

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı**

**MULTİPOTENT STROMAL HÜCRELER ÜZERİNE
METFORMİNİN ETKİLERİNİN ANALİZİ**

**Hazırlayan
Fatih ÖMERLİ**

**Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN**

Yüksek Lisans Tezi

**Temmuz 2018
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**MULTİPOTENT STROMAL HÜCRELER ÜZERİNE
METFORMİNİN ETKİLERİNİN ANALİZİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Fatih ÖMERLİ**

**Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TYL-2017-7404 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Temmuz 2018
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Fatih ÖMERLİ



YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Multipotent Stromal Hücreler Üzerine Metforminin Etkilerinin Analizi” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

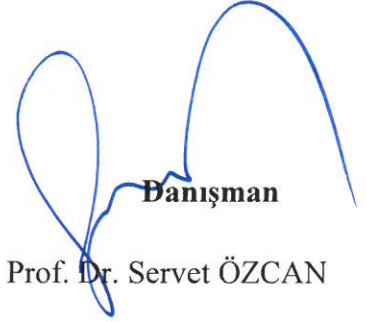
Hazırlayan

Fatih ÖMERLİ



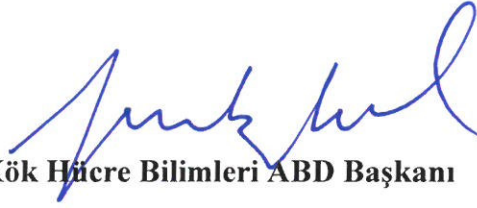
Danışman

Prof. Dr. Servet ÖZCAN



Kök Hücre Bilimleri ABD Başkanı

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL



Prof. Dr. Servet ÖZCAN danışmanlığında **Fatih ÖMERLİ** tarafından hazırlanan **“Multipotent Stromal Hücreler Üzerine Metforminin Etkilerinin Analizi”** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Kök Hücre Bilimleri** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

...../25/07/2018

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Servet ÖZCAN

Üye : Doç. Dr. Gökçen DİNÇ

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Özhan ŞENOL

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../2018

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca hem bilimsel katkılarıyla hem de verdiği tavsiyelerle beni aydınlatan ve yardımlarını esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Servet ÖZCAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında yaptıkları katkıları ve destekleri için Prof. Dr. Umberto GALDERISI ve Prof. Dr. Ahmed Mansouri'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tezin yapılmasında büyük katkıları olan Genom ve Kök Hücre Merkezi yöneticileri ile çalışanlarına, çalışmalarım süresince desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında yanımda olan, desteklerini hiç esirgemeyen, bilgi birikimleri ile çalışmalarına yardımcı olan değerli arkadaşlarım Biyolog Mustafa Burak ACAR, Moleküler Biyolog Eda MERT GÖKDUMAN ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (TYL-2017-7404) teşekkür ederim.

Fatih ÖMERLİ

Kayseri, Temmuz 2018

MULTİPOTENT STROMAL HÜCRELER ÜZERİNE METFORMİNİN ETKİLERİNİN ANALİZİ

Fatih ÖMERLİ

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2018
Danışman: Prof. Dr. Servet ÖZCAN**

ÖZET

Hücrel senesens, hücre bölünmesini durduran, hücrede fonksiyon kaybına neden olan ancak hücrelerin metabolik aktivitelerine devam ettiği dejeneratif bir süreçtir. Metformin, tip-2 diyabette sıklıkla kullanılan ve hücrelerin insülin direncini azaltarak, kan şekerinin düzenlenmesine yardımcı olan etken bir maddedir. Ayrıca, *AMP-activated protein kinase* (AMPK) aktivasyonunda da rol aldığı bilinmektedir. AMPK aktivasyonu yaşlanma, hücrel senesens ve yaşlanma ile ilgili hastalıklarla bağlantısı olduğu bilinen mTOR'u baskılamaktadır. Bu çalışmada MSH'lerine kültür boyunca metformin verilmiş ve bu hücrelere olan apoptoz, hücrel döngü, proliferasyon ve senesens gibi biyolojik etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre metformin uygulanan MSH'lerin senesense girme oranı azalmış, hücre döngüleri ve proliferasyonlarını daha uzun süre devam edebilmiştir. Bu durum tedavi amaçlı kültür için kullanılabileceği, canlıya ömür uzunluğu sağlanabileceği, yaşlılık ve buna bağlı olan kanser ve diğer dejeneratif hastalıklara karşı kullanılabilecek potansiyeli olduğunu da işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: Metformin, senesens, multipotent stromal hücre

ANALYSIS OF EFFECT OF METFORMIN ON MULTIPOTENT STROMAL CELLS

Fatih ÖMERLİ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
M.Sc Thesis, July 2018
Supervisor: Prof. Dr. Servet ÖZCAN

ABSTRACT

Cellular senescence is a degenerative process that stops cell division, causes loss of function in the cell, but in this process, the cells are metabolically active. Metformin is an active agent that is frequently used in Type-2 diabetes and helps regulate blood sugar by reducing the insulin resistance of cells. Metformin is also known to be involved in the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). AMPK activation suppresses mTOR, which is known to be linked to aging, cellular senescence and diseases related to aging. In this study, metformin were given to cultured MSHs and biological effects such as apoptosis, cellular cycle, proliferation and senescence on these cells were examined. According to the obtained findings, metformin-administered MSHs has shown decreased senescence, cell cycles continued longer and proliferations continued for a longer time. This suggests metformin may be used for culture for therapeutic purposes and potentially usable against aging and aging related cancer and other degenerative diseases in order to ensure the life span of the organism.

