999; 7, 389-391.

- Manning CN, Schwartz AG, Xie J ve diğ. Controlled delivery of mesenchymal stem cells and growth factors using a nanofiber scaffold for tendon repair. *Acta Biomaterialia*, 2013; 9, 6905-6914.
- Marlovits S, Hombauer M, Truppe M ve diğ. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br*, 2004;86(2):286-95.
- Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase- independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*, 2005;22:355–70.
- Matera L. Endocrine, paracrine and autocrine actions of prolactin on immune cells. *Life Sci*, 1996; 59(8):599-614.
- Matthews K. An Orverview of Stem Cells. Rice Üniversitesi OpenStax CNX ağ sitesi. Son erişim tarihi: 05.02.2014 <http://cnx.org/content/m14829/latest/>
- Mesenchymal Stem Cell Antibodies. AbD Serotec ağ sitesi. Son erişim tarihi: 06.02.2014 <http://www.abdserotec.com/mesencyhmal-stem-cell-antibodies.html>
- Nemes Z, Jr, Friis RR, Aeschlimann D, ve diğ. Expression and activation of tissue transglutaminase in apoptotic cells of involuting rodent mammary tissue. *Eur J Cell Biol*, 1996;70:125–33.
- Nery AA, Nascimento IC, Glaser T ve diğ. Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry A*, 2013;83(1):48-61.
- Neumann AJ, Alini M, Archer CW ve diğ. Chondrogenesis of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Is Modulated by Complex Mechanical Stimulation and Adenoviral-Mediated Overexpression of Bone Morphogenetic Protein 2. *Tissue Engineering*, 2012; 19(11-12), 1285-1294.
- Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001;41:367–401.
- O’Shea JJ, Laurence A, McInnes B. Back to the future: oral targeted therapy for RA and other autoimmune diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 2013; 9, 173–182.
- Orbach H, Shoenfeld Y. Hypreprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 2007; 6, 537-542.
- Orth P, Rey-Rico A, Vankatesan JK ve diğ. Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 2014; 7, 1-17.
- Osborne BA. Apoptosis and the maintenance of homoeostasis in the immune system. *Curr Opin Immunol*. 1996;8:245–54.
- PCR Using Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (M0491). New England Biolabs ağ sitesi. Son erişim tarihi: 04.12.2015. <https://www.neb.com/protocols/2013/12/13/pcr-using-q5-high-fidelity-dna-polymerase-m0491>
- Peeva E, Zouali M. Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes. *Immunology Letters*, 2005; 101, 123-143.

- Pender MP. Activation-induced apoptosis of autoreactive and alloreactive T lymphocytes in the target organ as a major mechanism of tolerance. *Immunol Cell Biol*, 1999;77(3):216-23.
- Perry BC, Zhou D, Wu X ve diğ. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods*, 2008;14(2):149-56.
- pFLAG-CMV™-3 Expression Vector. Sigma-Aldrich ağ sitesi. Son erişim tarihi 03.12.2015. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/e6783dat.pdf>
- Potter H, Heller H. Transfection by Electroporation. *Curr Protoc Mol Biol*. 2010; 92:9.3.1-9.3.10.
- PRL Gene. Weizmann Institute of Science, Gene Cards ağ sitesi. Son erişim tarihi: 03.12.2015. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PRL>
- PRL prolactin [Homo sapiens (human)]. National Center for Biotechnology Information (NCBI) ağ sitesi. Son erişim tarihi: 03.12.2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5617>
- Prolactin Signaling. QIAGEN Sample and Assay Technologies ağ sitesi. Son erişim tarihi: 05.02.2014 <http://www.qiagen.com/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details.aspx?pwid=371>
- Rasini V, Dominici M, Kluba T ve diğ. Mesenchymal stromal/stem cells markers in the human bone marrow. *Cytotherapy*, 2013;15(3):292-306.
- Renahan AG, Bach SP, Potten CS. The relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in the intestine. *Can J Gastroenterol*. 2001; 15(3):166-76.
- Rha D, Park GY, Kim YK ve diğ. Comparison of the therapeutic effects of ultrasound-guided platelet-rich plasma injection and dry needling in rotator cuff disease: a randomized controlled trial. *Clinical Rehabilitation*, 2012; 27(2), 113-122.
- Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 2012; 481, 295-305.
- S. Bar-Nun, Y. Shneyour, J.S. Beckmann. G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 741 (1983), pp. 123–127
- Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K ve diğ. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*, 2005; 52: 2521–2529.
- Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 2000;407:784–8
- Schmitt A, van Griensven M, Imhoff AB ve diğ. Application of Stem Cells in Orthopedics. *Stem Cells International*, 2012, 11 sayfa (<http://dx.doi.org/10.1155/2012/394962>).
- Serra M, Brito C, Alves e PM. Bioengineering strategies for stem cell expansion and differentiation. *Canal BQ*, 2010; 7, 30-37.
- Shahdadfar A, Løken S, Dahl JA ve diğ. Persistence of collagen type II synthesis and secretion in rapidly proliferating human articular chondrocytes in vitro. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(12):1999-2007.
- Shelly S, Boaz M, Orbach H. Prolactin and autoimmunity, *Autoimmunity Reviews*, 2012; 11, A465-A470.

