ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Semiha DOĞAN

SIÇAN KEMİK İLİĞİNDEN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNE AİT KİSSPEPTİN VE NÖROKİNİN GEN EKSPRESYONLARININ PASAJ SAYISIYLA İLİŞKİSİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2021

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇAN KEMİK İLİĞİNDEN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNE AİT KİSSPEPTİN VE NÖROKİNİN GEN EKSPRESYONLARININ PASAJSAYISIYLA İLİŞKİSİ

Semiha DOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez ……/…../ 2021 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

…….	…….
Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ	Prof. Şule SultanMENZİLETOĞLU YILDIZ
DANIŞMAN	ÜYE

……
Dr. Öğr. Üyesi Merve ÇAPKIN YURTSEVER
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No:

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇAN KEMİK İLİĞİNDEN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNE AİT KİSSPEPTİN VE NÖROKİNİN GEN EKSPRESYONLARININ PASAJSAYISIYLA İLİŞKİSİ

Semiha DOĞAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
Yıl: 2021, Sayfa: 57
Jüri : Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
: Prof.Şule MENZİLETOĞLU YILDIZ
: Dr. Öğr.Üyesi Merve ÇAPKIN YURTSEVER

Bu çalışmada sıçan kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücresine ait kisspeptin ve nörokinin gen ekspresyonlarının pasaj sayısıyla ilişkisini inceledik. Yapılan bu çalışmada öncelikle sıçan kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerinin hücre kültür ortamında gelişim evresi takip edilmiş ve 6.pasaja kadar elde edilen hücreler pasajlanmıştır.Daha sonraki aşamada ise RNA izolasyonu yapılmıştır. cDNA eldesi ve Kiss-1,TAC2,TACR2 gen ekspresyonunun tayini yapılmıştır.Ve son olarak iseakım sitometrisinde CD90,CD45,CD29 antikorlarını kullanarak elde ettiğimiz kök hücrenin mezenkimal kök hücre olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kisspeptin, Nörokinin, Kiss-1,TAC2,TACR2

ABSTRACT

MSc THESIS

THE RELATIONSHIP OF KISSPEPTIN AND NEUROKINI GENE EXPRESSIONS OF MESENCHIMAL STEM CELLS OBTAINED FROM RAT BONE MARROW AND PASSAGE NUMBER

Semiha DOĞAN

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisors : Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
Year: 2021, Pages: 57
Jury : Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
: Prof.Şule MENZİLETOĞLU YILDIZ
: Asst. Prof. Dr. Merve ÇAPKIN YURTSEVER

In this study, kisspeptin and neurokinin gene expressions of mesenchymal stem cell obtained from bone mouse were observed with the number of passages.In this study, firstly, the developmental stage of mesenchymal stem cells obtained from rat bone marrow was followed in the cell culture medium and the cells obtained until the 6th passage were passaged.In the next step, RNA isolation was performed. cDNA extraction and Kiss-1,TAC2,TACR2 gene expression were determined. And finally, the stem cell obtained by using CD90, CD45, CD29 antibodies in flow cytometry was determined to be mesenchymal stem cell.

Keywords: Kisspeptin, Neurokinin, Kiss-1,TAC2,TACR2

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Kök hücreler; sınırsız çoğalabilme, kendilerini yenileyebilme, kendilerinden başka hücrelere farklılaşabilme, hasarlı dokuya verildiğinde dokuyu onarabilme özellikleri ile tanımlanan hücre tipidir. Bol miktarda bulunmaları, kolay elde edilebilmeleri, birçok hücre tipine farklılaşarak çoğalabilmeleri, otolog veya allojenik alıcılara güvenli ve etkin bir şekilde nakledilebilmeleri nedeniyle rejeneratif tıp uygulamalarında tercih edilmektedir.(Fortier,2005)Kök hücrelerfarklılaşma özelliğine göre kök hücreler 4 farklı hücre türüne ayrılmaktadır. Bunlar Multipotent Kök Hücre, Unipotent Kök Hücre, Totipotent Kök Hücre, ve Pluripotent Kök Hücredir. Eldeedildikleri kaynaklara göre embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.(Fortier,2005)

Totipotent kök hücre; embriyoya ait, ilerleyen safhalarda tüm doku ve organların kaynağını oluşturan kök hücrelerdir.

Pluripotent kök hücre; üç germ tabakasına (ektoderm, mezoderm, endoderm) ait hücre ve dokulara farklılaşma yeteneği olan kök hücrelerdir

Multipotent kök hücre; tek bir germ tabakasına farklılaşmak üzere programlanmış kök hücrelerdir.Unipotent kök hücre; yalnızca tek hücre tipine dönüşebilen kök hücrelerdir. (Can,2008)

Erişkin kök hücreleri doku ya da organlarda bulunan, kendini kopyalama özelliğine sahip, dokudaki bazı ya da tüm özelleşmiş hücrelere dönüşme yeteneğine sahip, farklanmamış hücrelere denir. Bunlar temel olarak hemotopoietik kök hücre ve mezenkimal kök hücre olmak üzere ikiye ayrılır.

Hematopoetik kök hücreler;kemik iliği, çevre kanı ve göbek kordon kanında bulunan, yaşam boyu kendi kendini yenileme ve farklı hücrelere dönüşebilme kapasitesine sahip hücrelerdir. Bu hücreler kırmızı kan hücrelerine (eritrosit), beyaz kan hücrelerine (lökosit) ve trombositlere dönüşebilen kan hücreleridir.(Hu ve ark,2013)

Mezenkimal kök hücreler; Mezoderm tabakasından köken almakla birlikte vücudun bazı bölgelerinde nöralkrista kaynaklı mezenkim dokudan da gelişirler.Kemik iliği, adipoz doku, göbek kordonu, kordon kanı, karaciğer, beyin,dişpulpası, deri ve fetal dokularda bulunan farklılaşmamış, çoğalma kapasitesi yüksek, kendini farklılaşmadan yenileyebilme özelliğine sahip, mezoderm farklılaşma yetisi çok fazla olan kök hücrelerdir[3,4].Mezenkimal kök hücreler kemik, kıkırdak, kas gibi farklı hücre tiplerine dönüşüm kapasitelerinin yanında ürettikleri birçok büyüme faktörü ve sitokinler nedeni ile immün baskılayıcı ve trofik etki potansiyeline de sahiptir. (Kem ve ark,2006)

En çok kullanılan mezenkimal kök hücre kaynakları; kemik iliği, adipoz doku ve kordon kanı olmakla birlikte yoğunluklu olarak kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı olduğu görülmektedir.Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma yeteneklerinin fazla olması, migrasyon özelliği, hasarlı doku tamirine katkı sağlaması,hasarlı olan hücrelerle füzyon yeteneğinin olması, genetik geçmişlerinin kararlı olması, tümör oluşturma riskinin diğer kök hücre türlerine göre az olması birçok hastalığın klinik tedavisinde ön plana çıkmasını sağlamıştır.(Nauta ve Fibbe,2007) Bu hastalıklardan bir tanesi puberte bozukluklarıdır. Puberte dönemine geçişte en etkin rol oynayan kisspeptin ve nörokinin protein aileleridir. Kisspeptinler, Kiss-1 geni tarafından transkribe edilen bir öncül proteinden türeyen, hipotalamo-hipofizer-gonadal aksı etkileyerek puberte ve fertilitede önemli roller aldıkları düşünülen, farklı aminoasit uzunluklarındaki peptidlerdir.Hipotalamo-hipofizer-gonadal aks, üreme yeteneğinin kazanılması ve sürdürülmesine aracılık eden, diğer sistemlerle kompleks ilişkileri olan merkezi bir sistem olarak karşımıza çıkmaktadır. Puberte sırasında bu sistemin nasıl aktive olduğu uzun yıllar gizemini korumuş ve anlaşılamayan yönleri ile popüler bir araştırma alanı olma özelliğini hala yitirmemiştir. Günümüzde, kisspeptinlerinhipotalamik salınımları sonucunda, gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) etkinliğinin artmasının puberte başlangıcındaki tetikleyici mekanizmanın önemli bir parçası olduğuna inanılmaktadır. (Seminara ve ark,2003

) (Jyasena ve ark,2009).Hipotalamusta GnRH salınımı ile ilgili olduğu belirlenen bir diğer protein ise Neurokinindir.Bu sinyal peptiditaşikinin ailesinin bir ailesi olup omurgalı ve omurgasızlarda hücre içi sinyalizasyonda görev alır.İnsanda en iyi bilinen taşikininlersubstance P(SP),nörokinin A (NKA) ve nörokinin B'dir(NKB) ve bunların hepsi yaygın olarak merkezi sinir sisteminde sentezlenirler.Substance P ve NKA'nın genelde nosisebsiyonda fonksiyonel olduğu düşünülürken, insan üreme ekseninde rol oynadığı belirlenen NKB ve reseptörü NK3R'yi kodlayan sırasıyla TAC3 ve TACR3 genleri insan ve kemirgenlerin (fare homoloğu TAC2 ve TACR2) merkezi sinir sisteminde yaygın olarak eksprese edildiği gibi böbrek,iskeletkası,akciğer ve diğer dokularda da sentezlenebilmektedir.

Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda NKB agonistininkisspeptin ekspresyonunu arttırdığı ve dolayısıyla GnRH ve akabininde LH salınımını etkilediği gösterilmiştir. Fakat TAC3 ve TACR3'ün fonksiyonu hakkındaki asıl gelişme Topaloğlu ve grubunun çalışmalarıyla ortaya çıkmıştır.Bu grup TAC3 ve TACR3 mutasyonu olan bir hastada hipogonadotropikhipogonadizm ve infertilite gözlendiği dolayısıyla bu proteinlerin pubertenin kontrol noktasında anahtar rol oynadığını belirlemişlerdir.(Topaloğlu ve Koton,2005) (Topaloğlu ve Semple,2011)

Bu çalışmada ki amacımız kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin pubertal bozuklukların tedavisine destek olup olmayacağını araştırmaktır.

Çalışmamızda öncelikle sıçan kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin hücre kültürleri yapılmış olup 5.ve 6. pasajlarında kisspeptin ve nörokininin gen ekspresyonlarına bakılmıştır. Sıçan kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin akış sitometrisinde CD90,CD45,CD29 antikorları kullanılarak mezenkimal kök hücre olduğu tespit edilmiştir. Daha sonrasında ise real time PCR'da kisspeptin ve nöroninin pasaj sayısıyla ilişkisi kıyaslanmıştır.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, yardımlarını, zamanlarını ve hoşgörülerini eksik etmeyen, saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. M. Bertan YILMAZ'a, tezimin tüm aşamalarında yanımda olan ve her türlü yardımı gösteren ve Hale ÖKSÜZ'e, bu süreçte yardımlarını esirgemeyen laboratuvar çalışmalarım sırasında her türlü desteği gösteren ve Arş.Gör.Dr. Seda ILGAZ'a, ve yüksek lisans boyunca yanımda olan SEDA AKBOLAT ve SHABNAM MOOHARRAMJOODİ' e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, sonsuz sevgi ve desteklerini her daim hissettiren aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR VII
İÇİNDEKİLER VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ X
SİMGELER VE KISALTMALAR XII
1. GİRİŞ 1
1.1. Kök Hücre Genel Bilgi 2
1.2. Kök Hücre Türleri 4
1.2.1. Farklılaşma Özellerine Göre Kök Hücreler 5
1.2.2. Elde Edildikleri Kaynağa Göre Kök Hücreler 5
1.2.2.1. Totipotent Kök Hücre 5
1.2.2.2. Pluripotent Kök Hücre 5
1.2.2.3. Unıpotent Kök Hücre 6
1.2.2.4. Multipotent Kök Hücre 7
1.2.3. Elde Edildikleri Kaynağa Göre Kök Hücreler 7
1.2.3.1. Embriyonik Kök Hüre 7
1.2.3.2. Yetişkin Kök Hücre 7
1.2.3.2.(1). Hematopoetik Kök Hücreler 8
1.2.3.2.(1).a. Mezenkimal Kök Hücre 9
1.2.3.2.(1).b. Mezenkimal Kök Hücrelerin Avantajları Ve Dezavantajları 11
1.3. Kisspeptin 13
1.3.1. Kisspeptinlerin Etki Mekanizması 15
1.3.2. Kisspeptin ve Puberte 17
1.4. Nörokinin 17

2 .ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 21
3. MATERYAL METOD 25
3.1. Materyal 25
3.1.1. Kullanılan cihazlar 25
3.1.2. Kullanılan Malzemeler 25
3.2. Metod 26
3.2.1. Hücre Kültürü 26
3.2.2. Akım sitometrisi İle MKH Analizi 28
3.2.3. MKH'lerde Kisspeptin, Nörokinin Ve Reseptörlerinin Ekspresyonu 29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 31
4.1. Bulgular 31
4.2. Tartışma 38
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 49
KAYNAKLAR 51
ÖZGEÇMİŞ 57

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Kök Hücre Bölünme Evreleri 4
Şekil 1.2. Kök hücrelerin türetilmesi 6
Şekil 1.3. Multipotent özelliğe sahip hematopoietik kök hücrelerin farklı hücre tiplerinioluşturma şekilleri 9
Şekil 1.4. MSC çok satırlı farklılaşma potansiyeli 10
Şekil 1.5. Kisspeptin çeşitleri 14
Şekil 1.6 . Kisspeptinin etkimekanizması 16
Şekil 3.1. Sıçan kemik iliğinden hücrelerin toplanması 27
Şekil 3.2. Hücre kültür aşaması 27
Şekil 3.3. RNA izolasyonu aşaması 29
Şekil 4.1. Granülütesi side scatter (SSC) ve büyüklüğü forward scatter (FSC) olarak P_5 de hücrenin genel popülasyonu akım sitometrisinde değerlendirildi. 31
Şekil 4.2. Pasaj 5'te Akım sitometrisinde kullandığımız pozitif yüzey belirteçlerinin (CD90,CD29) mezenkimal kök hücrede (MSC) olduğu saptanmıştır. 32
Şekil 4.3. Pasaj 5'te akım sitometrisinde kullanılan CD45 ve CD29 yüzey markerlerinin hücre populasyonu yönünden yoğun olduğu tespit edilmiştir. 33
Şekil 4.4. Pasaj 6'da granülüte side scatter (SSC) ve büyüklüğü forward scatter (FSC) olarak P_6 da hücrenin genel popülasyonu akım sitometrisinde değerlendirildi. 34
Şekil 4.5. Pasaj 6'da akım sitometrisinde kullandığımız pozitif yüzey belirteçlerinin (CD90,CD29) mezenkimal kök hücrede (MSC) olduğu saptanmıştır. 35

Şekil 4.6. Pasaj 6'da akım sitometrisinde kullanılan CD45 ve CD29 yüzey markerlerinin hücre populasyonu yönünden yoğun olduğu tespit edilmiştir. 36
Şekil 4.7. Kisspeptin reseptör geni için P_4 grubu referans alındığında P_6 ve P_7 örneklerinin katlı değişimleri 37
Şekil 4.8. Taşikinin de P_4 grubu referans alındığında P_5 örneğinin katlı değişimi 37
Şekil 4.9. Taşikinin reseptör geninde P_5 grubu referans alındığında P_6 örneklerinin katlı değişimi 38

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

LH	: Lütienleştirici hormon
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
cDNA	: Komplementer deoksiriboz nükleik asit
NK	: Nörokinin
SSC	: Side Scatter
FSC	: Forward Scatter
TNF	: Tümör nekroz faktör
SS	: Supressör sequence
IL1a	: İnterlökin 1a
IL1b	: İnterlökin 1b
IL	: İnterlökin
SCA1	: Kök hücre antijeni 1
CD	: Cluster of differantion

1. GİRİŞ

Modern hücre teorisinin öncülerinden ve hüre patolojisinin kurusu olan Rudolf Ludwig Karl Virchow (1821-1902) her bir hücrenin başka bir hücreden oluştuğu düşüncesini ortaya koyduğu tezinde ilk defa 'köklülük' (stemness) terimini kullanmıştır. (Karakaya, 2013)

Alman biyolog Ernst Haeckel tarafından 1868 yılında kök hücre terimi ilk defa bilimsel literatüre girmiştir.