Key words: Metformin, senescence, multipotent stromal cell

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
KABUL ONAY	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMA VE SİMGELER.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kök Hücre	3
2.1.1. Multipotent Stromal Hücre (MSH).....	4
2.1.1.1. Multipotent Stromal Hücrelerin Karakteristiği	5
2.1.1.2. Multipotent Stromal Hücrelerin Parakrin Etkileri	5
2.1.1.3. Multipotent Stromal Hücrelerin Klinikte Kullanımı	6
2.2. Senesens	7
2.2.1. Senesens Nedir?	7
2.2.2. Senesent Hücrelerin Karakteristikleri	8
2.2.3. Senesensin Nedenleri	9
2.2.4. Senesens Mesajı	10
2.3. Metformin	11
2.3.1. Tarihçesi	11

2.3.2. Genel Kullanımı.....	11
2.3.3. Metformin Üzerine Yapılan Diğer Çalışmalar	11
2.4. Hücre Kültürü.....	13
2.4.1. Hücre Kültürünün Avantajları	13
2.4.2. Hücre Kültürü Ekipmanları	14
2.4.3. Hücre Kültürün Kullanılan Kimyasallar	14
2.4.3.1. Besiyeri	14
2.4.3.2. Tam Besiyeri	15
2.4.3.2.1. Aminoasitler.....	15
2.4.3.2.2. Vitaminler	15
2.4.3.2.3. Tuzlar.....	16
2.4.3.2.4. Glikoz	16
2.4.3.2.5. Antibiyotikler.....	16
2.4.3.2.6. Organik Bileşenler.....	16
2.4.3.3. Serum	16
2.4.3.4. PBS (Fosfatla Tamponlanmış Tuz Çözeltisi).....	17
2.4.3.5. Tripsin	17
2.5. Testler	17
2.5.1. Apoptoz Testi.....	17
2.5.2. Hücre Döngüsü Testi.....	18
2.5.3. Senesens Testi.....	18
2.5.4. Proliferasyon Testi	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	19
3.1. Multipotent Stromal Hücrelerin Eldesi.....	19
3.2. Multipotent Stromal Hücre Kültürü	19
3.2.1. Besiyeri Hazırlanması	19

3.2.2. Metforminin Hazırlanması	19
3.2.3. Hücre Kültürü Basamakları	19
3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması	20
3.3. Multipotent Stromal Hücre Deney Grupları ve Yapılışı.....	20
3.3.1. Kontrol Grubu	21
3.3.2. Metformin Dozaj Grupları.....	21
3.4. Multipotent Stromal Hücrelerde Replikatif Senesens Oluşturulması	21
3.5. Replikatif Senesens Oluşturulmuş Hücrelerin Testleri	21
3.5.1. Apoptoz Testi.....	21
3.5.2. Hücre Döngüsü Testi.....	22
3.5.3. Senesens Testi.....	22
3.5.4. Proliferasyon Testi	23
3.6. İstatistiksel Analiz	23
4. BULGULAR	24
4.1. Apoptoz Testlerinden Elde Edilen Bulgular	24
4.2. Hücre Döngüsü Testlerinden Elde Edilen Bulgular	25
4.3. Senesens Testlerinden Elde Edilen Bulgular	27
4.4. Proliferasyon Testlerinden Elde Edilen Bulgular.....	29
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	33

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KISALTMA VE SİMGELER

Sembol	Anlamı
AMPK	: AMP-activated protein kinase
CDKI	: Cyclin-dependent kinase inhibitors
CO₂	: Karbondioksit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
FBS	: Fetal Bovin Serum
GMP	: Good Manufacturing Practices
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HKH	: Hematopoetik kök hücre
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MKH	: Mezenkimal kök hücre
MSH	: Multipotent Stromal Hücre
mTOR	: Mammalian target of rapamycin complex
O₂	: Oksijen
PBS	: Fosfatla Tamponlanmış Tuz Çözeltisi
PI	: Propidyum iyodür
pRB	: Retinoblastoma
PS	: Fosfatidilserin
SASP	: Senesense bağlı sekretom fenotipi
SA-βgal	: Senescence-associated β -galactosidase
SHR	: Spontaneously Hypertensive Rat
β-gal	: Beta-galaktozidaz

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1. 21. Gün ve 28. Gün Hücrelerin Apoptoz Test Sonuçları.....	25
Tablo 4.2. 21. Gün ve 28. Gün Hücrelerin Hücre Döngüsü Test Sonuçları.....	26
Tablo 4.3. Hücre Döngüsü Testi - T-Test p Değerleri	26
Tablo 4.4. 21. Gün ve 28. Gün Hücrelerin Senesens Test Sonuçları	29
Tablo 4.5. Senesens Testi - T-Test p Değerleri.....	29
Tablo 4.6. 21. ve 28. Gün Proliferasyon Test Sonuçları	30
Tablo 4.7. 21. ve 28. Gün Proliferasyon - T-Test p Değerleri.....	31



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Kök Hücre Hiyerarşisi	4
Şekil 1.2.	Parakrin mekanizmasının genel şeması	6
Şekil 2.1.	Senesensin olası nedenleri ve sonuçları.....	8
Şekil 3.1.	Metforminin etkilediği yollar.	12
Şekil 4.1.	Genç multipotent stromal hücre β -gal boyama görüntüsü.....	28
Şekil 4.2.	Senesent multipotent stromal hücre β -gal boyama görüntüsü	28
Şekil 4.3.	Proliferasyon Testleri Grafiği	32