- Sibov TT, Severino P, Marti LC ve diğ. Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation. *Cytotechnology*, 2012;64(5):511-21.
- Sundman, E. A., Cole B. J., Karas V ve diğ. The Anti-inflammatory and Matrix Restorative Mechanisms of Platelet-Rich Plasma in Osteoarthritis. *The American Journal of Sports Medicine*, 2013; 42(1), 35-41.
- T4 DNA Ligase Product Information. Thermo Scientific ağ sitesi. Son erişim tarihi: 04.12.2015. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011990_T4_DNA_Ligase_5_Weiss_200_Weiss_U_UG.pdf
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006; 25;126(4):663-76.
- Teilum K, Hoch JC, Goffin V ve diğ. Solution Structure of Human Prolactin. *J Mol Biol*, 2005; 351, 810-823.
- Terasaki Y, Yahiro K, Pacheco-Rodriguez G ve diğ. Effects of Prolactin on TSC2-Null Eker Rat Cells and in Pulmonary Lymphangioliomyomatosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2010; 182, 531-539.
- Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE ve diğ. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2010; 15, 27-34.
- Tm Calculator. New England Biolabs ağ sitesi. Son erişim tarihi: 04.12.2015. <http://tmcalculator.neb.com/#/>
- Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol*, 1997;25(1):82-8.
- Vats A, Tolley NS, Buttery LDK ve diğ. The stem cell in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br*, 2004; 86-B(2), 159-164.
- Vilen BJ, Rutan JA. The regulation of autoreactive B cells during innate immune responses. *Immunol Res*, 2008; 41(3): 295–309.
- Weimann E, Baixeras E, Zamzami N ve diğ. Prolactin blocks glucocorticoid induced cell death by inhibiting the disruption of the mitochondrial membrane. *Leukemia Research*, 1999; 23, 751-762.
- Wikipedia. Stem Cell Treatments. Son erişim tarihi: 05.02.2014. http://en.wikipedia.org/wiki/Stem_cell_therapy
- Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011; 30:87.
- Wood W, Turmaine M, Weber R ve diğ. Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development*, 2000;127(24):5245-52.
- Yang YH, Lee AJ, Barabino GA. Coculture-Driven Mesenchymal Stem Cell-Differentiated Articular Chondrocyte-Like Cells Support Neocartilage Development. *Stem Cells Transl Med*, 2012; 1(11): 843–854.

Yu-Lee LY. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res*, 2002; 57:435-55.

Zamli Z, Sharif M. Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis? *International Journal of Rheumatic Diseases*, 2011; 14,159–166.

Zanini C, Bruno S, Mandili G ve diğ. Differentiation of mesenchymal stem cells derived from pancreatic islets and bone marrow into islet-like cell phenotype. *PLoS One*, 2011;6(12):e28175

Zermeño C, Guzman-Morales J, Macotella Y ve diğ. Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *J Endocrinol*, 2006; 189, R1–R8.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H ve diğ. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 2004; 7(2): 211-228.



EKLER

Ek 1: Etik Kurul Değerlendirme Formu



KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMA ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Birimi Umutbeye Yerleşkesi /KOCAELİ
TELEFON	0282 303 71 64
FAKS	0282 303 74 63
E-POSTA	etikkurul@kocaeli.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	In Vitro Koşullarda Apoptoza Yönlendirilen Kondrositlerin Prolaktin Geni Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelere Yanıtı		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU	KOU KAEK 2014/195		
	EUDRACT NUMARASI			
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	Yrd. Doç. Dr. Gülçin GACAR		
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	Klinik Mikrobiyoloji		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Yrd. Doç. Dr. Gülçin GACAR, Biyomühendis Nilbeste Bekiroğlu		
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Klinik Mikrobiyoloji		
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ KÖK HÜCRE VE GEN TEDAVİLERİ ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ	TÜBİTAK		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ			
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Deneysel		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>	-
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>	-
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>	TÜBİTAK tarafından karşılanacaktır.
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>	-
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>	-
	İLAN	<input type="checkbox"/>	-
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>	-
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>	-
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>	-
	DİĞER	<input type="checkbox"/>	-

Ek 1: Etik Kurul Değerlendirme Formu (Devam)

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:	KOU KA EK 2014/195	Tarih : 24.06.2014
	Yrd. Doç. Dr. Gülcin GACAR' ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul Üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiş ve onaylanmıştır.		