Darwin'in yaptığı evrim teorisine destek veren Haeckel filogenetik ağaç çizmiştir. Bunu çizmesindeki amaç ise organizmanın evrimini açıklamaktır ve çizdiği bu ağaca ise 'kök ağacı'anlamına gelen 'Stammzelle' adını vermiştir.

İlerleyen zamanlarda Haeckel organizmayı meydana getirecek döllenmiş yumurtaya da kök hücre adını vermiştir. (Karakaya, 2013)

İnsan kanı üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda kök hücre çalışmaları giderek hız kazanmıştır.

Franz Ernst Christian Neumann (1834-1918) kemik iliği üzerine bir takım çalışmalar yapıyor ve bunun neticesinde akyuvarlara benzer hücrelerin varlığını ortaya koymuştur. Daha sonra ise kemik iliğinin kan hücrelerini meydana getiren organ olduğu tezini ortaya koymuştur.

Julius Friedrich Cohnheim (1839–1884) ise yaraları iyileştirebilen hücrelerin kandan yani kemik iliğinden meydana geldiğini ortaya çıkarmıştır.(Karakaya, 2013)

Pappenheim (1870—1916)'in alyuvarlar ile yaptığı çalışmalar neticesinde kemik iliğinde yaptığı faaliyetler sonucu kök hücreye benzeyen progenitor hücrelerin varlığını tespit etmiştir.(Brunt ve ark, 2012)

Daha sonra ise kan fizyolojisi üzerine yoğunlaşan Alexander Alexandrowitsch Maximow (1874—1928) 1909 yılında hematopoetik kök hücre adını verdiği ve yaralanma sırasında kandan yaralı dokuya taşınabilen kan hücrelerinin varlığını ortaya koymuştur. Bu hücreler hasar gördükleri yere

gittiklerinde ihtiyaç duyulan hücrelere farklılaşabilmektedirler. (Brunt ve ark, 2012)

1.1. Kök Hücre Genel Bilgi

Kök hücreler; kendilerini yenileyebilme, sınırsız çoğalabilme, kendilerinden başka hücrelere farklılaşabilme, hasarlı dokuya verildiğinde hasarlı yapıyı onarabilme özellikleri ile tanımlanan hücre tipidir. Kök hücreler bol miktarda bulunmaları, kolay elde edilebilmeleri, birçok hücre tipine farklılaşarak çoğalabilmeleri, alıcılara güvenli ve etkin bir şekilde nakledilebilmeleri nedeniyle rejeneratif tıp uygulamalarında tercih edilmektedir.(Kolios ve Moodley, 2013)

Kök hücreler vücutta bulunan 200 ve daha fazla hücre tipleri için öncü hücreler olarak kabul edilmektedir.Kök hücrelerin kendilerini yenileyebilme potansiyelleri hücrenin farklılaşmama özelliğini muhafaza ederek sayısız hücre döngülerinden geçmesini ifade etmektedir.(Shikhaliyeva, 2015)

Kök hücrelerin temel özellikleri farklı hücrelere dönüşebilme ve çok hızlı bölünüp çoğalabilme (proliferasyon), kendilerini yenileyebilme (rejenerasyon) özellikleriyle diğer hücrelerden ayrılmaktadır.(Kolios ve Moodley, 2013)

Farklı hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğine sahip kök hücrelerin bu kadar önemli olmasının nedeni ; laboratuvar çalışmalarında bu hücrelerin istenilen hücre türüne dönüştürülebilmesiyle, vücutta hasara uğramış organ ve dokuların hücresel tedavisinde uygulanabilmesinin umut vaat etmesidir.(Çetin, 2011)

Kök hücrelerin tedavideki amacı hasar meydana gelmiş veya işlevini tam olarak yerine getiremeyen doku organ ve hücrelerin kök hücreleri kullanarak vücudumuzda hasar görmüş veya fonksiyonunu yerine getiremeyen doku, organ ve hücrelerin tamir edilmesini sağlamak ve yenilemektir.(Ateş, 2016)

Differensiyasyon (Farklılaşma); çok hücreli organizmaları meydana getiren hücrelerin olgulaşma ve uzmanlaşma aşaması sürecindeki bir dizi değişimi ifade etmek için kullanılmaktadır.(Ateş, 2016)

Farklılaşma sitokinlerin etki etmesiyle farklanma ve büyüme faktörlerinin hücreler arasındaki iletişim süreci sonucunda ortaya çıkan olaylar bütünüdür.(Ateş, 2016)

Farklılaşmadan önce kök hücreler sayılarının daha fazla olmasını sağlamak için sürekli bölünürler.(Ateş, 2016)

Kendini yenileme (self renewal) olarak da adlandırılan bu olay kök hücrelerin en belirgin özelliklerinden birtanesidir.(Matur ve Solmaz, 2011) .

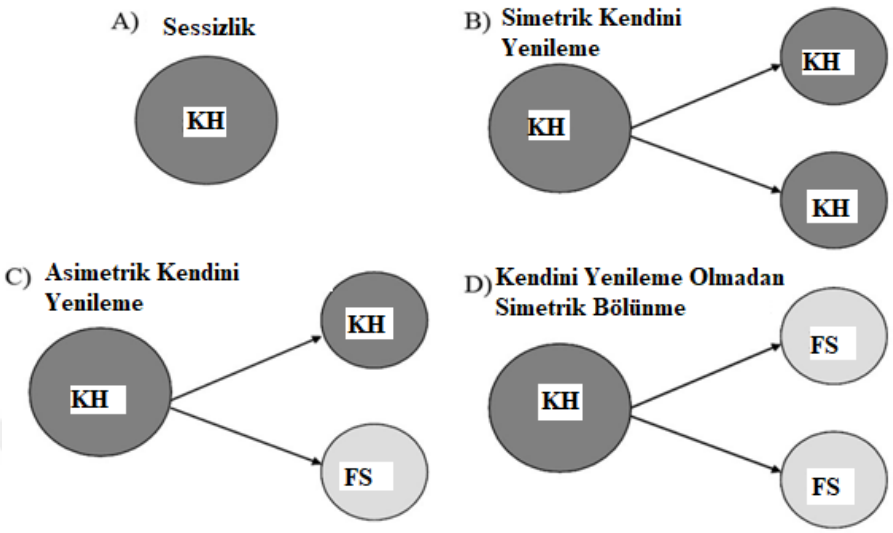
Kendini yenileme ve farklılaşma özelliğine sahip kök hücrelerde bu olaylar meydana gelirken iki farklı bölünme karşımıza çıkar. (Matur ve Solmaz, 2011)

Birincisi asimetrik bölünme yaparak doku ve organa özgü hücrelere dönüşebilir.

İkincisi ise simetrik bölünme yaparak yeni kök hücreler meydana getirirler ve kök hücre havuzunun çoğalmasını sağlarlar.(Biehl ve Russell, 2009)

Asimetrik bölünmede kök hücreler hem kendi yedeğini alırlar hem de öncü hücreye dönüşecek hücreyi üretirler. Böylece kök hücre havuzu yaşam boyu sabit kalmaktadır. (Tokcaer, 2010)

Asimetrik bölünmede dikkat edilmesi gereken bir husus hem hücre içi hem de hücre dışı etkenlerin birlikte kontrol edilmesi gerekmektedir. Mikroçevreleri farklı olan hücrelerin kaderleride farklı olabilmektedir.



Şekil 1.1. Kök Hücre Bölünme Evreleri

Kök hücre potansiyellerinin dört sonucu

A) Bir kök hücre bölünmediğinde bile kök hücre havuzunu koruyabilir.

B) Bir kök hücre simetrik olarak bölünüğünde ikiside kök hücre havuzuna geri dönerek kök hücre sayısını artırır.

C) Bir kök hücre asimetrik olarak bölündüğü zaman biri ebeveyn kök hücreye benzer ve havuza katılır diğeri ise farklılaşarak başka bir hücreye dönüşür.

D) Kök hücre havuzunda bir kayıp olduğu zaman yeni oluşan iki kök hücrede farklılaşmadan kök hücre havuzuna katılır.

(Biehl ve Russell, 2009)

1.2. Kök Hücre Türleri

Kök hücreler elde edildikleri doku bölgesine ve farklılaşma özelliklerine göre gruplandırılmaktadırlar.

1.2.1. Farklılaşma Özellerine Göre Kök Hücreler

Farklılaşma özelliğine göre kök hücreler 4 farklı hücre türüne ayrılmaktadır. Bunlar Multipotent Kök Hücre, Unipotent Kök Hücre, Totipotent Kök Hücre, ve Pluripotent Kök Hücredir.(Karakaya, 2013)

1.2.2. Elde Edildikleri Kaynağa Göre Kök Hücreler

Bu bölümde kök hücreler, elde edildikleri kaynaklara göre embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler olmak üzere iki başlık altında incelenecektir. (Karakaya, 2013)

1.2.2.1. Totipotent Kök Hücre

Sınırsız farklılaşma özelliğine sahip ve Latinceden köken alan ‘bütün’ anlamına gelen totus ve ‘güç’ amlamına gelen potentia kelimelerinden meydana gelen farklı yönlere gidebilme anlamına gelen kök hücrelerdir.(Çetin, 2011)

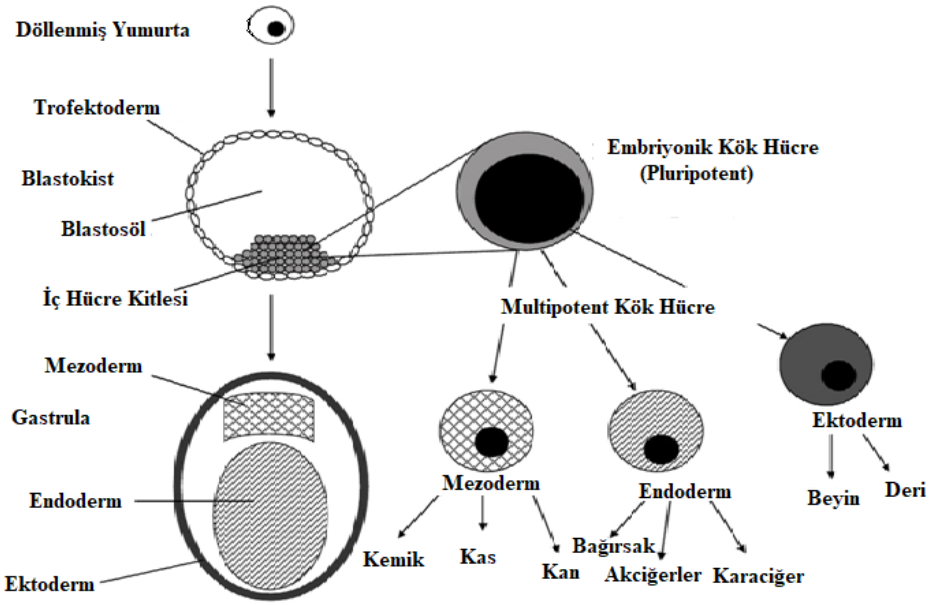
1.2.2.2. Pluripotent Kök Hücre

Pluripotent kök hücreler üreme hücreleri dışındaki vücut hücreleri yani somatik hücrelerin ve dokuların kaynağıdır. Pluripotent hücreler birden fazla dokuyu meydana gelmesine kaynaklık etmesine rağmen, yeni bir birey oluşturamazlar.(Biehl ve Russell, 2009)

Pluripotent hücreler fertilizasyondan sonra, 4–5. Günde oluşan blastosistin iç hücre kitlesindeki embriyoda yer alan hücrelerdir. (Karakaya, 2013)

Blastosiste endoderm (iç tabaka) ve ektoderm (dış tabaka) olarak 2 hücre tipi vardır. Ektoderm de yavru hücrenin solunumunu ve beslenmesine yardımcı olan koruyucu kese ve plesanta gelişmekteyken, endoderm de ise kas kemik beyin vs. gibi organ ve dokular gelişir. (Karakaya, 2013)

Pluripotent kök hücrelerine blastosistin iç hücre tabakasından köken aldıkları için embriyonik kök hücreleri de denilmektedir (Biehl ve Russell, 2009)



Şekil 1.2. Kök hücrelerin türetilmesi (Biehl ve Russell, 2009)

Doğal embriyo gelişimi sırasında hücreler, doğal embriyo gelişimi sırasında (panelin sol tarafı) döllenmiş yumurtadan blastosiste, gastrulaya kadar çoğalır ve uzmanlaşır. Pluripotent, embriyonik kök hücreler, blastokistin (hafif gölgeli) iç hücre kütlesinden elde edilir. Multipotent kök hücreler (elmas deseni, diyagonal çizgiler ve daha koyu gölge) gelişmekte olan gastrulada bulunur veya pluripotent kök hücrelerden türetilir ve yalnızca ilgili germ tabakasındaki hücrelere yol açmakla sınırlıdır.

1.2.2.3. Unıpotent Kök Hücre

Unipotent hücreler sadece tek bir soyda farklılaşarak hücre oluşturabilen kök hücrelerdir.

Kas kök hücreleri bu hücre tipine örnektir. "Uni" kelimesi tek bir anlamına gelen Latince "unus" kelimesinden türetilmiştir. Yetişkin dokularda diğer kök

hücre tiplerine kıyasla bu hücreler en düşük farklılaşmaya potansiyel sahiptir. (Rajabzadeh ve ark, 2019)

1.2.2.4. Multipotent Kök Hücre

Multipotent kök hücreler çoğu dokuda bulunur ve sınırlı sayıda hücre tipine dönüşebilmektedir. Mezenkimal kök hücreler içerisinde en çok bilinen kök hüredir. Multipotent kök hücreler kemik iliği, yağ doku, kemik, göbek kordonu kanı ve periferik kan dahil olmak üzere çeşitli dokulardan elde edilebilirler. Multipotent kök hücreler hücre kültürü kaplarına yapışır ve spesifik yüzey hücre markerleri ile karakterize edilir. Bu hücreler, yağ dokusu, kemik, kıkırdak ve kas gibi mezoderm kaynaklı dokulara farklılaşabilir.(Kolios ve Moodley, 2013)

1.2.3. Elde Edildikleri Kaynağa Göre Kök Hücreler

1.2.3.1. Embriyonik Kök Hüre

Embriyonik kök hücreler döllenmeden 5-6 gün sonra oluşan embriyonun blastosist aşamasındaki iç hücre kitlesinden elde edilen kök hücrelerdir. Bu kök hücreler pluripotent karakterdedirler.Yani embriyonik kök hücreler gelişimleri sırasında üç germ tabakasına (endoderm, mezoderm ve ektoderm) ve bu tabakalardan meydana gelen başka hücre tiplerine dönüşebilmektedirler.(Kolios ve Moodley, 2013)

1.2.3.2. Yetişkin Kök Hücre

Yetişkin kök hücreler farklılaşmadan kalabilen bulunduğu dokunun etrafındaki hücrelere dönüşebilen erişkin kök hücrelere denir. Bu hücreler hasarlı dokuları yenilemek için hücre bölünmesi ile çoğalır ve doku tamiri için son derece önemlidir.(Rajabzadeh ve ark, 2019)

Somatik kök hücreler olarak da bilinen yetişkin kök hücreler (ASC'ler), organlarda ve dokularda bulunur ve homeostazı korur.(Tokcaer, 2010)

Yetişkin kök hücreler kemik iliği,plesanta kordon kanının yanı sıra karaciğer,pakreas, deri ,diş pulpası,beyin ve retina gibi bir çok dokudan elde edilebilmektedir. (Çapkın ve Çokmak, 2010)

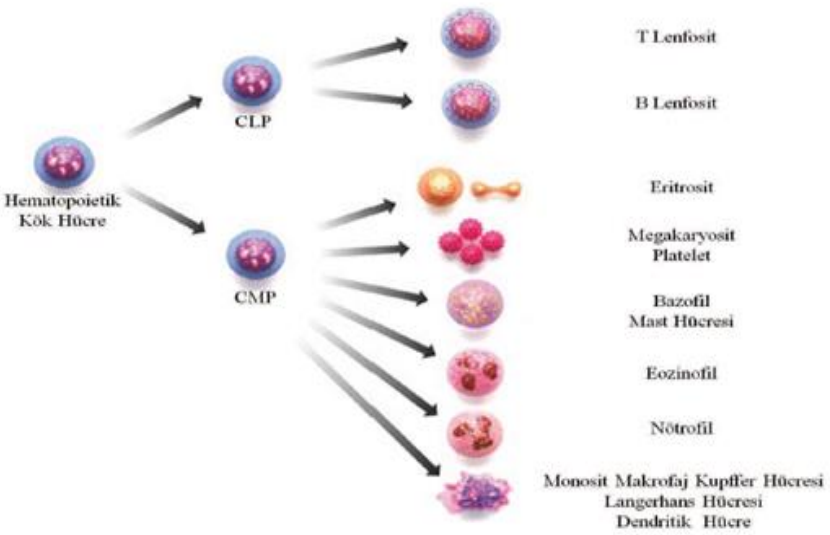
Erişkin kök hücrelerin başında en çok çalışılan organlarda yerleşik diğer kök hücreler mezenkimal ve hematopoietik kök hücreler olmak üzere 3'e ayrılır.