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Multipotent Stromal Hücre (MSH), çeşitli hücelere farklılaşma potansiyeli olan kök hücrelerdir. MSH iskelet kası hücrelerini, kan, vasküler, ürogenital sistemi ve vücut bağ dokusunu meydana getiren, mezodermal orijinli primordiyal hücrelerdir (1). MSH'ler sahip oldukları özellikler dolayısıyla oldukça dikkat çekicidir. Aslında MSH'ler mezenkimal dokulardaki farklılaşmanın yanı sıra, hematopoezisi destekler ve homeostatik dengenin korunmasında görev alırlar (2). Bu hücreler organizmada birçok dokuda bulunur ve doku onarımında önemli rol oynarlar. MSH'ler kendini yenileyebilir ve birçok hücreye farklılaşabilirler. Göbek bağı, endometriyal polipler, kemik iliği, adipoz doku gibi birçok kaynaktan izole edilebilirler. Kolay ve bol miktarda elde edilebilirliği açısından, deneysel ve klinik çalışmalar için ideal hücreleri oluşturmaktadırlar. (3). Tedavi amaçlı kullanım için kontrollü ortamlarda üretilen MSH'lerin erken pasajlarda uygulanması önemlidir. Ancak, vericiden alınan doku hacminin küçük olması, erken pasajlarda çok fazla sayıda hücre eldesini önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Bu durum yeterli hücre eldesi için pasaj sayısının artmasına neden olmaktadır. Artan pasaj sayısı sebebiyle kültürde geçen sürenin artması, sonucu hücresel yaşlanma olarak adlandırılan senesens durumu meydana gelmektedir. Bu durum MSH'lerin klinik kullanımını kısıtladığı için senesens sürecinin geciktirilmesi arzulanmaktadır. Senesensin geciktirilebilmesi, uygulamada kullanılan hücrelerin pasaj sayısının artmasıyla, ilerleyen aşamalarda daha fazla hücre eldesini mümkün kılacaktır. Senesens sürecini geciktiren etken bir maddenin varlığı *in vitro* MSH üretimi için oldukça önemli görünmektedir.

Hücresel senesens, hücre bölünmesini durduran, hücrede fonksiyon kaybına neden olan ancak hücrelerin metabolik aktivitelerine devam ettiği dejeneratif bir süreçtir (4). Senesens, sadece olduğu hücreyi etkilemez. Senesent hücre dışına salgıladığı sekretom olarak adlandırılan moleküller aracılığı ile çevre hücreleri ve dokuları da etkiler.

Sağlıklı ve genç kök hücrelerden salgılanan sekretom, hasarlı hücrelerde neoplastik dönüşümü engellediği gibi, tümör oluşumunun erken aşamalarında kanser hücrelerinin gelişimini de engellemektedir (4). Senesense girmiş hücrelerden salgılanan sekretom ise çevrede bulunan sağlıklı hücreleri de senesense girmeleri için uyarır. Bu durum dokunun rejenerasyon kapasitesini önemli ölçüde azaltır. Ayrıca, alzheimer, pulmoner fibrosis ve arterioskleroz gibi yaşa bağlı hastalıkların ortaya çıkmasında rol oynadığı da düşünülmektedir (4).

Metformin glikoz, insülin ve IGF-1 seviyesini düşüren bir ilaç etken maddesidir. Ayrıca, metabolizmada metforminin AMP-activated protein kinaz (AMPK) mekanizmasını da aktive ettiği bilinmektedir. Bu etken maddenin bir başka özelliği ise hücre yaşlanmasıyla direkt olarak ilgisi olduğu düşünülen mTOR'u baskılamasıdır (5). Metformin, Tip-2 diyabette sıklıkla kullanılan, istenmeyen yan etkisinin az olduğu bilinen bir ilaçtır. Fare modelinde yapılan çalışmalarda, metformin uygulamasının farelerin ömür uzunluğunu %30'a kadar arttırdığı rapor edilmektedir (5). Deney hayvanı modelinde, metformin uygulaması sonrasında tümöre yatkın fareler de tümör oluşum fenotipinin daha geç safhalarda ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Bu özelliklerinden dolayı metforminin, yaşlılık önleyici ve tümör baskılayıcı olarak da kullanılması düşünülmektedir.