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420), Helsinki Bildirgesi (2008), İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu (10 Aralık 2010), ICH/GCP-Guideline for Good Clinical Practice (10 Haziran 1996) İnsan Denekleri İçeren Biyomedikal Araştırmaların Uluslar arası Rehber Kuralları (CIOMS, 2002), Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (10 Mart 2011/6212), Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi: İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesi (4 Nisan 1997), Ek Madde -10 (6 Nisan 2011, 6225)
---------------	---

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: PROF. DR. NERMİN ERSOY
ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza
Prof.Dr. Nermin ERSOY Başkan	Tıp Tarihi ve Etik	KOU Tıp Fak. Tıp Tarihi ve Etik AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	N. Ersoy
Prof.Dr. Dilək URAL Başkan Yrd.	Kardiyoloji	KOU Tıp Fak. Kardiyoloji AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ural
Prof.Dr. B. Faruk ERDEN Üye	Farmakoloji	KOU Tıp Fak. Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Erden
Prof.Dr. Gülcin TÜRKER Üye	Pediyatri	KOU Tıp Fak. Çocuk Sağlığı ve Hst. AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Türker
Prof.Dr. Yavuz GÜRKAN Üye	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	KOU TF Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Gürkan
Doç.Dr. Hale M. KIR Üye	Biokimya	KOU Tıp Fak. Biokimya AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Kir
Yrd. Doç.Dr. Ayşe KARSON Raporör	Fizyoloji	KOU Tıp Fak. Fizyoloji AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Karson
Uzm.Dr. Murat GÖVEN Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Derince Eğt. ve Arş. Hastanesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Goven
Uzm.Dr. Berna A. ŞERİFİ Üye	Halk Sağlığı	İzmit 1 Nolu AÇSAP	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Serifi
Ersayın İŞİK Üye	Avukat	Kocaeli Barosu	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Isik
Yasemin ÜLSOY Üye	Hasta Hakları Temsilcisi	Sivil Üye	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ulsay

* :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Nilbeste BEKİROĞLU

Doğum yeri ve tarihi: TRABZON /02.09.1988

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

Çalıştığı kurum: Kocaeli Üniversitesi

İletişim adresi:.....

Telefon:+.....

E-posta adresi:.....

Eğitim

2012- 2016	Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Anabilim Dalı Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı (Yüksek Lisans)
2007-2012	Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya – Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Anabilim Dalı (Lisans)
2002-2005	Trabzon Yomra Fen Lisesi (Lise)

Yabancı Dili: İngilizce (2016 YDS-Bahar Dönemi Puan: 82.50)

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Derneği

Bilimsel Etkinlikler

Çalışılan Projeler

TÜBİTAK-114S154	<i>In Vitro</i> Koşullarda Apoptoza Yönlendirilen Kondrositlerin Prolaktin Geni Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelere Yanıtı (Bursiyer, 01.10.2014-01.09.2015)
-----------------	--

TÜBİTAK-112S086 Multiple Myeloma Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Bu Hücrelerden Elde Edilen Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşma Potansiyelinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi (Bursiyer, 01.10.2012-01.10.2014)

Alınan burslar

TÜBİTAK-114S154 *In Vitro* Koşullarda Apoptoza Yönlendirilen Kondrositlerin Prolaktin Geni Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelere Yanıtı (Bursiyer, 01.10.2014-01.09.2015)

TÜBİTAK-112S086 Multiple Myeloma Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Bu Hücrelerden Elde Edilen Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşma Potansiyelinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi (Bursiyer, 01.10.2012-01.10.2014)

Bildiriler

7 - 9 Mayıs 2015, Romanya European Biotechnology Congress 2015 (EUROBIOTECH 2015) “Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells: A New Vehicle for Producing Prolactin” (Poster Bildirisi)

28 Haziran – 1 Temmuz 2016, İsveç TERMIS-EU 2016 “Short term response of mesenchymal stem cells against chondrocyte apoptosis.” (Poster Bildirisi)

28 Haziran – 1 Temmuz 2016, İsveç TERMIS-EU 2016 “Resveratrol alleviates plasma cytokine productin in chronic psychological stress: Relationship with cardiovascular disease.” (Poster Bildirisi)

Yayınlar

Bekiroglu N, Gacar G, Duruksu G. Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells: A New Vehicle for Producing Prolactin. *Journal of Biotechnology*, 2015;208, S120. (Abstract).

TEZ DENETLEME LİSTESİ

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazının yönüne dikkat!) ad, program,yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Roma rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde basıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde basıldı.
- Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar abecesel sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.