1.2.3.2.(1). Hematopoetik Kök Hücreler

Erişkin kök hücrelerin en iyi örneklerinden biri olan hematopoietik kök hücreler kemik iliğinde bulunurlar. Yapılan bir çok çalışma sonucunda iskelet kasında,kan damarlarında,karaciğerde, diş pulpasında,meme dokusunda, deride, testiste, akciğerde, ,ovaryum epitelinde,gözde,tükürük bezinde bu hücrelerin olduğu tespit edilmiştir.(Özen ve Sanok, 2014)

Hematopoetik kök hücreler kemik iliğinde pluripotent özellikte olup en az 10 farklı işlevsel (nötrofil, bazofil,eozinofil, eritrosit, trambosit, monosit/makrofaj, dendritik hücreler,mast hücreleri, B ve T lenfositler) hücre çeşitlerini oluşturabilirler. Hematopoieteik kök hücrelerin en önemli markerlerinden biri CD34'tür.Bu hücreler kemik iliği hücrelerinin %0.5-5'inde ifade edilirler.(Ural, 2006)

Hematopoetik kök hücreler uzun bir süre boyunca hücre oluşturabilme yeteneği olan, kendi kendini yenileyebilen, daha fazla olgunlaşmış hücrelere farklılaşabilme özellikleri olan multipotent kök hücrelerdir.(Szade ve ark, 2018)



Şekil 1.3. Multipotent özelliğe sahip hematopoietik kök hücrelerin farklı hücre tiplerinioluşturma şekilleri

1.2.3.2.(1).a. Mezenkimal Kök Hücre

Kemik iliği stromalı olarak da bilinen mezenkimal kök hücreler (MSC'ler) hücreler veya mezenkimal stromal hücreler, 1968'de Friedenstein'ın öncü çalışmaları tarafından keşfedildi.(Tokcaer, 2010) Hematopoetik kök hücrelerin in vitro kültürlenmesi sırasında, kemik iliğinde Hematopoetik kök hücrelerin dışında farklı bir fibroblastik morfolojiye sahip hücre tipi olduğunu gördüler. Kültür flaskına bağlanabilen ve daha sonra koloni oluşturan bu birim fibroblastlar, CFU-F(koloni oluşturan birim fibroblastlar) olarak adlandırıldılar. (Lanotte ve ark. 1981).(Tokcaer, 2010)

Daha sonra, bu yapışık, fibroblastik ve koloni oluşturan hücreler ilk olarak Owen tarafından stromal kök hücreler olarak adlandırıldı(1988) ve daha sonra ise CAPLAN tarafından mezenkimal kök hücre olarak adlandırıldı(1991).(Tokcaer, 2010)

Mezenkimal kök hücreler erişkin kök hücrenin bir örneği olup hücrelerin bağ dokularında bulunmaktadır. Bağ dokularda bulunan mezenkimal kök hücreler

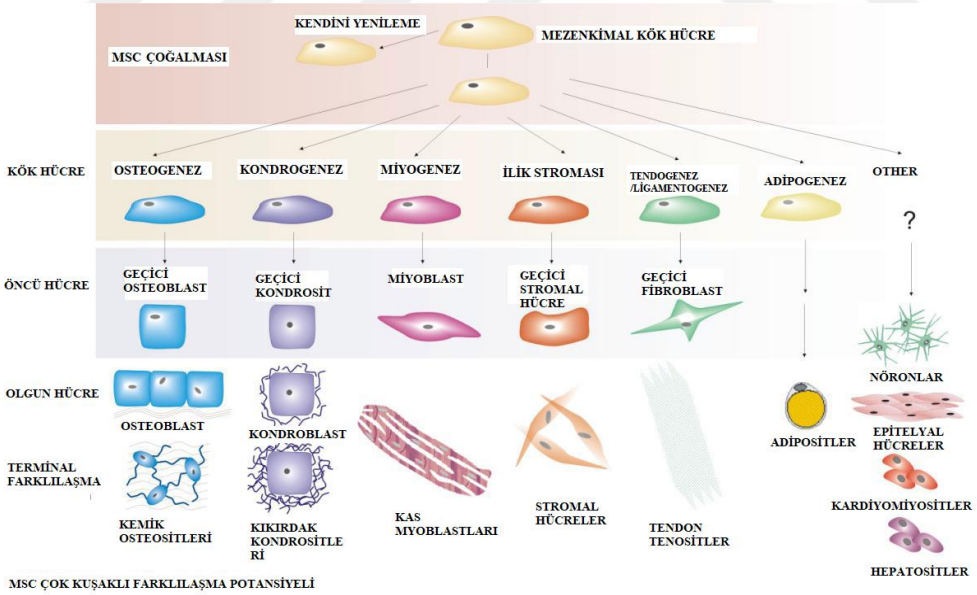
dokularda destek bölümü adı verilen bölümde stroma hücresinin ana yapısını oluşturur.

Mezenkimal kök hücreler yer aldığı veya bulunduğu dokudan başka bir hasarlı dokuya geçebilme özelliğine sahiptir. Mezenkimal kök hücreler geçtikleri hasarlı dokuyu tamir etme yeteneğine de sahiptirler. (Akgün,2016)

Mezenkimal kök hücrelerin bir başka özelliği ise elde edildikleri dokuda miktar yönünden az oldukları için pasajlanarak sayıları arttırılmaktadır.(Özen ve Sanok, 2014)

Mezenkimal kök hücreler çok potansiyeldir ve adipositler, osteoblastlar dahil olmak üzere bir dizi hücre tipine farklılaşır bunlar; krondrositler, miyoblastlar ve fibroblastlar; yağ, kemik, kıkırdak, kas ve deri içeren hücrelerdir.(Lee, 2016)

MSC'ler osteoblastlar, kondrositler ve adipositler dahil olmak üzere mezodermal embriyonik kökene doğru çeşitli hücre tiplerine farklılaştırılabilir. (Jeon ve ark, 2016)



Şekil 1.4. MSC çok satırlı farklılaşma potansiyeli (Tokcaer,2010)

Yaklaşık 10 yıl sonra, Mezenkimal kök hücreler nihayet insan yetişkin kemik iliğinde tanımlandı. [Kopen ve diğerleri, 1999; Pittenger vd., 1999].(Jeon ve ark, 2016)

Mezenkimal kök hücreler örnek toplama için gereken nispeten invaziv prosedüre hücre sayısında, proliferasyonda ve yaşla farklılaşma kapasitesine göre kemik iliği mezenkimal kök hücreler klinik uygulanabilirliği açısından sınırlıdır.(Jeon ve ark, 2016)

Bu nedenle, kemiğe alternatif olarak birden fazla doku araştırılmıştır.

Bunlardan bazıları plasenta (PL), adipoz dahil MSC'lerin kaynağı olarak kemik iliği (BM),fetal akciğer,diş pulpası, göbek kordon kanı gibi örneklerdir.(Jeon ve ark, 2016)

1.2.3.2.(1).b. Mezenkimal Kök Hücrelerin Avantajları Ve Dezavantajları

Mezenkimal kök hücreler izole edilebilme yöntemlerinin kolay olması, kendini yenileyebilme ve çok farklı dokulara farklılaşabilme potansiyelinin yüksek olması nedeniyle yenilenebilir tıpta çok önemli bir yere sahiptirler.(Çapkın ve Çokmak, 2010)

Mezenkimal kök hücreler, diğer kök hücre türleriyle birlikte, gelecekteki klinik tedavilerde kullanılmak üzere büyük bir terapötik potansiyel sunar; bu, kendi kendini yenilemenin düzenlenmesi ve soy bağlılığının düzenlenmesi konusundaki anlayışımızı ilerletmeye bağlıdır. Mezenkimal kök hücrelerin belirli hastaların ihtiyaçlarını karşılamak için gerektiği şekilde genişletilmesine ve yönlendirilmesine izin verecektir.(Lee, 2016)

Moleküler ifade profilinin ayrıntılı bir şekilde anlaşılması MSC'lerin farklı uygulamalarını hücresel özelliklerine göre yönetmek kaynakların klinik kullanım için en uygun hücre tipini keşfetmek için gereklidir.

Bununla birlikte, çeşitli MSC'lerin moleküler mekanizmasının çalışmaları henüz yayınlanmadı ve ayrıca anlaşılması gerekiyor MSC'lerin fizyolojik bir etkiye

neden olduğu mekanizma, doku onarımının temel mekanizmalarını açıklayabilir.(Jeon ve ark, 2016)

Mezenkimal kök hücrelerin bir hücreden diğer bir hücreye göç etme özellikleri sayesinde hasarlı dokuyu tamir edebilme yetenekleri Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşabilme özelliklerinin fazla olması, Mezenkimal kök hücrelerin büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler salgılayarak hasarlı dokuyu tamir edebilme özelliklerinin olması

Mezenkimal kök hücrelerin dayanıklı olması gen tedavisi için uygun olduğunu göstermektedir ve bu kök hücrenin avantajlarını oluşturmaktadır. (Akgün,2016)

Mezenkimal kök hücrelerin dezavantajlarının biri de elde edildikleri dokudan miktar olarak az olduğu için defalarca pasajlama işlemi gerekmektedir. Ve bu pasajlama işlemi sonucunda ise kök hücrenin fenotipik, biyolojik gibi birçok özeliklerinde değişiklik meydana gelmektedir bu da hücrenin dezavantajını oluşturmaktadır. (Özen ve Sanok, 2014)

Aynı zamanda bu kök hücrelerin kültürde sayılarını çoğaltmak için defalarca pasajlama işlemi yapılacağı için maliyet açısından dezavantaj oluşturmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin kültür için teknoloji, alt yapının iyi olması önemli bir sorun teşkil etmektedir. (Akgün,2016)

Mezenkimal kök hücreler kemik iliği stromasındaki tüm bu hücrelerin yaklaşık %0.01'ini oluşturmaktadır. Esas görevleri çeşitli büyüme faktörlerini, sitokinlerini ve ekstraselüler matriks proteinlerini sentezleyip regüle ederek, hücre-hücre etkileşimlerini sağlamak ve böylece hematopoez sürecine doğrudan ve dolaylı olarak destek sağlamaktır.

Bu hücrelerin; interlökin 1 alfa (IL1a), interlökin 1 beta (IL1b), interlökin (IL) 6, 7, 8, 11,14, 15, hepatosit büyüme faktörü (HGF), LIF, FGF, tümör nekrozis faktörü (TNF) gibi kemokin ve sitokinleri sentezleyip regüle ederek hematopoez sürecine destek sağlamasının dışında, farklılaşma yeteneklerinin fazla olması, migrasyon özelliği, hasarlı doku tamirine katkı sağlaması, hasarlı olan hücrelerle

füzyon yeteneğinin olması, genetik geçmişlerinin kararlı olması, tümör oluşturma riskinin diğer kök hücre türlerine göre az olması birçok hastalığın klinik tedavisinde ön plana çıkmasını sağlamıştır. Bu hastalıklardan bir tanesi puberte bozukluklarıdır. Puberte dönemine geçişte en etkin rol oynayan kisspeptin ve nörokinin protein aileleridir.(Nauta ve Fibbe, 2007)

1.3. Kisspeptin

1990'lı yılların sonlarına yaklaşıldığında tümörün yayılmasını yani metastazını baskılayan bir gen keşfedilmiş ve bu genin adı ise KISS-1 genidir. Bu gen tümör metastazını baskıladığı için metastin (Kisspeptin-54) olarak adlandırılmıştır.(Kotani ve ark, 2001) , (Muir ve ark, 2001)

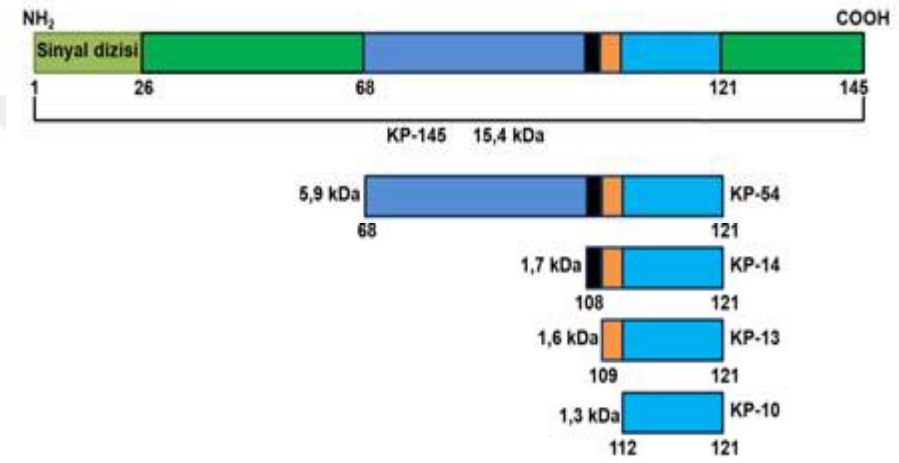
Amerika Birleşik Devletleri'nin Pensilvanya eyaletinde keşfedilen kisspeptin reseptörü yani GPR54 ve KISS-1 genine bu eyaletin Hershey şehrindeki ünlü çikolata markasından esinlenerek isimlendirme yapılmıştır. KISS-1 genindeki 'SS' harflerinin anlamı ise dominant olduğu (Suppressor sequence) anlamını taşımaktadır.(Çetin,2011), (İpek, 2018)

Yapılan ilk çalışmalarda kiss-1 gen ürünlerinin bazı kanser türlerinin metastazını baskılayabildiğinden dolayı KISS-1 genine ait 54 aminoasitlik ürünü 'metastin'olarak adlandırılmıştır. İlerleyen aşamalarda yapılan çalışmalarda ise kisspeptin-54'ün diğer formları saptanmış ve bu formların hepsine birden 'kisspeptin' adı verilmiştir.(Artaş, 2009)

Kisspeptinler hipotalamo-hipofizer-gonadal aksa etki ederek puberte ve fertilite de önemli görevler üstlenen hipotalamusta yer alan kisspeptin nöronlarındaki kiss-1 geni tarafından transkribe edilen öncül bir proteinden türeyen ve farklı görevleri üstlenen peptidlerdir.(Seminera, 2003), (Jayasena, 2009)

Bu öncül protein Kiss-1 geni tafından üretilen 145 aminoasitlik bu peptid olup bazı post-translasyonel mekanizmalar ile ilk önce 54 aminoasitten oluşan bir peptid meydana getirir. Bu dönüştüğü peptid ise kisspeptin-54 (metastin)'dür. Daha sonraları ise kisspeptin-54 de farklı mekanizmalar geçirerek 3 farklı aktif peptide

dönüşmektedir. Bu üç farklı peptid ise yapısında bulunan aminoasit sayısına göre adlandırılmaktadır. Kisspeptin-54'den de daha sonra kisspeptin-10, kisspeptin-13 ve kisspeptin-14 kısa formları oluşmaktadır. Kisspeptin-10, kisspeptin-13 ve kisspeptin-14 formlarının hepsi etkisini GPR54'e bağlanarak göstermektedirler.(Kotani ve ark, 2001)



Şekil 1.5. Kisspeptin çeşitleri (Kafa ve Eyigör, 2011)

Son on beş yılda yapılan çalışmalar neticesinde elde edilen bilgiler doğrultusunda KISS1 geni tarafından elde edilen 145 aminoasitten oluşan bir öncül proteinden türeyen ve GPR54 reseptörü üzerinde etki gösteren peptidlerin kisspeptin nöropeptid ailesini oluşturduğu sonucuna varılmıştır. (Gottsch ve ark, 2004), (Gottsch ve ark, 2009)

Bugüne kadar yapılmış olan çalışmalar neticesinde varılan sonuçlar doğrultusunda kisspeptin salınımının ve bu salınımda görev yapan hücrelerin ne kadar önemli olduğunun anlaşılması için kisspeptinler ve bu kisspeptinlerin etkiledikleri reseptörün ortaya çıkardığı sistemin diğer sistemler ve diğer bir hipotalamik veya da başka bölgelerdeki hücreler ile olan ilişkilerin bilinmesi gerekmektedir.