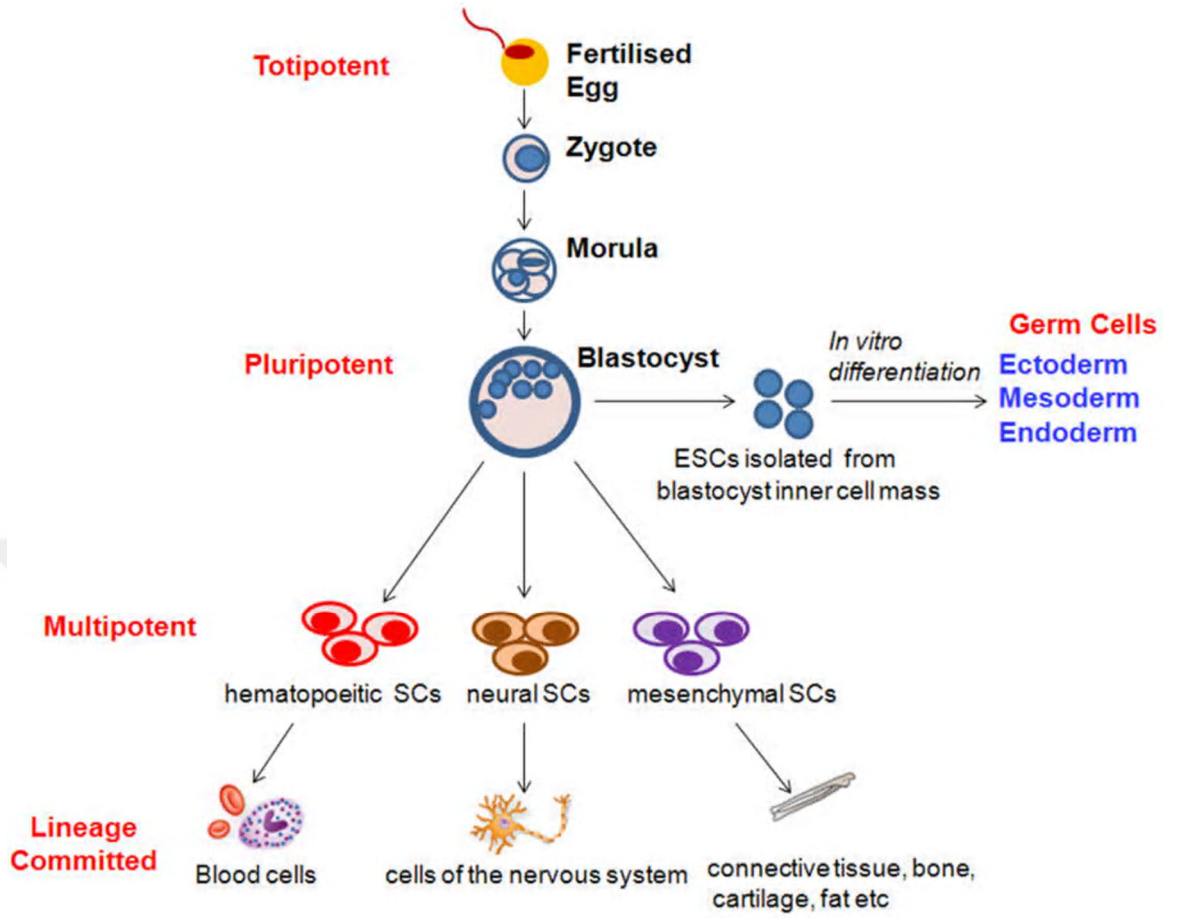
Metforminin bilinen bu özellikleri göz önüne alındığında yapılacak çalışmada, *in vitro* modelde metformin uygulamasının kök hücre senesensini geciktireceği ve kök hücre özelliğini daha uzun süre muhafaza etmesine yardımcı olacağı hipotezi test edilecektir. Bu hipotezin doğrulanması sonucunda; kök hücreler, senesense uğramadan kültürde daha uzun süre kalabileceği ve pasaj sayısı ilerlemiş hücrelerin de klinik kullanımına olanak sağlayacağı savını güçlendirecektir. Deneysel modelimiz ile metformin uygulanan kök hücre ve uygulanmayan kök hücre arasındaki farkların apoptoz, hücre döngüsü, senesens ve proliferasyon gibi biyolojik etki testleriyle ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

Biyofizikçi James Till ve hematolog Ernest McCulloch, 1961 yılında fare kemik iliği süspansiyonunda, “sonsuz çoğalma kapasitesine” sahip yetişkin kök hücrelerin varlığından bahsetmiş ve bunları kültüre edebilmiştir (6). Bu keşif kök hücre araştırmalarında kayda değer bir etki yapmıştır.

Kök hücreler, çok hücreli organizmada bulunan, büyüme ve yenilemenin nihai faktörleridir. Bu hücreler, kendini yenileme özelliğine ve diğer hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitesine sahiptir (7). Embriyojenez aşamasında, pluripotent kök hücreler büyüme ve gelişme için biyolojik yapıtaşı olarak görev alırlar. Multipotent ve unipotent hücreler ise yetişkin canlılarda, doku devamında ve rejenerasyonunda önemli rol oynarlar. Memeliler için, tüm kök hücreler başlangıçta döllenmiş yumurta olan zigottan köken alır. Zigot, canlı organizmayı oluşturma kapasitesine sahip olduğu için totipotenttir. Fakat, hücreler özelleştikçe farklılaşma kapasitelerini yitirmeye başlarlar. Zigot bölünerek amniyon kesesi ve iç hücre kütlelerini (Inner Cell Mass) oluşturur. İç hücre kütleleri (ICM); mezodermal, endodermal, ektodermal ve ganodal yapıları oluşturacak embriyonik hücrelere farklılaşır. Bu hücreler, amniyon kesesini oluşturamadıkları için tek başlarına bir canlıyı meydana getiremezler ve kapasite olarak "pluripotent" hücrelerdir. Bu pluripotent hücreler olgunlaştıkça, kararlı multipotent hücrelere dönüşürler. Multipotent hücrelerin, pluripotent hücrelere oranla daha sınırlı farklılaşma kapasiteleri vardır. Multipotent hücrelere, hematopoetik kök hücre (HKH) örnek verilebilir. Hematopoetik kök hücrelerin, sadece farklı kan hücresine dönüşebilme kapasiteleri vardır. Son olarak yetişkin canlının bazı özel sistemlerinde unipotent kök hücreler bulunurlar. Bunlar sadece tek bir hücre hattına dönüşebilirler (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. Kök Hücre Hiyerarşisi (56).