Genel olarak kisspeptinlerin GPR54 reseptörü ile aralarındaki fonksiyonel ilişkiye ‘kisspeptin GPR54’ sistemi olarak adlandırılmaktadır.

Ve bu sistemin üreme fonksiyonu üzerinde, ayrıca puberte başlangıcında önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. (Plant, 2006), (Dhillo, 2008)

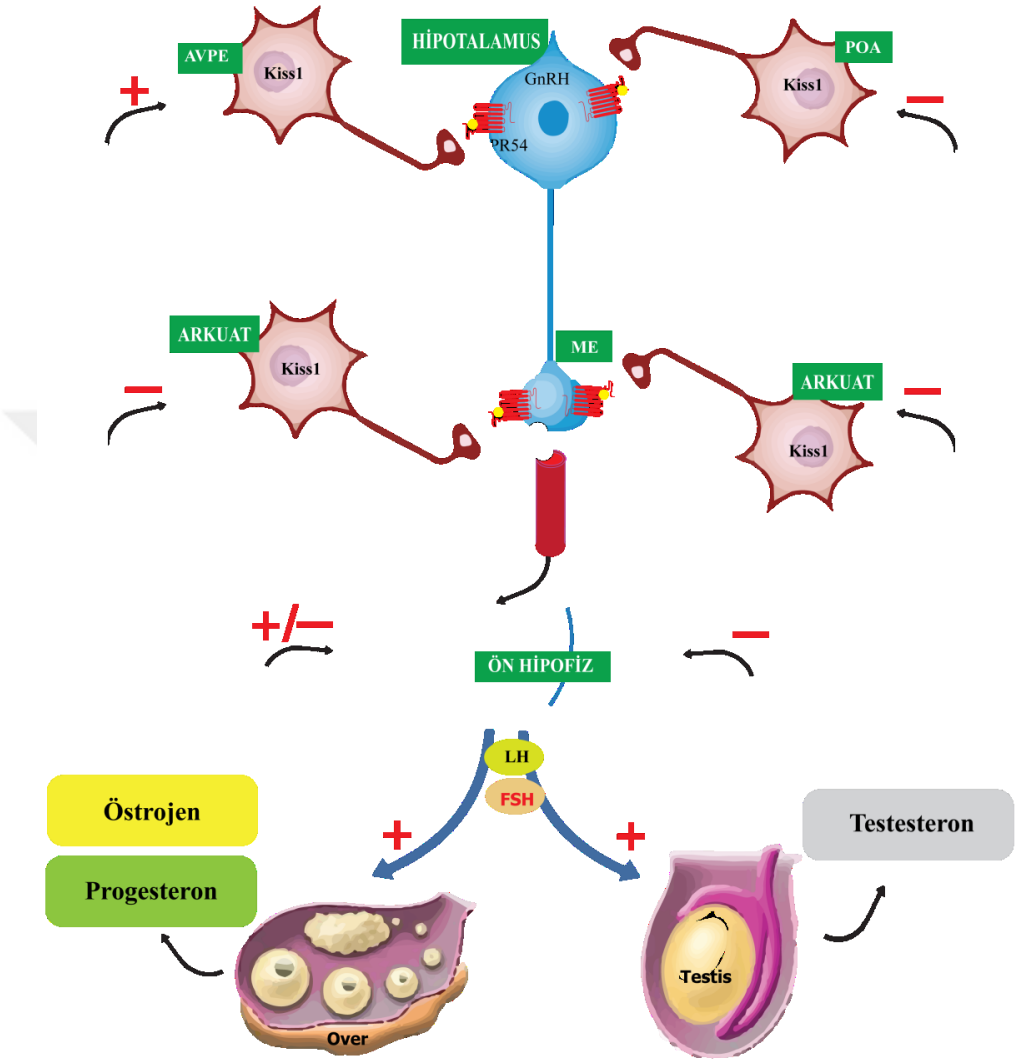
1.3.1. Kisspeptinlerin Etki Mekanizması

Kisspeptinler fenil alanin motifine sahip peptit yapılı bir hormondur. Kisspeptinler kiss1 geni tarafından kodlanmakta ve G protein bağlantılı 54 reseptörüne tutunmuş hormonlardır. (Taşkıran, 2014)

KISS1 geninden 145 aminoasitlik ilk ürün olan bir peptit meydana gelmektedir. Bu 145 aminoasitten oluşan peptit daha sonra kisspeptin-54’e ilerleyen zamanlarda ise kisspeptin-10, kisspeptin-13 ve kisspeptin-14 olarak daha kısa peptit formlarına dönüşmektedir.

Bu meydana gelen kisspeptin-10, kisspeptin-13 ve kisspeptin-14 kısa formdaki peptitler GPR54’ e bağlanarak etkisini göstermektedir. (Kaya, 2014), (Yazıcı, 2011)

Kisspeptinler daha öncede bahsettiğimiz gibi kiss1 geni tarafından üretilen canlının üreme sisteminde ovulasyon ve pubertede önemli görevler üstlenen bir nörohormondur. GnRH yani gonodotropin salgılatıcı hormonu üretebilen hücrelerde var olan Kiss1R yani diğer bir adıyla GPR54 reseptörünün aktive olması neticesinde hipotalamik-hipofizer-gonadal aksı kontrol etmesi üzerine ergenlik veya ovulasyon gibi üreme işlevleri üzerine etki eder.(d’Anglemont ve Colledge, 2010)



Şekil 1.6 .Kisspeptinin etkimekanizması(Eyüpoğlu, 2018)

GnRH, GnRH nöronunun hipotalamusun tabanında yer alan meydanındaki akson uçlarından salgılanır. Bu salgılama LH ve FSH uyararak salınımını sağlar. GnRH dişilerde yumurtalıkları erkeklerde ise testisleri uyararak cinsiyet hücrelerinin oluşumunu sağlar. Hipotalamusta arkuttaki kiss1 nöronlarının kisspeptin yapımındaki gen ifadesinin baskılanmasını östrojen sağlar.Kiss1

nöronları östrojen reseptörü bulunmayan GnRH nöronları ile yumurtalık ya da testis arasında iletişimi sağlar. (Eyüpoğlu, 2018)

1.3.2. Kisspeptin ve Puberte

Puberte cinsel olgunluğa erişerek çoğalabilme özelliklerinin kazanıldığı, büyümenin hız kazandığı, çocukluk evresinden ergenlik evresine geçildiği döneme verilen isimdir. Pubertenin başlangıcında ise belli aralıklarla salınım yapan GnRH nöronları önemli rol oynamaktadır. Pubertenin aktivasyonunda kisspeptinlerin de önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. Ama aynı zamanda kisspeptinler GnRH nöronları üzerinde hem doğrudan hemde bazı dolaylı yollardan etkileri bulunmaktadır. (Taşkıran, 2014)

Hipotalamik-hipofiz gonadal ekseni ergen dönemine girmeden önce uyku halindedir (hipotalamo-hipofizer-gonad eksen, büyüme hormonu ve prolaktin eksenleridir.). (Kaya, 2014)

Ve puberteye geçiş evresinde aktive olur. Bunun sebebi de büyük olasılıkla hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerdeki miktarının çoğalması nedeniyle kisspeptine karşı mRNA,GPR54,KISS-1 hassasiyetindeki (duyarlılığı) artışlar, pulsatil salınımını aktif hale getiren GnRH üreme sistemine uyarıcı etki yaparak pubertal olgunlaşma sürecini başlatır.Hipotalamusta yer alan nöronlar öncülüğünde GnRH portal sisteme **(Portal Sistem; kapiller (kılcal) damarlarda başlayıp yine (kapiller) kılcal damarda biten sistemdir**.) salınması sağlanır ve ön hipofiz bezi üzerinden etki ederek LH ve FSH'ın salınımını kontrol eder, bu durumda gonodal steroidlerin salgılanmasını stimüle (uyarıcı) eder. **Gonadal steroidler** olarak da bilinen **cinsiyet steroidleri GnRH salgılanmasını düzenler**

1.4. Nörokinin

Taşikinin peptit ailesi, kesinlikle hayvan organizmasında tarif edilen en büyük peptit ailelerinden birini temsil eder**.** (Severini, 2002)

1931'de Von Euler ve Gaddum, at bağırsağından ve beyninden alınan bir özütün bağırsak düz kas kasılmalarına neden olduğunu keşfettiler; aktif bileşiğe "preparasyon" için "madde P" adını verdiler.Sonraki yıllarda, eledoisin ve physalaemin gibi ilgili memeli olmayan peptitler keşfedildi ve daha yakın zamanda, nörokinin A (önceden K maddesi olarak adlandırılır) ve nörokinin B dahil olmak üzere sinir sisteminde bir grup SP benzeri memeli peptiti bulundu. (40)(önceden nörokinin K olarak adlandırılır).

Uzun bir araştırmadan sonra, SP'nin 11 aminoasit dizisi nihayet 1970 yılında Chang ve Leeman tarafından sığır hipotalamusundan aydınlatıldı. SP, hızlı düz kas kasılması üretme yetenekleri nedeniyle topluca "taşikininler" olarak adlandırılan Phe-X-Gly-Leu-Met-amid karboksi-terminal dizisini paylaşan peptit ailesinin bir üyesidir (40)

Taşikininler, nörotransmiterler veya nöromodülatörler olarak görev yaptıklarına inanılan merkezi ve periferik sinir sistemi boyunca yaygın olarak dağılmıştır.Taşikininlerin biyolojik etkilerine reseptörün üç alt tipi aracılık eder.G proteinine bağlı reseptör ailesine, yani NK1, NK2 ve NK3'e aittir. P maddesi, NK1 reseptörleri için en yüksek afiniteyi gösterirken, nörokinin A ve nörokinin B, tercihen sırasıyla NK2 ve NK3 reseptörlerine bağlanır.Bununla birlikte, bu peptitlerin seçiciliği nispeten zayıftır ve bazı fizyolojik koşullar altında, bunların herhangi birinin eylemlerine, birden fazla reseptör tipinin aktivasyonu aracılık etmesi mümkündür. (Longmore ve ark, 1997)

Taşikininler(TK) periferal dokularda ve merkezi sinir sisteminde (MSS) geniş bir şekilde yayılan peptitler olduğundan bahsetmiştik.(Koca, 2019)

Hipotalamusta GnRH salınımı ile ilgili olduğu belirlenen bir diğer proteinler vardır bu proteinlerden biri ise Neurokinindir. Bu sinyal peptidi taşikinin ailesinin bir ailesi olup omurgalı ve omurgasızlarda hücre içi sinyalizasyonda görev alır. İnsanda en iyi bilinen taşikininler substance P(SP),nörokinin A (NKA) ve nörokinin B'dir(NKB) ve bunların hepsi yaygın olarak merkezi sinir sisteminde sentezlenirler.(Lehman ve ark, 2010), (Cheng ve ark, 2010)

NKB agonistinin kisspeptin ekspresyonunu arttırdığı ve dolayısıyla GnRH ve akabininde LH salınımını etkilediği gösterilmiştir.(Lehman ve ark, 2010), (Cheng ve ark, 2010)

Substans B'nin dışında da yapılan çalışmalar sonucunda taşikininler ortaya çıkmıştır. Memeli olmayan türlerin merkezi sinir sisteminde keşfedilen bu taşikininler nörokinin olarak adlandırılmış ve bu peptidler Tac1, Tac2 ve Tac3 (Taşikinin geni 1, 2, 3) olarak üç farklı gen tarafından kodlanmaktadır. Tac 1 geni nörokinin A'yı, nörokinin B ise kemirgenlerde Tac 2 tarafından insanlarda ise Tac 3 geni tarafından kodlanmaktadır. (Severini, 2002), (Stout ve ark, 2001)

Tac 3 geni ise ayrıca preprotaşikinin C'yi ve bunun gen ürünü olan Hemokinin 1'i kodlamaktadır.(Page, 2004), (Zhang ve ark, 2000)

TAC3 ve TACR3'ün fonksiyonu hakkındaki asıl gelişme Topaloğlu ve grubunun çalışmalarıyla ortaya çıkmıştır. Bu grup TAC3 ve TACR3 mutasyonu olan bir hastada hipogonadotropik hipogonadizm ve infertilite gözlendiği dolayısıyla bu proteinlerin pubertenin kontrol noktasında anahtar rol oynadığını belirlemişlerdir.(Zhang ve ark, 2000), (Topaloğlu ve ark, 2012)

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kök hücre ile ilgili çalışmalar ilk olarak 1960 yıllarında hematopoetik kök hücrelerin keşfedilmesi ile ortaya çıkmıştır. İlerleyen zamanlarda kök hücre ile ilgili çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalardan olumlu sonuçlar alınmasının üzerine bu alandaki çalışmalar ilerlemiş ve günümüze kadar ilerleme kaydederek devam etmiştir. (Şimşek, 2012)

Bugünün kök hücre tedavisi üzerine dünyada ilk öncüsü insan ömrünü uzatmanın yolunun, doğum sonrası atılan plasentalardan kordon hücrelerinde olduğunu söyleyen araştırmacı bilim adamımız Ord.Prof. Dr. Vet. Hek. Tug. Gen. Süreyya Tahsin Aygün'dür. (Şimşek, 2012)

Süreyya Tahsin Aygün 1950-1960 yılları arasında kendisi hayvanlarda fetal greftler ve kordon kanı greftleri ile birçok hastalıkların tedavisi ile ilgili araştırmalar yapmış ve çeşitli tıp dergilerinde yayınlamıştır.(Çapkın ve Çokmak, 2010)

1960'larda Joseph Altman ve Gopal Das'ın beyinde kök hücrenin aktivasyonunun devam etmesi ve erginlerde de nöron oluşumu yani nörojenezin devam ettiğini göstermişler ve böylelikle konu gündelik yaşamda yerini almıştır. (Karakaya, 2013)

Leipzig Üniversitesinden H. A. Eduard Dreisch ise deniz kirpileriyle ilgili bir deney yapmıştır. Bu deneylerde 'Blastomere Separation' adı verilen bir yöntemi buldu. Bu yöntemi ise deniz kirpisinin erken dönemdeki embriyosunun blastomerlerini birbirlerinden ayırarak bulmuştur.Blatomere seperation yönteminde döllenmiş yumurtanın besi ortamında 4-8 hücre meydana getirmesine yani blastomer evresine kadar bölünmesine izin verilmektedir. İlerleyen evrelerde blastomer aşamasına gelen 8 hücreli yapısındaki her hücre alınarak bir blastosist oluşturmaktadır. Ve bu oluşan blastosistler yeni döllenmiş zigot gibi taşıyıcı anneye aktarılmaktadır. Böylelikle de birbirinin aynısı klonlar meydana getirilmektedir.(Karakaya, 2013)

1902 yıllarında ise Hans Speamann da blastomere seperation yöntemini kullanarak semender blastomerlerini ayırmıştır ve her blastomerden ise yeni bir semender oluşturmuştur. Blastomer separation yönteminin keşfedilmesiyle klonlamanın temeli ortaya atılmıştır.(Karakaya, 2013)

Robert briggs ve T.J. King 1952 yıllarında ilk klonlama deneyini gerçekleştirdiler. Bunu da şu şekilde yapmışlardır ileri safhalardaki kurbağa yumurtasının çekirdeği çıkarıldı ve diğer bir başka kurbağanın yumurtasının içine aktarıldı.Yapılan bu deney sonucunda ne yazık ki yumurta gelişmedi.Rober briggs ve T. J. King yaptıkları deney sonucu bu yönteme Nuklear Transfer' adını verdiler. (Karakaya, 2013)

1959 yılında ise invitro fertilizasyon yöntemi ile ilk hayvan(tavşan) üretildi.(Sağsöz ve Ketoni, 2008)

1967 yılında ilk olarak tanımlanan embriyonal karsinoma hücrelerinin hücre kültüründe yani kültür ortamında çoğaltılması kök hücre çalışmaları için ileriye dönük önemli bir adım olmuştur.(Şimşek, 2012)

1967 yıllarından beri fare ve insan teratokarsinomlarından fazla sayıda hücre dizisi tanımlanmıştır.Bu hücrelerin farklılaşması embriyoid cisimler olarak bilinen embriyoya benzer oluşumların meydana gelmesiyle sonlanan hücre kümesi sonucu gelişir.(Şahin ve ark, 2005)

1968 yıllarında ise Edwards ve Bavister ilk insan ovumunu invitro ile fertilize ettiler.(Sağsöz ve Ketoni, 2008)

1978 yıllarında İngiltere'de ilk invitro fertilizasyon bebek dünyaya geldi.(Sağsöz ve Ketoni, 2008)

1981 yılında ise birbirinden ayrı iki çalışma grubu-Matthew Kaufman, Martin Evans ve Gail Martin tarafından fare blastosistlerinin hücre içi kitlesinden embriyonik kök hücreler elde edilmiştir. Pluripotent fare embriyonik kök hücrelerini invitro ortamda çoğaltmak için kültür ortamı ve şartları için ne gerekiyorsa onları tanımladılar. Böylelikle ilk embriyonik kök hücreleri elde ettiler.(Brunt ve ark, 2012)

Aynı dönemlerde ise; invitro fertilizasyon kliniklerinden embriyolar alınmış ve bu embriyolar kullanılarak insan embriyonik kök hücrelerin elde edilmesine yönelik bir takım çalışmalarda başlamıştır.1988'de ilk defa insan embriyonik kök hücreleri kültüre edilebilmiştir. Embriyonik kök hücreler ileride birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilme olanağı sağlama ihtimallerinin artması birçok bilim çevrelerinde büyük etki yaratırken henüz bir sonuca varılmamış etik sorunlar kök hücre çalışmaları için ciddi bir direnç meydana getirmiştir.(Şimşek, 2012)

1996 yıllarında Rhesus türlerine ait maymunların embriyonik kök hücreleri meydana getirildi.(Sağsöz ve Ketoni, 2008)

2000 yıllarında ise insan embriyonik kök hücrelerin pluripotent özellikte olduğu anlaşıldı.(Sağsöz ve Ketoni, 2008)

2001 yıllarında Amerika Birleşik Devletleri başkanı Bush, sadece o güne kadar olan tüp bebek yöntemi çalışmalarından artan embriyolarla çalışmalar yapılmasına izin verdi.(Sağsöz ve Ketoni, 2008)

2004 yıllarında Güney Koreli bilim adamları klonlama üzerine birtakım araştırmalar ve çalışmalar yapmışlar ve bu çalışmalar sonucunda 30 insan embriyosunu klonlamış ve blastosist aşamasına kadar getirmiştirler ancak bu klonladıkları embriyolardan yalnız 1 tanesinden kök hücre elde edebilmişlerdir.(Sağsöz ve Ketoni, 2008)

Bu hücrelere yönelik etik tepkiler sonucunda, erişkin kök hücreler ile ilgili araştırmalar ve çalışmalar yoğunlaşmış ve bu hücrelelerin belirgin plastisiteleri beynin kana çevrilmesi, kemik iliğinden kas gibi alt başlıkların oluşmasına ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Bu ilk zamanlardaki çalışmalardan sonra embriyonik ve erişkin kök hücreler ile ilgili çok sayıda yayınlar ortaya çıkmış ve bunların hepsinin ortak bir amaç peşindelerdir. Bütün araştırmacıların ortak amacı kök hücrenin tedavide nasıl kullanılabilir olmasıdır.(Şahin ve ark, 2005)

3. MATERYAL METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Laminar akımlı kabin, CO_2inkübatör, ışık mikroskobu, invert mikroskop, otoklav, santrifüj, vorteks, sıcak su banyosu, buzdolabı-derin dondurucu (+4°C, -20°C, -80°C) Ç.Ü. Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi hücre kültür laboratuvarında kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Malzemeler

Çalışmamızda 3 adet 5-6 aylık (dişi-erkek) sıçan, %70'lik alkol, Kavanoz, Laminer akış kabini Pens, Bistürü, Parafin kabı, iğneler, Heparinli PBS (kalsiyum ve magnezyum içermeyen),(Life Technologies, Gibco®, katalog numarası: 10010), İnsülin enjektörü,Santrifüj tüpü, α-MEM(Hyclone SH30265.01),Trizol (Sigma T9424TRI reagent), %15 FBS (Atlanta Biologicals, katalog numarası: S11550), %0,1 P/S (Gibco-15.070),15 adet 25 cm^2 yüzeyli kültür kabı (SPL-Lifescience 063), Tripsin(Life Technologies, Gibco®, katalog numarası: 25200),CD90 (557266 BD) ,CD45 (554878 BD),CD29 (555005 BD),DNAaz I kiti, ,Kiss1R(Rn0057690_m1), Kiss1(Rn00710914_m1), ,Tac2 (Rn00569758_m1) ,Tacr2 (Rn00436896_m1),ACTB (Rn00667869_m1)

3.2. Metod

3.2.1. Hücre Kültürü

Mezenkimal kök hücreler sıçan kemik iliğinden laboratuvar koşullarında uygun şartlar sağlanarak elde edildi. Sıçanlar eterli bir kavanoz içerisinde sakrifiye edildi. Dış yüzey sterilizasyonun sağlanması için sıçanlar öncelikle %70'lik alkol içerisine batırıldı. Bu aşamadan sonrasında deneyimize laminer kabın içerisinde devam ettik. Sıçan pens yardımıyla tutularak alkolden arındırıldı ve sırt üstü yatırıldı elleri ve ayakları iğne ile tutturularak sabitlendi. Arka bacakların iç kısmından üst deri ayrıldı. Arka bacaklar vücuda bağlandığı bölgeden kesilerek femur ve tibia kemikleri çıkarıldı. Kesilen bacaklar heparinli PBS (kalsiyum ve magnezyum içermeyen) içeren petriye aktarıldı. Femur ve tibia kemikleri ayrıldı. Kemikler kas tabakasından olabildiğince temizlendi. PBS içeren başka bir kaba aktarıldı. İnsülin enjektörleri hücre kültür ortamı ile doldurularak hazırlandı. Kemiklerin sırasıyla epifiz uçları kesildi. Epifiz ucu kesilen kemikten iç boşluktan insülin enjektörü içerisindeki hücre kültür ortamı basınçla akıtıldı. Tüm kemik iliğinin alındığından emin oluncaya kadar işleme devam edildi. Tüm kemik ilikleri aynı tüpe toplandı.1000 rpm' de +4°C' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve bir üst basamaktaki işlem tekrarlandı. Santrifüj sonunda süpernatant döküldü. 15 adet 25 cm^2 yüzeyli kültür kabına 2,5 ml olacak şekilde aktarıldı. Üzeri ortam ile 5 ml' ye tamamlandı. 37 °C'de %5 CO^{2}'li %99 oranında nem sağlayan inkübatöre kaldırıldı.



Şekil 3.1. Sıçan kemik iliğinden hücrelerin toplanması



Şekil 3.2. Hücre kültür aşaması

3.2.2. Akım sitometrisi İle MKH Analizi

Öncelikle hücre ortamı atıldı ve PBS ile hücreler yıkandı. Hücre yoğunluğu %85'e ulaşıncatripsin ile kaldırıldı. Hücre ortamı eklenerek tripsin inaktive edildi.Hücreler süspansiyon şeklinde santrifüj tüpünde toplandı ve 5 dk 300-400 g' de santrifüj edildi.Santrifüjlemeden sonra hücre pelleti PBS ile durulandı ve yeniden pellet haline getirildi.Süpernatant atıldı ve pellet PBS solüsyonunda tekrar süspanse edildi.Hücre sayımı yapıldı ve ardından hücreler soğuk PBS içinde 10^6-10^7 hücre olacak şekilde seyreltildi.Seyreltmeden sonra 100 mikrolitre hacimde 10^5-10^7 hücre olacak şekilde FACS (Floresan Aktive Hücre Ayırma) tüpüne alındı.Antikor eklendi ve karanlıkta 30-60 dk 4°C' de inkübe edildi.Hücreler santrifüjlendi ve soğuk PBS ile yıkandı.Hücreleri 100-200 mikrolitre facs bufferla yeniden süspanse haline getirildi.Karanlıkta 4°C' de saklandı ve 24 saat içinde analizi yapıldı.

Örnekler 5 ve 6. Pasajda akım sitometrisi cihazı ile MKH hücre yüzey belirteçleri açısından analiz edildi. Gruplardan alınan örnekler ile pozitif marker olarak CD90 ve CD29 seçildi.

RNA izolasyonu

-4,5 ,6 ve 7. pasajların Trizol ile RNA izolasyonu yapılıp cDNA'ya çevrildi.



Şekil 3.3. RNA izolasyonu aşaması

3.2.3. MKH'lerde Kisspeptin, Nörokinin Ve Reseptörlerinin Ekspresyonu

Total RNA izolasyonu TRIzol reaktifi kullanılarak izole edilmiştir. İki mikrolitre cDNA kullanılarak ve Taqman master mix kullanılarak Real-time PCR ABI 7500 PCR sisteminde (AppliedBiosystems) gerçekleştirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu Taqman master mix kullanılarak Real-time PCR ABI 7500 PCR sisteminde (AppliedBiosystems) gerçekleştirilmiştir.

25 µl reaksiyon hacminde üç tekrar olacak şeklinde gerçekleştirildi. Reaksiyon 50^{o}C'de 2 dk ve 95^{o}C'de 10 dk, takiben 40 döngü olarak gerçekleşti.95^{o}C'de 15 sn ve 60^{o}C 1 dk olarak inkübe edildi. Çalışmalardaki eşik siklüs değeri (CT); reaksiyon ortamındaki floresan miktarının sabitlenmiş eşik değerini geçtiği siklusun kesirli ifadesi olarak kullanılacaktır. Sonrasında CT değerleri mutlak kopya sayılarına dönüştürülecektir. B-Actin kontrolü kullanılarak bütün cDNA örnekleri normalize edildi. "Kalıp içermeyen" ve "enzim içermeyen" kontroller kullanılarak genomik DNA varlığı ve reaksiyon özgüllüğü kontrol edildi. Tekrarlanabilirliği göstermek içinse üç bağımsız deney gerçekleştirildi.

$\triangle Ct$ = Ct hedef gen-Ct referans gen

$\triangle\triangle Ct$= $\triangle Ct$ muamele edilen- $\triangle Ctkontrol$

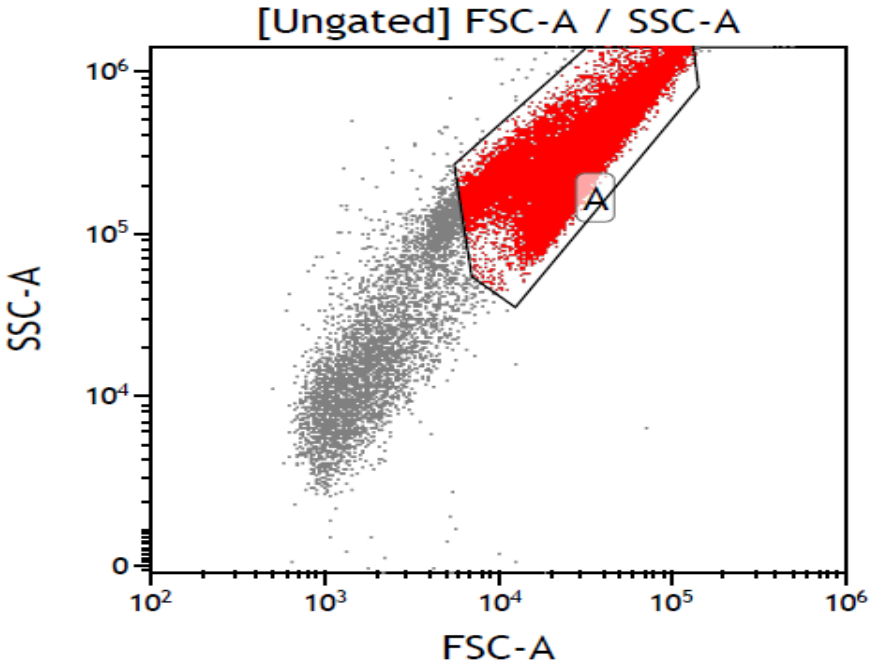
Ekspresyon oranı = $2^{-\triangle\triangle Ct}$

Real time sonuçları bu formül ile hesaplanarak grafikler elde edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

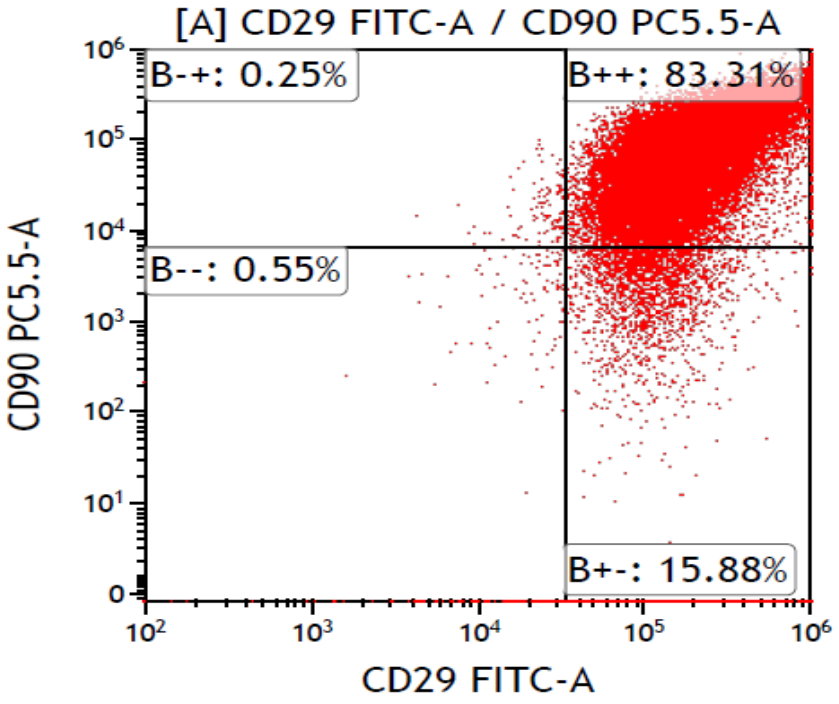
4.1. Bulgular

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

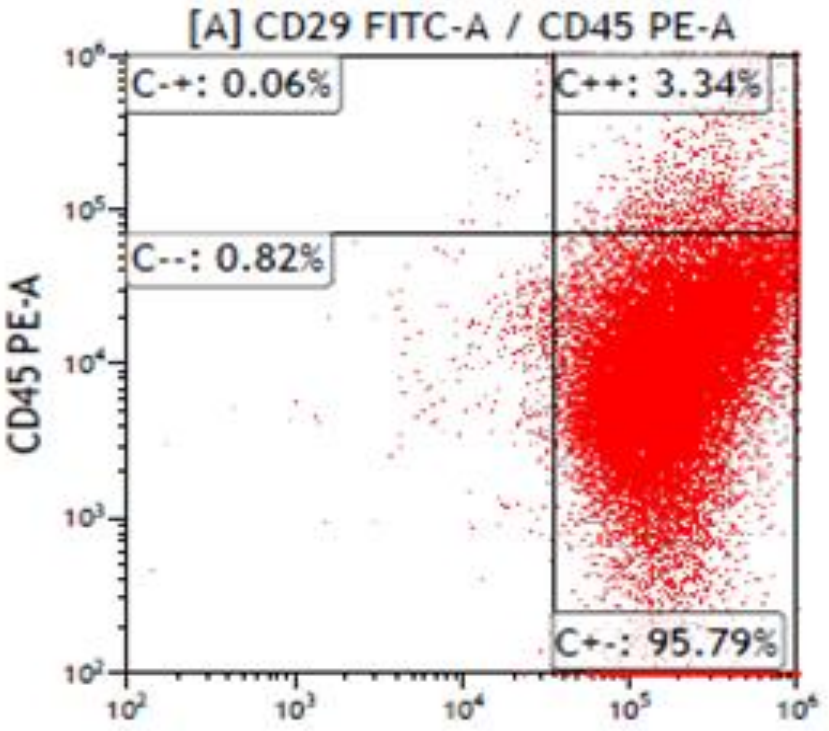


Şekil 4.1. Granülütesi side scatter (SSC) ve büyüklüğü forward scatter (FSC) olarak P_5 de hücrenin genel popülasyonu akım sitometrisinde değerlendirildi.