2.1.1. Multipotent Stromal Hücre (MSH)

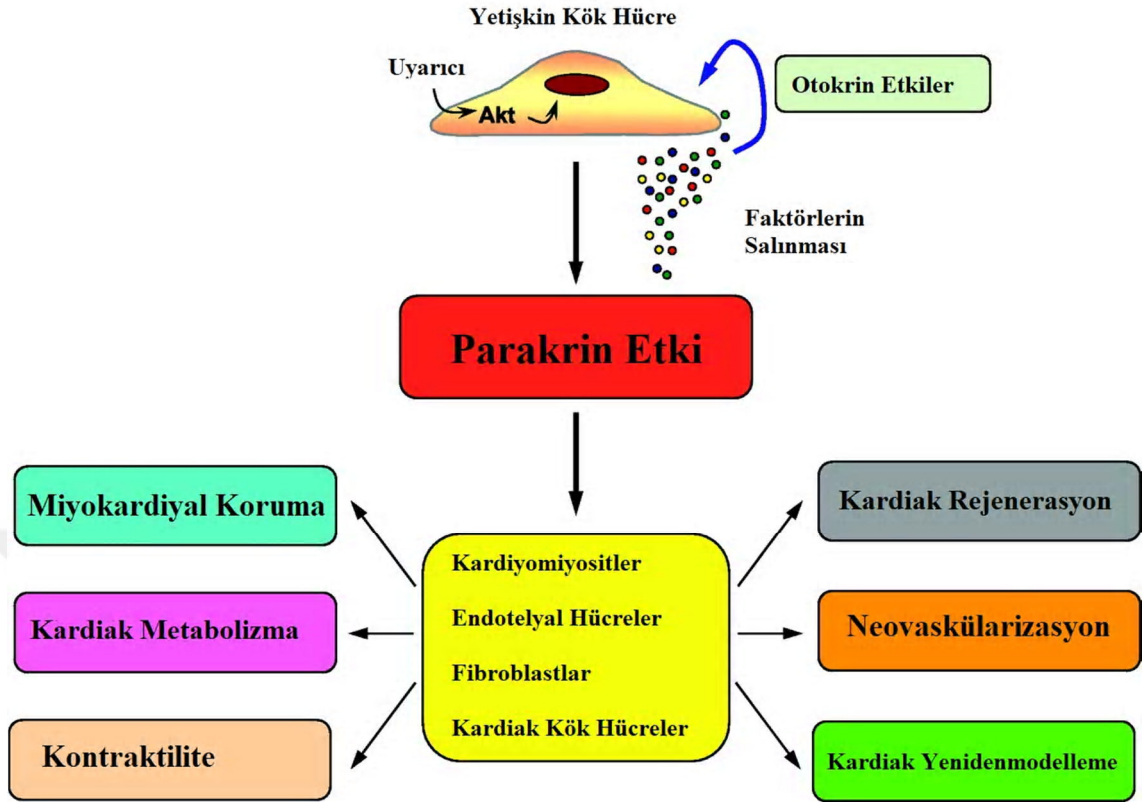
Multipotent Stromal Hücreler (MSH), aynı zamanda mezenkimal kök hücre (MKH) olarak da anılmaktadır. Bu hücreler, çeşitli hücrelere farklılaşma yeteneği olan stromal kök hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler, iskelet kası hücrelerini, kan, vasküler ve vücut bağ dokusunu meydana getiren, mezodermal orijinli primordiyal hücrelerdir (8). MSH'ler genellikle kemik iliğinden elde edilse de plasenta, göbek kordonu, diş pulpası, yağ dokusu ve birçok dokudan da elde edilebilir. Klinik olarak kullanımında en çok tercih edilen dokular kemik iliği ve adipöz dokusudur. Son zamanlarda göbek kordonu kökenli MSH'lerin önemi artmaktadır (9). Mezenkimal kök hücreler mezenkimal dokulardaki farklılaşmanın yanı sıra hematopoezisi destekler ve çok sayıda organ ve dokunun homeostatik dengesinin korunmasında görev alır. Buldukları dokudan ayrılıp hasarlı olan dokulara göç ederek hasarlı dokunun tamirinde etki gösterirler.

2.1.1.1. Multipotent Stromal Hücrelerin Karakteristiği

MSH'ler, morfolojik, yüzeysel belirteç ve moleküler belirteç bakımından kapsamlı bir şekilde analiz edilmişlerdir. Bu karakteristik özelliklerin yelpazesi oldukça geniş olduğu için, hiç birisi tek başına bu hücre tipini tam manasıyla tanımlamak için yeteri kadar özgül değildir (9). *In vitro* kültür ortamında, plastiğe yapışır ve yapıştıktan sonra uzun ve ince fibroblast benzeri bir yapı veya düz yassılaştırmış bir yapı olmak üzere iki tip morfoloji gösterebilirler. Yüzeysel belirteçleri için, The International Society for Cellular Therapy, Mesenchymal and Tissue Stem Cell komitesi'nin belirlediği, pozitif belirteçler olarak CD73, CD90, CD105. Negatif belirteçlerin ise: CD14, CD34, CD45 olarak kabul edilmesi önerilmektedir (10).

2.1.1.2. Multipotent Stromal Hücrelerin Parakrin Etkileri

Literatürde yer alan birçok çalışma MSH'lerin doku onarımı üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir. MSH'lerin doku yenilenmesine katkısı, bu hücrelerin kemik, kırıkta, kas, adiposit, stroma, fibroblast ve endotelyal hücre gibi farklı hücre tiplerine farklılaşabildiği görüşüne dayandırılmaktadır (11-12). Bunun yanı sıra, yapılan çalışmalar MSH'lerin doku onarımı için önemli olabilecek faktörleri salgılaması ile doku mikroçevresini (niş) değiştirebileceği de öne sürülmektedir (12-13). Örneđin olan akut miyokardial infarktüs geçirmiş immün yetmezlik farelere insan MSH'leri verilmiştir. Enjeksiyondan sonraki 3 hafta süresince donör hücrelere rastlanmamasına rağmen, farelerin kalp fonksiyonlarında iyileşmeler görülmüştür (14). Bu bulgu, dolaşıma katılan MSH'ler tarafından, dokuya özgü hücreleri etkileyecek büyüme faktörleri salgılanarak hasarlı dokunun tamirinin yapıldığının tespitini sağlamıştır (Şekil 1.2.) (15-16).



Şekil 1.2. Parakrin mekanizmasının genel şeması (57).

2.1.1.3. Multipotent Stromal Hücrelerin Klinikte Kullanımı

Bu hücreler organizmada birçok dokuda bulunur ve doku onarımında önemli rol oynarlar. MSH'ler kendini yenileyebilir ve birçok hücreye farklılaşabilirler (3). Göbek bağı, endometriyal polipler, kemik iliği, adipoz doku gibi birçok kaynaktan izole edilebilirler. Tüm bu özelliklerinin yanısıra görece kolay elde edilebilirliği sayesinde deneysel ve klinik çalışmalar için ideal hücrelerdir.

zere canlı ve işlevsel dokular oluşturmak" olarak tanımlanmaktadır. MSH'lerin klinik kullanım potansiyelleri yüksek görülmektedir (17). Son zamanlarda MSH'lerin en sık tercih edildiği alan rejeneratif tıp alanında kemik, eklem veya kırıldak tamiri gibi mezenkimal dokuların mühendisliğini kapsamaktadır. Ayrıca, estetik cerrahisinde, kas ve yağ dokusu yeniden yapılandırılmasında da kullanılmaktadır (8). MSH'ler izole steril ortamlarda üretilir, kalite kontrol ve mikrobiyolojik testleri yapıldıktan sonra hastaya verilir. Fakat MSH'lerin erken pasajlarda uygulanma zorunluluğu mevcuttur ve

vericiden alınan dokunun küçük olması erken pasajlarda çok fazla sayıda hücre eldesini önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Bu durumda MSH'lerin klinik kullanımının kısıtlanmasına yol açmaktadır.

2.2. Senesens

2.2.1. Senesens Nedir?

Hücrel senesens yaklaşık 40 yıl önce Hayflick ve meslektaşları tarafından, kültürdeki hücrelerin sınırlı sayıda çoğalabileceğinin gösterilmesiyle tanımlanmıştır (18).

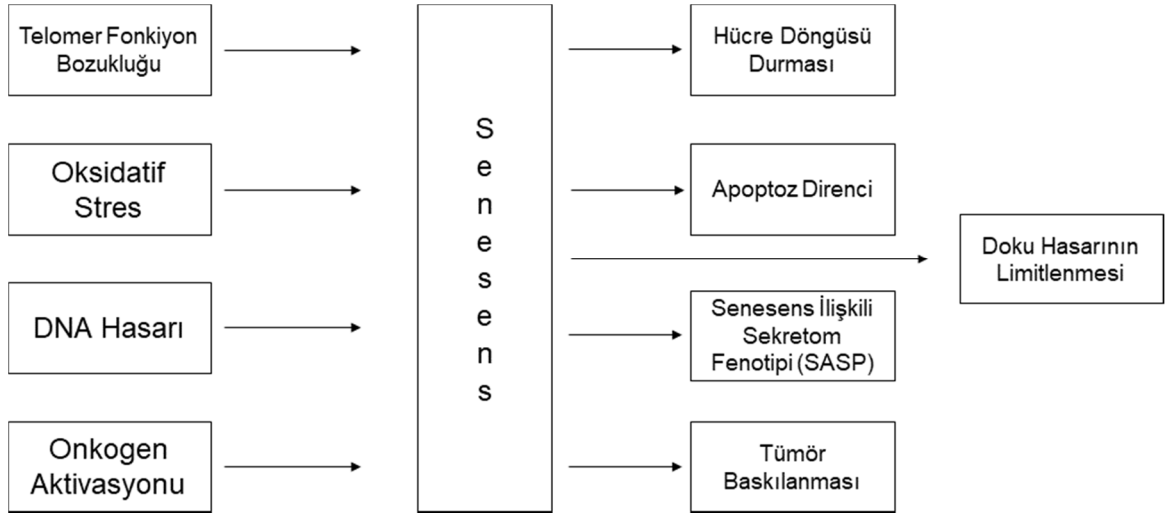
Hücreler yaşam süreci içerisinde sürekli olarak değişik streslere maruz kalırlar. Bu stresler içsel ve dışsal kaynaklardan oluşabilir (genotoksik kimyasallar, radyasyon vb.). Hücrelerde stres sonucu oluşan hasara karşılık olarak tümü ile iyileşmeden, hücre ölümüne kadar geniş bir aralıkta cevap verebilirler. Stres sürecinde yada sonrasında metabolik olarak aktif olmalarına rağmen hücre de kalıcı olarak hücre döngüsünü durdurarak da duruma cevap verebilirler. Bu durum hücrel senesens olarak adlandırılır.