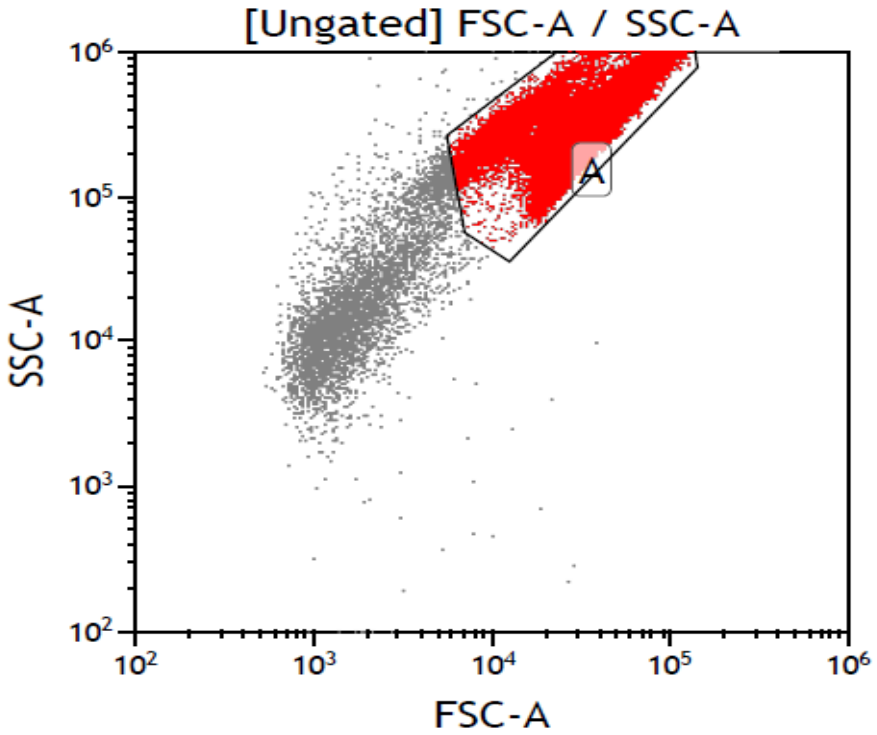
Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreleri belirlenmesinde pozitif yüzey belirteçleri olarak CD90,CD29 kullanılmıştır. Hücrelerin 5.pasajından elde ettiğimiz veriler doğrultusunda kullandığımız pozitif belirteçlerin ekspresyon düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır.(şekil 1 b,c)



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

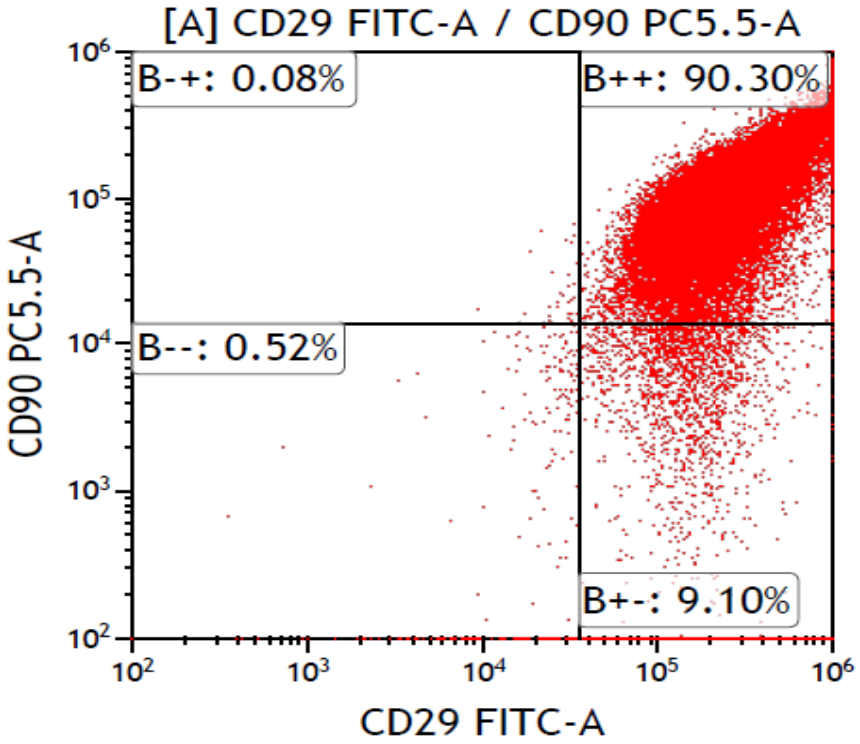


Şekil 4.3. Pasaj 5'te akım sitometrisinde kullanılan CD45 ve CD29 yüzey markerlerinin hücre populasyonu yönünden yoğun olduğu tespit edilmiştir.

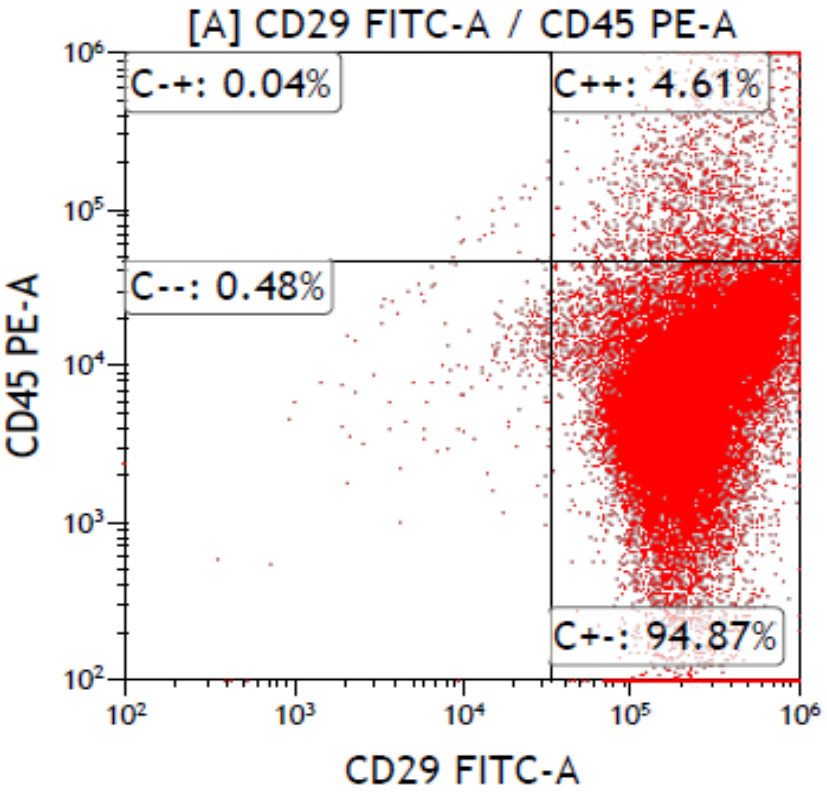


Şekil 4.4. Pasaj 6'da granülüte side scatter (SSC) ve büyüklüğü forward scatter (FSC) olarak P_6 da hücrenin genel popülasyonu akım sitometrisinde değerlendirildi.

Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreleri belirlenmesinde pozitif yüzey belirteçleri olarak CD90,CD29 kullanılmıştır. Hücrelerin 6.pasajından elde ettiğimiz veriler doğrultusunda kullandığımız pozitif belirteçlerin ekspresyon düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır.(şekil 7 e,f)

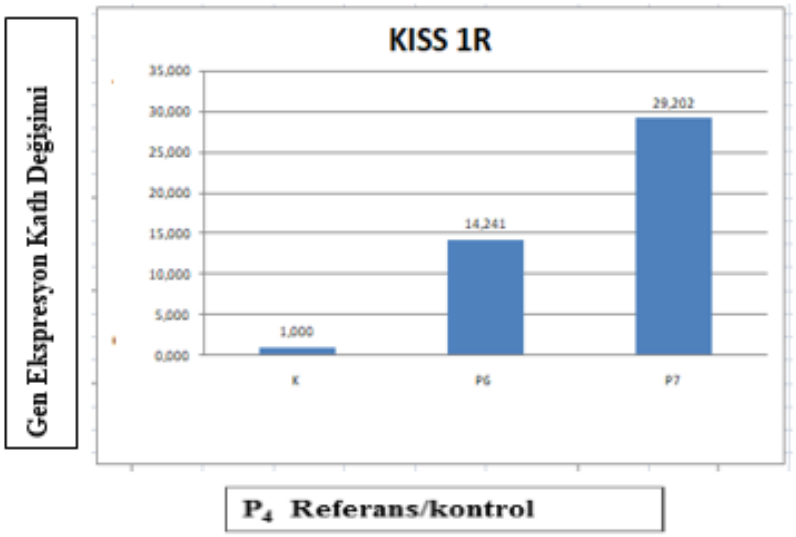


Şekil 4.5. Pasaj 6'da akım sitometrisinde kullandığımız pozitif yüzey belirteçlerinin (CD90,CD29) mezenkimal kök hücrede (MSC) olduğu saptanmıştır.

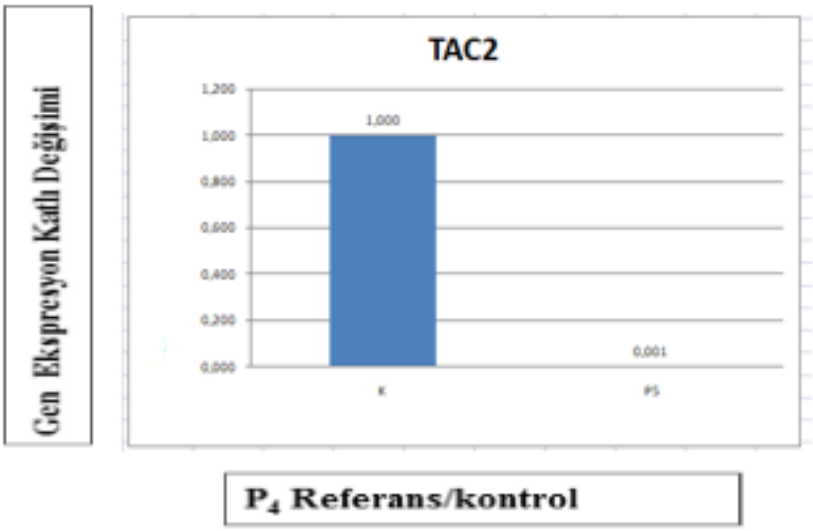


Şekil 4.6. Pasaj 6'da akım sitometrisinde kullanılan CD45 ve CD29 yüzey markerlerinin hücre populasyonu yönünden yoğun olduğu tespit edilmiştir.

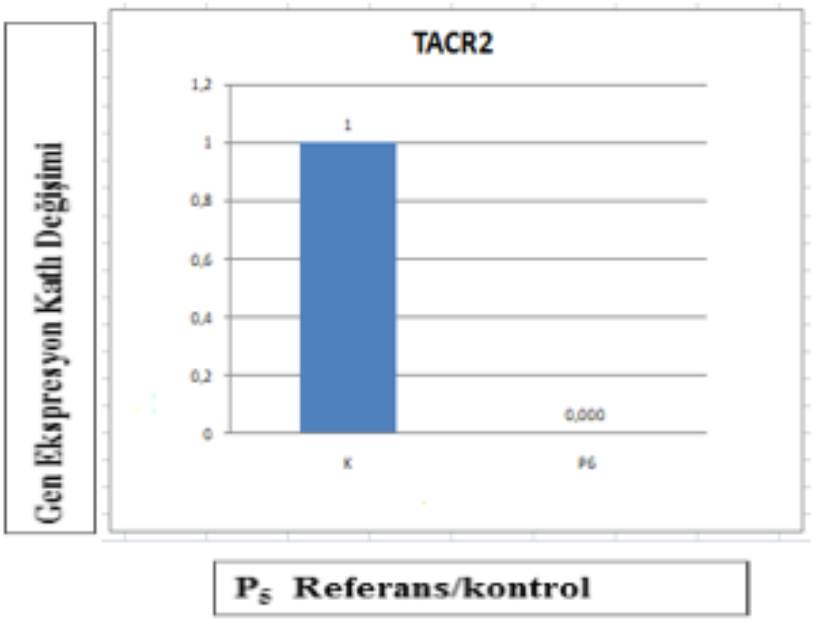
Real-Time Sonuçları



Şekil 4.7. Kisspeptin reseptör geni için P_4 grubu referans alındığında P_6 ve P_7 örneklerinin katlı değişimleri



Şekil 4.8. Taşikinin de P_4 grubu referans alındığında P_5 örneğinin katlı değişimi



Şekil 4.9. Taşikinin reseptör geninde P_5 grubu referans alındığında P_6 örneklerinin katlı değişimi

4.2. Tartışma

M. L. GOTTSCH ve arkadaşları farede Gonadotropin salgısının düzenlenmesinde kisspeptinlerin rolü hakkında bir çalışma yapmışlardır.Bu çalışmada kisspeptinlerin fonksiyonel anatomisi hakkında daha fazla bilgi edinmek için, hipotalamusta KiSS-1 mRNA dağılımının haritasını çıkarmışlar.KiSS-1 mRNA'nın, anteroventral periventriküler çekirdek, periventriküler çekirdek ve kavisli çekirdek dahil olmak üzere gonadotropin salgılanmasının nöroendokrin düzenlemesinde yer alan hipotalamus alanlarında eksprese edildiğini gözlemlemişlerdir.Kisspeptin-GPR54 sinyalinin, GnRH'nin hipotalamik salgılanmasını yöneten hipotalamik devrenin bir parçası olabileceği sonucuna varmışlardır.Sonuçlar,Kisspeptin-54 veya Kisspeptin-10 bir ICV enjeksiyonu yoluyla uygulandığında, Kisspeptin-54 ve Kisspeptin-10'un yetişkin erkek farelerde LH salınımını uyardığını göstermişlerdir.

Doğrudan lateral serebral ventriküle verilen kisspeptin-54'ün LH ve FSH sekresyonunu uyardığını göstermişlerdir. Kisspeptin-54, 1 fmol kadar düşük dozlarda gonadotropin salgılanmasını sağlaması bakımından dikkat çekmiştir.

Diğer nöropeptidler için tam doz-yanıt eğrilerini ve bunların yetişkin erkek farede LH salgılanması üzerindeki etkilerini gösteren, doğrudan karşılaştırılabilir hiçbir çalışma yoktur; bununla birlikte, nöropeptit Y, galanin ve galanin benzeri peptit gibi diğer nöropeptitlerin tek etkili dozları ve glutamat ve N-metil gibi uyarıcı amino asitler üzerine yapılan çalışmalara dayanmaktadır. -d-aspartat, çeşitli kemirgen türlerinde, kisspeptin-54'ün, LH için bu diğer sekretagogların herhangi birinden birkaç derece daha güçlü olduğu gösterilmiştir.