Hücrel senesens, mitotik hücrelerde gözlemlenen bir durumdur. Mitotik hücrelerin hücre döngüsü, çeşitli stres faktörlerinin etkileri sonucunda geri döndürülebilir ya da geri döndürülemez şekilde durdurulabilir (19). Hücre döngüsünün geri döndürülebilir şekilde durdurulması durumu "quisenesens" olarak adlandırılmaktadır. Quisenesens hücreler, doku tamiri ve rejenerasyon ihtiyacı halinde uygun bir sinyale cevap olarak tekrar çoğalmaya başlayabilir. Mitotik hücreler oksidatif stres, DNA hasarı ve onkogen aktivasyonu gibi durumlarla karşılaştığında hücre döngüsü kalıcı olarak durdurulur, bu durum ise senesens olarak adlandırılır. Senesens sonucu hücre döngüsünün durdurulması ile hasarlı hücrelerin dokuda çoğalması engellenir.

Apoptoz, programlanmış hücre ölümüdür ve ökaryotik canlılar için önemli bir unsur olarak kabul edilir (20). Apoptoz da senesens gibi hücrel stres ve tümör baskılayıcı mekanizmaya karşı bir cevaptır. İmmün sistemin etkin olması durumunda, apoptoz mekanizması ile tümör potansiyeli taşıyan hücreler ortadan kaldırılır. Apoptoz mekanizmasının aktif olarak çalışmaması ve senesens sürecinin gelişmesi durumunda ise senesent hücreler, apoptoza dirençli hale gelirler. Bu durum, yaşla beraber senesens

hücrelerin sayısının artmasını açıklamaktadır. Hücrenin apoptoz ya da senesens sürecine gireceğini belirleyen faktörler hala tam olarak açık değildir.

Doku yenilenmesi ökaryotik organizmalarda canlılığının devamı için gereklidir. Mitotik hücrelerin mutasyon oluşturma riskleri, mitotik olmayan hücelere göre daha fazladır. Bu mutasyonlar birikerek kanser oluşmasına neden olabilir (21). Hücrenel senesens ise hücre döngüsünü durdurarak bu hasarların bir sonraki nesil hücelere geçmesini önleyen bir mekanizmadır (19) (Şekil 2.1.). Fakat bu mekanizma her zaman organizma yararına çalışmayabilmektedir. Senesens hücrelerin salgıladığı Senesense Bağlı Sekretom Fenotipi (SASP) proteinleri sekrete ederek çevre hücreleri parakrin mekanizma ile etkilerler. Senesens erken safhalarda neoplastik dönüşümü engelleyerek kanser oluşumu ve transformasyonunda önemli bir iyileştirici mekanizmayı oluşturmasına rağmen, ilerleyen kanser durumlarında ise tam tersine kanser gelişimini destekleyen yardımcı bir mekanizmaya dönüşmektedir. Kanser gelişimi, senesense hücrelerin salgıladıkları SASP mesajları ile desteklenmektedir (22-23). Bu durum senesensi bulunduğu aşamaya göre hem yaralı hemde zararlı etkilerinden dolayı iki tarafı keskin kılıç mekanizması yapmaktadır.



Şekil 2.1. Senesensin olası nedenleri ve sonuçları (58-59).

2.2.2. Senesent Hücrelerin Karakteristikleri

Senesent hücreler çeşitli karakteristik özelliklere sahiptirler. Morfolojik olarak sitoplazmik alanın / oranın büyümesi, hücre şeklinin iğnemi görünümünden düz hale

dönüşmesi, sitoplazmik alanın vakuolleşmesi, hücre çekirdekçik sayısının artması ile fenotipte değişiklikler gözlenir (24).

Senesent hücrelerin en belirgin özelliği hücresel döngüsünün geri döndürülemez şekilde durmasıdır. Senesent hücre genellikle döngünün G1 evresinde kalır. Buna rağmen metabolizma olarak aktiftirler, ancak bölünemezler. Bu durumda, senesent hücreler ideal kültür ortamına alınsalar dahi, DNA replikasyonu başlatamaz ve hücre bölünmesini gerçekleştiremezler (25).

Senesent hücrelerin gen ifadesinde çarpıcı değişimler gözlenir. Bu değişimler genellikle hücre döngüsü aktivatörleri veya inhibitörleri düzeyindedir (19). Senesent hücrelerde baskın olarak iki hücre döngüsü inhibitörü ifade edilir. Bu inhibitörler; Cyclin-dependent kinase inhibitör olan (CDKI), p21 ve p16'dır. Bu inhibitörler tümör baskılayıcı yolların parçalarıdır. Bu inhibitörler, p53 yolağı ve retinoblastoma (pRB) proteinleri ile yönetilirler ve bu iki yapının yönettiği yollar, kanser hücrelerinde de çoğu zaman bozulmuştur. Tipik bir senesensde hem p21 hem de p16 yolağı hücre gelişimini durdurup, bu durumun sürekliliğini sağlayabilir. p21 direk olarak p53 tarafından indüklenir, fakat p16 yolağını indükleyen mekanizmalar senesens sürecinde tüm detayları ile henüz anlaşılmamıştır (26).

Senesent hücreler kültürde ve canlıda bazı markerlar ile belirlenebilmektedir. En sık kullanılan senesens-bağılantılı (associated) β -galaktosidaz (SA- β gal) markeridir (27).