Yaptıkları çalışma sonuçlarına göre ayrıca, Kisspeptin-54'ün gonadotropin salınımını uyarma yeteneğinin GnRH salgılamasına bağlı olduğunu da göstermektedir. Kisspeptinler ve reseptörlerinin, nöroendokrin üreme eksenini yöneten hipotalamik devrenin bir parçası olduğu sonucuna varmışlardır.(Gottsch ve ark, 2004)

Jeon ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada ise insan kemik iliği (BM-Bone marrow), plasenta (PL-placenta) ve yağ dokusu (Adipoz tissue-AT) dahil olmak üzere farklı kaynaklardan gelen MSC'leri fenotip, yüzey antijen ekspresyonu, farklılaşma yeteneği, proteom referans haritası ve kan akışı geri kazanımı açısından karakterize etmişlerdir. Mezenkimal kök hücreler benzer fenotipik ve yüzey antijeni ekspresyonuna sahip olmalarına rağmen hücresel kaynağa bağlı olarak farklı farklılaşma potansiyellerine sahip olduklarını belirtmişlerdir. Özetle, çeşitli hücresel kaynaklardan elde edilen MSC'ler için farklı şekilde ifade edilen anahtar düzenleyici faktörleri incelemişler ve farklı şekilde ifade edilen proteom profillerini göstermişlerdir.

Materyal metot da ise şu adımları yapmışlardır. İlk olarak hücre kültür aşamasıdır. Hücrü kültürü aşamasında 3. ve 4. pasajlar kullanılmıştır. Biz ise kendi tezimizde 4. 5 ve 6. Pasajları kullarak mezenkimal kök hücre elde ettik.

Daha sonra ise üç farklı hücresel kaynaktan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin flow sitometrisi ile farklılaşması incelenmiştir.. Jeon ve arkadaşları flow sitometride CD73, CD90, CD105, CD44 ve CD45 yüzey antijenleri kullanılmış biz ise CD90, CD45 ve CD29 yüzey antijenlerini kullanarak flow sitometrisinde elde ettiğimiz kök hücrenin mezenkimal kök hücre olup olmadığını tespit ettik. (Jeon ve ark, 2016)

NorhayatiYusop ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları çalışmada sıçan kemik iliğinden ve kompakt kemik hücrelerinden mezenkimal kök hücre izole etmişler ve osteojenik/adipojenikdokuya farklılaşmasını incelemişlerdir. Kemik içinde, mezenkimal stromal hücreler (MSC'ler), kemik iliği stroması (BM-MSC) ve endosteal niş içinde, kompakt kemiği kaplayan hücreler (CB-MSC'ler) olarak bulunur. Bu yaptıkları çalışmada, her bir nişten heterojen MSC popülasyonlarını izole edilip ve karakterize edildi. Ardından kapsamlı hücre genişlemesinin etkilerini araştırmışlardır, popülasyon ikiye katlamalarını (PD'ler)/hücresel yaşlanmayı, koloni oluşturan etkinlikleri (CFE'ler), MSC hücre belirteci ekspresyonunu ve osteojenik/adipojenik farklılaşmayı analiz etti. Biz de çalışmamızda sıçan kemik iliğinden mezenkimal kök hücre izole ettik ve pasaj sayılarına göre bazı genlerin ifadesini incelemişlerdir.

BM-MSC'lerin Kemik İliğinden İzolasyonu ve Kültürü: Altı oyuklu plakalar, +PBS içinde sulandırılmış 1 ml/kuyucuk 10 ug/ml insan plazma fibronektin ile kaplandı, ve 4°C'de 24 saat bırakıldı.28 günlük erkek Wistar sıçanlarından femur ve humerus aseptik olarak disseke edilmiştir, tüm bağ dokularından temizlenmiş ve buz üzerinde 10 ml izolasyon ortamında, ribonükleositler ve deoksiribonükleositler ile aMEM içinde toplanmıştır. , %10 antibiyotik-antimikotik ile desteklenmiştir. Kemik iliği hücreleri, her uzun kemiğin, %20 ısıyla inaktive edilmiş fetal sığır serumu (FBS), %1 antibiyotik-antimikotik ve 100 um içeren aMEM içeren 10 ml tam kültür ortamı (CCM) ile yıkanmasıyla toplandı. L-askorbik asit 2-fosfat ve 70 um'lik bir naylon hücre süzgecinden T-75 doku kültürü süzüldü. Hücreler 37°C'de, %5 CO2'de inkübe

edildi ve yapışmayan hücreler, 24 saat sonra ortam değişikliği ile çıkarılmıştır. Yapışkan hücreler, 37°C'de, %5 CO_2'de CCM'de kültürlenmiştir. Kültür ortamı 2-3 günde bir değiştirildi. Kendi çalışmamızda da yukarıdaki protokole benzer şekilde izolasyon yaptık. 3 adet sıçandan femur ve tibia kemikleri alındı ve bu kemiklerden kemik iliği izole edildi. Hücre ortamında %15 FBS kullanıldı ve antikor olarak penisilin/streptomisin tercih edildi.

Sıçan Kemik Yongası Eksplantı CB-MSC'lerinin İzolasyonu ve Kültürü: Yukarıdan alınan uzun kemik kalıntılarından, diyafiz 1-3 mm2 kemik yongaları halinde kesildi ve αMEM içinde 3 mg/ml kollajenaz II içinde 37°C'de 2 saat hafifçe çalkalanarak sindirildi. Sindirim ortamı ve serbest bırakılmıştır hücreler çıkarılmış ve kemik parçaları üç kez 5 ml CCM ile yıkanmıştır. Sindirilen kemik parçaları daha sonra CCM ile 37°C'de, %5 CO2'de inkübe edilmiştir.. 3. günde, kemik yongaları ve yapışmayan hücreler, PBS ile yıkanarak atıldı ve kalan yapışık hücreler, koloni oluşumuna ve genişlemesine izin vermek için kültürlenmiştir. Kültür ortamı 2-3 günde bir değiştirilmiştir.

Ters Transkripsiyon PCR: Toplam RNA, RNeasy® Mini kiti ve QIAShredder kullanılarak ekstre edildi. RNA saflığı ve miktarı 260 nm/280 nmabsorbansta belirlendi. cDNA, 5 µl 5X Moloneymurin lösemi virüsü (M-MLV) tamponu, 0.5 µg rastgele primerler, 0.625 µl RNasin, 1.25 µl deoksinükleotittrifosfatlar (dNTP'ler; 10 mM) ve 1 µl M-MLV kullanılarak 500 ng toplam RNA'dan sentezlendi. reverstranskriptaz, DNaz içermeyen su, 37°C'de 1 saat, ardından 95°C'de 5 dakika süreyle 15 µl'ye sulandırılmıştır. cDNA, 1 ul rastgele primer (Promega) kullanılarak 500 ng toplam RNA'dan sentezlenmiştir, RNAaz içermeyen suya 15 ul'lik bir son hacme eklenmiştir. Örnek 70°C'de 5 dakika çalıştırılmıştır. 5 ul 5 x Moloneymurin lösemi virüsü ters transkriptaz (MMLV) reaksiyon tamponu, 3.4ul 10 mMdNTP, 0.6 ulRNasin ve 1 ul MMLV ters transkriptaz ve 15 ul rastgele primer/RNA karışımı içeren RT reaksiyon karışımı hazırlanmış ve yeniden oluşturulmuştur. DNaz içermeyen su (tümü Promega) ile 25 µl'ye kadar ve bir termocycler içinde 37°C'de 1 saat boyunca

gerçekleştirilmiştir. Bir negatif kontrol olarak bir reaksiyon karışımı eksi mRNA hazırlanmıştır. PCR, 1 µl cDNA ve reaksiyon reaktifleri 5 µl 5 × tampon, 0.5 µl 10 mMdNTP, 1.25 µl 10 µm ileri ve geri primer (Tablo 1, Primer Design Ltd., Southampton, UK'de gösterildiği gibi), 1 µl 25 mM magnezyum klorür ve 0.25 µl Taq polimeraz, RNAaz içermeyen su (Promega) ile reaksiyon başına 25 µl'ye yeniden yapılandırılmıştır. β-Actin, bir temizlik geni olarak kullanılmıştır. Reaksiyonlar, 5 dakika boyunca 94°C'lik bir başlangıç denatüre etme aşaması, ardından 1 dakikalık 35 döngü, 30 saniyelik 94°C denatüre etme aşaması, 30 s'lik 55°C tavlama aşaması, 72°C uzatma ile bir termocycler içinde gerçekleştirilmiştir. 7 dakika boyunca 72°C'lik son bir uzatma adımı ile. 52°C tavlama sıcaklığı kullanan Nanog, Oct4, CD73 ve CD105 ve 62°C tavlama sıcaklığı kullanan osteokalsin hariç tüm primerlere aynı koşullar uygulanmıştır.. Ürünler %2 agaroz jeller kullanılarak ayrılmıştır ve UV ışığında görüntülenmiştir.. Biz de çalışmamızda yukarıdakine benzer bir RT-PCR protokü uyguladık. PCR da 4., 5. ve 6. Pasajlardaki mezenkimal kök hücrelerin kisspeptin ve nörokinin ekspresyonunu inceledik. NorhayatiYusop ve arkadaşlarımezenkimal kök hücrelerin yüzey belirteçlerini agoroz jelde görüntülerken biz farklı olarak yüzey belirteçlerini(CD29, CD90 ve CD90)flowsitometride inceledik.

Sonuç: CB-MSC'ler ve BM-MSC'ler benzer morfolojiler ve PD'ler göstererek 100 PD'ye ulaşmıştır.. Her iki popülasyon da tutarlı telomer uzunlukları (12-17 kb), minimum yaşlanma ve pozitif telomeraz ifadesi sergilemiştir. CB-MSC'ler (PD15), PD50'den önemli ölçüde daha düşük CFE'lere sahipti. CB-MSC'ler ve BM-MSC'lerin her ikisi de MSC'yi (CD73/CD90/CD105) ifade etmiştir.; embriyonik (Nanog) ve osteojenik belirteçler (Runx2, osteokalsin) ama hematopoietik belirteç (CD45) yok. CB-MSC'ler (PD15), Oct4 ve p16INK4A'yı güçlü bir şekilde ifade etmiştir.. Erken PD'lerde, CB-MSC'ler, adipogenez için güçlü bir osteojenik potansiyele ve düşük bir potansiyele sahipken, BM-MSC'ler, osteogenez ve adipogenez için daha büyük bir genel çift potansiyele sahipmiş. PD50'de, CB-MSC'ler, eşdeğer PD'lerde BM-MSC'lere kıyasla hem osteogenez

hem de adipogenez için düşük potens göstermiştir. Buna göre CB-MSC'ler ve BM-MSC'ler arasındaki proliferatif ve mezenkimal hücre özelliklerinde benzerlikler gösterir, ancak çok potansiyelliliğe zıttır. Bu tür bulgular, insan CB-MSC'leri ve BM-MSC'lerinin daha fazla karşılaştırmasını desteklemekte ve rejeneratif tıp amaçları için optimal MSC popülasyonlarının seçimini kolaylaştırmaktadır. Bizim çalışmamızda BM-MSC'ler daha önceki çalışmalarla benzer morfoloji sergiledi. Flow sitometride BM-MSC'lerin MSC ifade eden CD90 ve CD29 u taşırken hematopoietik belirteç olan CD45 i taşımadığını gözlemledik. Ayrıca RT-PCR 'da kisspeptin ve nörokininin BM-MSC'lerde ifade olmadığını gözlemledik.(Yusop ve ark, 2018)

Artur Pałasz ve arkadaşları 2020 yılında yaptığı çalışmada bir proopiomelanokortin modülatörü olarak Essitalopram, kisspeptin, erkek sıçan beyninde Kiss1R ve MCHR1 gen ifadelerini incelemişlerdir.

Nöropeptitler, sinir sisteminin önemli, çok işlevli düzenleyici faktörleridir ve yeni, atipik antidepresan etki bölgeleri olarak kabul edilmiştir. Seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) gibi bazılarının çeşitli beyin bölgelerinde peptiterjik yolları etkileyebildiği zaten kanıtlanmışlardır.

Bu raporlara rağmen, şu ana kadar SSRI'larla tedavinin beyin proopiomelanokortin (POMC), kisspeptin, Kiss1R ve MCHR1 gen ekspresyonu üzerindeki etkisine ilişkin herhangi bir rapor bulunmamıştır. Yapılan bu mevcut çalışmada, kantitatif Real- Zaman PCR yapılmıştır. Essitalopram ile uzun süreli tedavi, sıçan amigdalasında MCHR1 ekspresyonunun yükselmesine yol açtı. Amigdalada Kisspeptin mRNA seviyesi de artmış, ancak Kiss1R mRNA ekspresyonları hipokampus, hipotalamus ve beyincikte yükselmiştir. POMC mRNA ifadeleri sırasıyla hipokampus, amigdala, beyincik ve beyin sapında azaldı. Bu sonuçlar, bu nöropeptitlerin, SSRI antidepresanlarının bölgeye bağlı eylemlerine dahil olabileceği hipotezini destekleyebilir. Bu, hayvan beyninde essitalopramın POMC, kisspeptin, Kiss1R ve MCHR1 üzerindeki etkilerinin ilk raporudur. Bulgularda , SSRI'ların farmakolojisine yeni bir ışık tuttu ve alternatif,

nöropeptid bağımlı antidepresan etki modlarının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabileceğini göstermişlerdir.Biz ise çalışmamızda sıçan kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerinin farklı pasaj sayılarında PCR da kisspeptin ve nörokinin ekspresyonlarını inceledik. (Patasz ve ark, 2020)

Satish PATKI ve arkadaşları 2010 yılında insan anne sütü zengin bir multipotent mezenkimal kök hücre kaynağı olmasıyla ilgili çalışmalar yapmışlardır.

Varsayılan kök hücreler, eklem sıvısı, amniyotik sıvı vb. gibi çeşitli doku sıvılarından izole etmişlerdir. Son zamanlarda, insan anne sütünde nestin pozitif varsayılan meme kök hücrelerinin varlığını rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, multipotent doğa gösterip göstermedikleri açık değildir. İnsan anne sütü invaziv(zararlı olmayan) olmayan bir meme kök hücresi kaynağı olduğundan, bu kök hücrelerin doğasını incelemekle ilgilenmişlerdir. Bu arayışta, insan anne sütünden mezenkimal kök hücre benzeri bir populasyonu izole etmeyi ve genişletmeyi başarabileceklerini anlamışlardır.

Bu kültürlenmiş hücreler immünofloresan etiketleme ile incelemişler ve mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri CD44, CD29, SCA-1 için pozitif bulunmuş ve CD33, CD34, CD45, CD73 için negatif bulunmuş ve mezenkimal kök hücreler olarak kimliklerini doğrulamışlardır. Hücre iskeleti protein belirteç analizi, bu hücrelerin mezenkimal kök hücre belirteçlerini, yani nestin, vimentin (proteinlerin ara filaman (İng. intermediate filament) ailesinin birüyesidir),düz kas aktinini eksprese ettiğini ve ayrıca erken pasajlarında epitelden mezenkimal geçiş belirteci olan E-Cadherin'in varlığını ortaya koymuşlardır.

Ayrıca, bu hücrelerin multipotent farklılaşma potansiyelini test etmişler ve spesifik farklılaşma kokteyllerinin etkisi altında adipojenik, kondrojenik ve osteojenik soylara farklılaşabildiklerini bulmuşlardır. Bu, insan anne sütünden izole edilen bu mezenkimal kök hücrelerin potansiyel olarak birçok insan dokusunu oluşturmak için "yeniden programlanabileceği" anlamına gelmektedir. İnsan sütünde multipotent kök hücrelerin varlığı, anne sütünün otolog (İnsanın kendi

vücudundan hücrelerin kullanıldığı nakillere *otolog* nakil denir)kök hücre tedavisi için alternatif bir kök hücre kaynağı olabileceğini düşündürmektedir,

Daha sonra ise hücre izolasyonu ve kültür aşamasını gerçekleştirmişlerdir. İzole edilen hücrelerin immünositokimya ve akış sitometrisi kullanılarak karakterizasyonu yapılmıştır.Flow sitometrisi için hücrelerin 4,5 ve 6. Pasajları kullanmışlardır. Ve flow sitometride CD33, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90 ve CD117 antikorları kullanılmıştır.Aynı zamanda bu çalışmada Adipojenik, kondrojenik, osteojenik farklılaşmada yapılmıştır.

Sonuç olarak, insan anne sütü hücrelerinin kök hücre özellikleri gösterdiğine ve farklılaşma kokteylinin etkisial altında çeşitli soylara farklılaşabildiğine dair doğrudan kanıt sunmuşlardır. Bu hücre modeli, farklı hücre alt tiplerinin, soy-spesifik uç hücreler üretmek için değerlendirildiği yeni bir alan açacağını göstermişlerdir.Bizim yaptığımız tez çalışmasında ise öncelikle kemik iliğinden mezenkimal kök hücre izolasyonu yapılmıştır.Kültür aşamasından sonra bizde çalışmamızda flow sitometrisini kullandık bunun için ise 4,5 ve 6. Pasajları bu tez çalışmasında olduğu gibi bizde kullandık.Aynı zamanda flow sitometrisi için biz ise CD90,CD29 ve negatif olarak ise CD45 kullandık.Ayrıca biz çalışmamızda kültür aşamasından sonra real time ile kisspeptin ve nörokinin gen ekspresyonlarına bakıldı.(Patki ve ark,2010)

Owen G Davies ve arkadaşları 2015 yılında yaptığı çalışmada ise CD29 ve CD90 kullanılarak adipoz ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu, osteojenik ve adipojenik farklılaşma kapasitelerini değiştirmesiyle ilgili bir çalışma yapmışlardır. Owen G Davies ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmanın amacı, sıçan adipoz ve kemik iliği dokularından CD29+/CD90+ hücreleri için hücre sınıflandırmasının, kök hücre ile ilişkili genlerin farklılaşması ve ekspresyonu üzerindeki etkilerini incelemek olmuştur.

Yaptıkları çalışmada akış sitometrisi, adipoz ve kemik pasajı 1'de %66 ve %78 CD29+/CD90+ pozitifliği göstermişlerdir.CD29+/CD90+ hücreleri, sırasıyla alizarin red ve Oil Red-O boyama ile belirlendiği üzere, sınıflandırılmamış

hücrelere kıyasla hem osteojenik hem de adipojenik farklılaşmada bir azalma gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu bulgular, floresanla aktive olan hücre sınıflandırmasının neden olduğu hücre hasarı ile tamamen açıklanmamıştır, çünkü sıralama geri kazanımı, adipoz türevli hücrelerde yalnızca mütevazı bir şekilde etkilenmiştir. Hücreleri floresanla aktive olan hücre ayırma tamponunda tutmak için yağdan türetilen hücre canlılığını etkilememiştir, ancak kemik iliği kaynaklı hücre canlılığında önemli bir azalma bulunduğunu tespit etmişlerdir. Ek olarak, CD29+/CD90+ seçimi, adipoz türevli hücre kültürlerinde Lin28, Sox2, Nanog ve CD73 ekspresyonunda önemli bir azalma ile ilişkilendirilirken, sıralanmış kemik iliği kaynaklı hücre kültürlerinde kök hücre ile ilişkili gen ekspresyonunda farklılıklar gözlenmediğini belirtmişlerdir. Özetle, bu çalışma, floresanla aktive olan hücre sınıflandırmasının yağdan türetilen hücreler ve kemik iliğinden türetilen hücreler üzerinde farklı etkilere sahip olduğunu ve her iki CD29+/CD90+ hücresinin osteojenik/adipojenik farklılaşma için önemli ölçüde azaltılmış bir kapasite sergilediğini göstermiştir. Sonuç olarak, mezenkimal kök hücre popülasyonu içinde heterojenliğin korunmasının optimal farklılaşma için önemli olabileceğini belirlemişlerdir.

Sonuç olarak, bu çalışma, sıçan adipoz ve kemik iliği dokularından izole edilen CD29+/CD90+ hücrelerinin, TCP(doku kültürü polistiren)-bağlılığı kullanılarak izole edilen MSC'ler ile karşılaştırıldığında, daha düşük bir farklılaşma kapasitesi sergilediğini göstermiştir. Bu çalışmanın sonucunda, farelerden multipotent hücrelerin izolasyonu için CD29+/CD90+ ön sınıflandırmasının en uygun seçim kriteri olmayabileceğini belirledik. Ayrıca, MSC kültürleri içinde heterojenliğin korunmasının, gelişmiş farklılaşma için faydalı olabileceğini belirledik. Klinik öncesi çalışmalarda kullanılabilecek doğru ve çevrilebilir doku mühendisliği modelleri sağlamak için sıçan MSC'lerinin daha fazla karakterizasyonunun gerekli olacağını kabul edilmiştir.Son olarak, bulgularda ayrıca translasyonel doku rejenerasyon uygulamaları için MSC izolasyonu için küvet bazlı akış sitometrisinin kullanımına yönelik çıkarımlara sahiptir. Doku

mühendisliğinden önceki MSC'lerin izolasyonu için bu akış sitometrisi yönteminin yaygınlığı göz önüne alındığında, hücre sınıflandırması sırasında yaşanan hidrodinamik kuvvetlerin hücresel fonksiyon üzerindeki etkilerine ilişkin daha ileri çalışmalar önemli olduğu sonucuna varılmıştır.(Davies ve ark, 2015)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçlarına göre kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrede kisspeptin ve nörokininin pasaj sayısına göre ilişkisini inceledik.

Kisspeptin reseptör geni için kontrol grubumuzu 1, referansımızı P_4 alınarak P_6 ve P_7kıyasladığımızda pasaj sayısı arttıkça gen ifadesininde arttığı sonucuna ulaştık.

Taşikinin geninde ise P_4 grubu referans alındığında P_5 neredeyse tamamen baskılanmıştır.

Taşikinin reseptör geninde ise P_5 grubu referans alındığında P_6 örnekleri tamamen baskılanmıştr.Bu sonuçta bize taşikinin ve reseptörünün korele bir şekilde azaldığını olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda 4,5 aylık sıçanları kullandık ilerleyen aşamalarda ise daha fazla gelişmiş sıçanların daha iyi sonuç alınabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda mezenkimal kök hücreden farklı bir gen ifadesine bakılabilir.

Çalışmamızın sonuçları puberteye geçişte önemli rol oynayan kisspeptin ve nörokininin gen ifadelerini incelerken pasaj sayılarına dikkat edilmesi gerektiğini ve aynı zamanda daha ileri pasaj sayısından da incelememiz gerektiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

Akgün, I. (2016). Mezenkimal kök hücre.

Artaş, Z. D. (2009). Gebeliğin hipertansif hastalıklarında serum sitokin ve plazma kisspeptin düzeylerinin araştırılması/Investigation of the serum cytokines and plasma kisspeptin levels in hypertensive disorders of the pregnancy.

Ateş, U. (2016). Kök hücreyi tanıyalım.

Biehl, J. K.,& Russell, B. (2009). Introduction to stem cell therapy. The Journal of cardiovascular nursing, 24(2), 98.

Brunt, K. R., Weisel, R. D., & Li, R. K. (2012). Stem cells and regenerative medicine—future perspectives. Canadian journal of physiology and pharmacology, 90(3), 327-335.

Can A. A Concise Review on the Classification and Nomenclature of StemCells. Turk J Haematol 2008;25:57-9.

Cheng, G., Coolen, L. M., Padmanabhan, V., Goodman, R. L., & Lehman, M. N. (2010). The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep. Endocrinology, 151(1), 301-311.

Çapkın Yurtsever, M. E. R. V. E., Çakmak, S., & Gümüşderelioğlu, M. Sıçan Kemik İliğinden ve Yağ Dokusundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL PCL Kollajen Nanofibröz Yüzeylerde Nöronal Hücre Dizilerine Farklılaştırılması.

Çetin D.(2011). Prematür Telarşın oluşumunda plazma ve kisspeptin düzeyinin rölü

Çetin, İ.(2011)Kordon Kanından Elde Edilen Kök Hücrelerin Diferansiyasyonu, Moleküler Ve Biyokimyasal Analizleri.

d'Anglemont de Tassigny, X.,& Colledge, W. H. (2010). The role of kisspeptin signaling in reproduction. Physiology, 25(4), 207-217.

Davies, O. G., Cooper, P. R., Shelton, R. M., Smith, A. J., & Scheven, B. A. (2015). Isolation of adipose and bone marrow mesenchymal stem cells using CD29 and CD90 modifies their capacity for osteogenic and adipogenic differentiation. Journal of Tissue Engineering, 6, 2041731415592356.

Dhillo, W. S. (2008). Kisspeptin: a novel regulator of reproductive function. Journal of neuroendocrinology, 20(8), 963-970.

Eyuboğlu S.(2018) Kisspeptin Nöronlarının Sinaptik Bağlantılarının Fonksiyonel Ve Anatomik Karakterizasyonu

Fortier LA. Stemcells: classifications, controversies, and clinical applications. VetSurg 2005;34: 415-23.

Gottsch, M. L., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2009). From KISS1 to kisspeptins: an historical perspective and suggested nomenclature. Peptides, 30(1), 4-9.

Gottsch, M. L., Cunningham, M. J., Smith, J. T., Popa, S. M., Acohido, B. V., Crowley, W. F., ... & Steiner, R. A. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. Endocrinology, 145(9), 4073-4077.

Hu L, Hu J, Zhao J, Liu J, Ouyang W, Yang C, et al. Side-by-sidecomparison of thebiologicalcharacteristics of humanumbilicalcordandadiposetissue-derivedmesenchymalstemcells. BiomedResInt 2013;2013:438243.

İpek, P. (2018). Ratlarda anti-müllerian hormon, kisspeptin 1 ve kisspeptin 1 reseptör düzeylerinin incelenmesi/The investigation of levels of anti-mullerian hormone, kisspeptin 1 and kisspeptin 1 receptor in rats.

Jayasena, C. N., Dhillo, W. S., & Bloom, S. R. (2009). Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in humans. Peptides, 30(1), 76-82.

Jeon, Y. J., Kim, J., Cho, J. H., Chung, H. M., & Chae, J. I. (2016). Comparative analysis of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, placenta, and adipose tissue as sources of cell therapy. Journal of cellular biochemistry, 117(5), 1112-1125.

Kafa, İ. M.,& Eyigör, Ö. (2011). Kisspeptinler ve kisspeptin nöronları: Üreme sistemi üzerine etkileri ve hipotalamik yerleşimleri. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 37(1), 53-60.

Karakaya, A. (2013). Kök hücre çalışmaları ve etik: Türkiye'de insan embriyosundan elde edilen kök hücreler üzerinde yapılan çalışmalarda etik sorunlar (Master's thesis, Fatih Sultan Mehmet Vakıf Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü).

Kaya A.(2014).Yenidoğan Döneminde Meme Büyümesi Olan Bebeklerde Plazma Kisspeptin Düzeyleri.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cordblood, oradipose tissue. StemCells 2006;24:1294-301.

Koca, R. Ö. (2019). Nörokinin 3 reseptörünün sıçan deneysel alzheimer modelinde kognitif davranışlar üzerine etkisi.

Kolios, G.,& Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. Respiration, 85(1), 3-10.

Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J. M., Le Poul, E., ... & Parmentier, M. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. Journal of Biological Chemistry, 276(37), 34631-34636.

Lee, L. C. Y. (2016). Investigation of mesenchymal stem cell response to bioactive nanotopography (Doctoral dissertation, University of Glasgow).

Lehman, M. N., Coolen, L. M., & Goodman, R. L. (2010). Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. Endocrinology, 151(8), 3479-3489.

Longmore, J., Hill, R. G., & Hargreaves, R. J. (1997). Neurokinin-receptor antagonists: pharmacological tools and therapeutic drugs. Canadian journal of physiology and pharmacology, 75(6), 612-621.

Matur, İ.,& Solmaz, S. (2011). Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 20(3), 168-186.

Muir, A. I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N. A., Michalovich, D., Moore, D. J., Calamari, A., ... & Harrison, D. C. (2001). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. Journal of Biological Chemistry, 276(31), 28969-28975.

Nauta, A. J.,& Fibbe, W. E. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 110(10), 3499-3506.

Özen, A.,& Gül Sancak, İ. (2014). Mezenkimal kök hücreler ve veteriner hekimlikte kullanımı.

Page, N. M. (2004). Hemokinins and endokinins. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 61(13), 1652-1663.

Pałasz, A., Piwowarczyk-Nowak, A., Suszka-Świtek, A., Bogus, K., Filipczyk, Ł., Della Vecchia, A., ... & Wiaderkiewicz, R. (2020). Escitalopram as a modulator of proopiomelanocortin, kisspeptin, Kiss1R and MCHR1 gene expressions in the male rat brain. Molecular Biology Reports, 47(10), 8273-8278.

Patki, S., Kadam, S., Chandra, V., & Bhonde, R. (2010). Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. Human cell, 23(2), 35-40.

Plant, T. M. (2006). The role of KiSS-1 in the regulation of puberty in higher primates. European journal of endocrinology, 155, S11-6.

Rajabzadeh, N., Fathi, E., & Farahzadi, R. (2019). Stem cell-based regenerative medicine. Stem cell investigation, 6

Sağsöz, H.,& Ketani, M. A. (2008). Kök hücreler. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, (2), 29-33.

Seminara, S. B., Messager, S., Chatzidaki, E. E., Thresher, R. R., Acierno Jr, J. S., Shagoury, J. K., ... & Colledge, W. H. (2003). The GPR54 gene as a regulator of puberty. New England Journal of Medicine, 349(17), 1614-1627.

Severini, C., Improta, G., Falconieri-Erspamer, G., Salvadori, S., & Erspamer, V. (2002). The tachykinin peptide family. Pharmacological reviews, 54(2), 285-322.

Shıkhaliyeva, İ. (2015). Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasının bor katkılı HAp-kaplı kitosan doku iskelelerinde incelenmesi.

Stout, S. C., Owens, M. J., & Nemeroff, C. B. (2001). Neurokinin1 receptor antagonists as potential antidepressants. Annual review of pharmacology and toxicology, 41(1), 877-906.

Szade, K., Gulati, G. S., Chan, C. K., Kao, K. S., Miyanishi, M., Marjon, K. D., ... & Weissman, I. L. (2018). Where hematopoietic stem cells live: the bone marrow niche. Antioxidants & redox signaling, 29(2), 191-204.

Şahin, F., Saydam, G., & Omay, S. B. (2005). Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi, 1(15), 48-56.

Şimşek, Ö. (2012). Yetişkin kök hücrelerin dünü ve bugünü. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 7(3), 231-236.

Taşkıran, N. (2014). Prepubertal Dönemde Dişi Siçanlarda Melatonin/Kisspeptin Etkileşiminin Puberta Yaşina Ve Ovulasyonda Görevli Hormonlar Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.

Tokcaer Keskin, Z. (2010). Contribution of mesenchymal stem cells in cell based therapies (Doctoral dissertation, Bilkent University).

Topaloglu, A. K., Tello, J. A., Kotan, L. D., Ozbek, M. N., Yilmaz, M. B., Erdogan, S., ... & Yuksel, B. (2012). Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. New England Journal of Medicine, 366(7), 629-635.

Topaloğlu AK,Kotan LD. Moleculercauses of hypogonadotropichypogonadism, Currentopinion in obstetricsandgynecology 2010;22:264-270.

Topaloğlu AK,Semple RK. Neurokinin B signalling in thehumanreproductiveaxis,Mol Cell Endecrinol 2011;22;346(1-2):57-64.

Ural, A. U. (2006). Kök hücreler. TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi, 5(3-4), 140-145.

Yazıcı P.(2011) Eksitatör-İnhibitör Aminoasitlerin, Leptin Ve Kispeptin Düzeylerinin Uyku Profili İle Değerlendirilmesi VePüberte Prekoks Gelişimi Üzerine EtkisininAraştırılması.

Yusop, N., Battersby, P., Alraies, A., Sloan, A. J., Moseley, R., & Waddington, R. J. (2018). Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from rat bone marrow and the endosteal niche: a comparative study. Stem cells international, 2018.

Zhang, Y., Lu, L., Furlonger, C., Wu, G. E., & Paige, C. J. (2000). Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. Nature immunology, 1(5), 392-397.

ÖZGEÇMİŞ

Semiha Doğan Mersin/Tarsus'da doğdu. Lise eğitimini Tarsus'ta tamamladı. Kilis'de bulunan 7 Aralık Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden 2018 yılında mezun oldu. 2018 yılın eylül ayında Adana Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansa başladı.