2.2.3. Senesensin Nedenleri

Birçok farklı faktör, olay ve durum senesensi tetikleyebilir. Bu faktörler uzun süreli (kronik) olaylar olabileceği gibi, kısa zamanda (akut) gerçekleşen olaylar da olabilir.

Kronik faktörler; telomer kısalması, onarılamayacak derecede DNA hasarı, kanser yapıcı genler gibi zamanla oluşan ve ortaya çıkan durumlardır (19). Ayrıca her bölünme, hücreyi senesense biraz daha yaklaştırır. Bu durumun sonucu olarak, organizma yaşlandıkça, organizmada gözlenen senesent hücre miktarı da artmaktadır.

Akut faktörler ise farklı koşullara bağlıdır. *In vitro* ortamda, hücreler kültür ortamına adapte olmak durumundadır. Normal olmayan besiyeri, büyüme faktörleri ve ortamsal koşullar gibi durumlar hücreleri şoka uğratabilir ve strese bağlı senesense neden

olabilirler (28-29). Ayrıca, hidrojen peroksit doxorubicin ve cisplatin gibi etken kimyasallar da senesens mekanizmasını uyarırlar.

Bölünebilen hücreler, belirli bir bölünme sayısına ulaştıktan sonra bölünmelerini durdururlar. Bu nokta “Hayflick Limiti” olarak adlandırılır. Bu limitin bir sonucu olarak bölünebilen hücreler zamanla replikatif senesens durumuna geçerler (18).

2.2.4. Senesens Mesajı

Senesens sadece oluşturduğu hücreyi etkilemez. Senesent hücreler, hücre dışına salgıladıkları sekretom olarak adlandırılan moleküller ile çevre hücreleri ve dokuları da etkiler (30).

Senesent hücreler, senesense bağlı sekretom fenotipi (SASP) proteinleri sekrete eder (30). SASP içeriğindeki proteinler, çevredeki hücreleri senesense duyarlı hale getirme, immünomodülasyon, kanser gelişmesini zayıflatma veya teşviki ve doku gelişimi-değişimi gibi fonksiyonları yerine getirir. Ayrıca, bu proteinler, immün sistem hücrelerini aktive edip, kendisine çekebilir. Bazı durumlarda, bu proteinlerin zararlı fizyolojik sonuçları da olabilir. Doku ve organ fonksiyonuna zarar verip, organizmanın yaşlanmasına neden olabilir. Dahası tümör hücreleri bu SASP proteinlerini kötüye kullanarak kendi gelişmelerine katkı sağlayabilirler. Özellikle bu durum hücre dışı matriks proteinleri aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. SASP’de bulunan sitokinler, büyüme faktörleri ve proteazlar, dokudaki mikro ortamı modifiye ederek, anjiyojenez ve kanser hücre proliferasyonunu teşvik ederek tümör oluşumunu destekler (31-32).

Ayrıca myeloma kanser hücrelerinin, senesent mezenkimal kök hücreler ile kültüre edildiğinde, mezenkimal kök hücre sekretom içeriğinin dramatik bir şekilde değiştiği rapor edilmiştir (33). Kültür sonrasında MKH sekretomunun senesens ve apoptozu teşvik edici faktörleri ortadan kalkmıştır. Bu durum senesent hücrelerin kanser baskılayıcı özelliklerini ortadan kaldırmıştır (33).

2.3. Metformin

2.3.1. Tarihçesi

Metforminin keşfi orta çağlara dayanmaktadır. Bir Fransız leylağı olan *Galega officinalis* özü, septomları Tip-2 diyabet ile benzer olan hastalıkların tedavisinde kullanılıyordu. 1800'lerde *Galega officinalis* bitkisinin guanidin bakımından zengin olduğu belirtilmiştir. Fakat guanidin klinik kullanım için çok toksik olması, aynı bitkinin daha az toksik olan galegin (isoamylene guanidine) özünün kullanılmasına neden olmuştur. Jean Sterne, Paris'deki bir hastanede galegin üzerine araştırmalar yürüttüğü sırada, birkaç biguanidenin anti-diyabetik özelliklerini keşfetti. Bunların arasından daha sonra metformin olarak anılacak olan dimethylbiguanide formunu seçti ve adını glukofaj anlamına gelen "Glucophage" koyarak çalışmasının sonuçlarını 1957'de yayınladı. İronik olarak günümüzün yüksek teknolojili ilaç araştırmaları ve geliştirmelerine rağmen, Tip-2 diyabette en çok kullanılan metformin, ortaçağ bitkisel tedavisinden çok az uzaklaşmıştır (34).

2.3.2. Genel Kullanımı

Metformin, Tip-2 diyabet tedavisinde en sık önerilen ve kullanılan ilaçtır. Metforminin glikoz düşürücü etkisi, ucuza maliyetli olması, daha az yan etkisinin olması ve kilo kontrolünü kolaylaştırması gibi avantajları nedeniyle tercih edilmektedir (35). Metformin dolaşım sistemi yetersizliklerinden dolayı ölüme yol açma bakımından diğer tedavilere göre daha az risk teşkil etmektedir (36). Tek başına kullanımı göz önüne alındığında, metforminin hemogloblin A1c'yi daha fazla düşürdüğü, daha fazla kontrollü kilo kaybına neden olması, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oranını düşürdüğü ve trigliserit oranını daha iyi düşürdüğü gözlenmiştir. Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) oranını artırmada diğerleri kadar başarılı olmasa da, diğer ilaçların yol açtığı sorunların daha az rastlanmasından dolayı daha çok tercih edilmektedir (37).

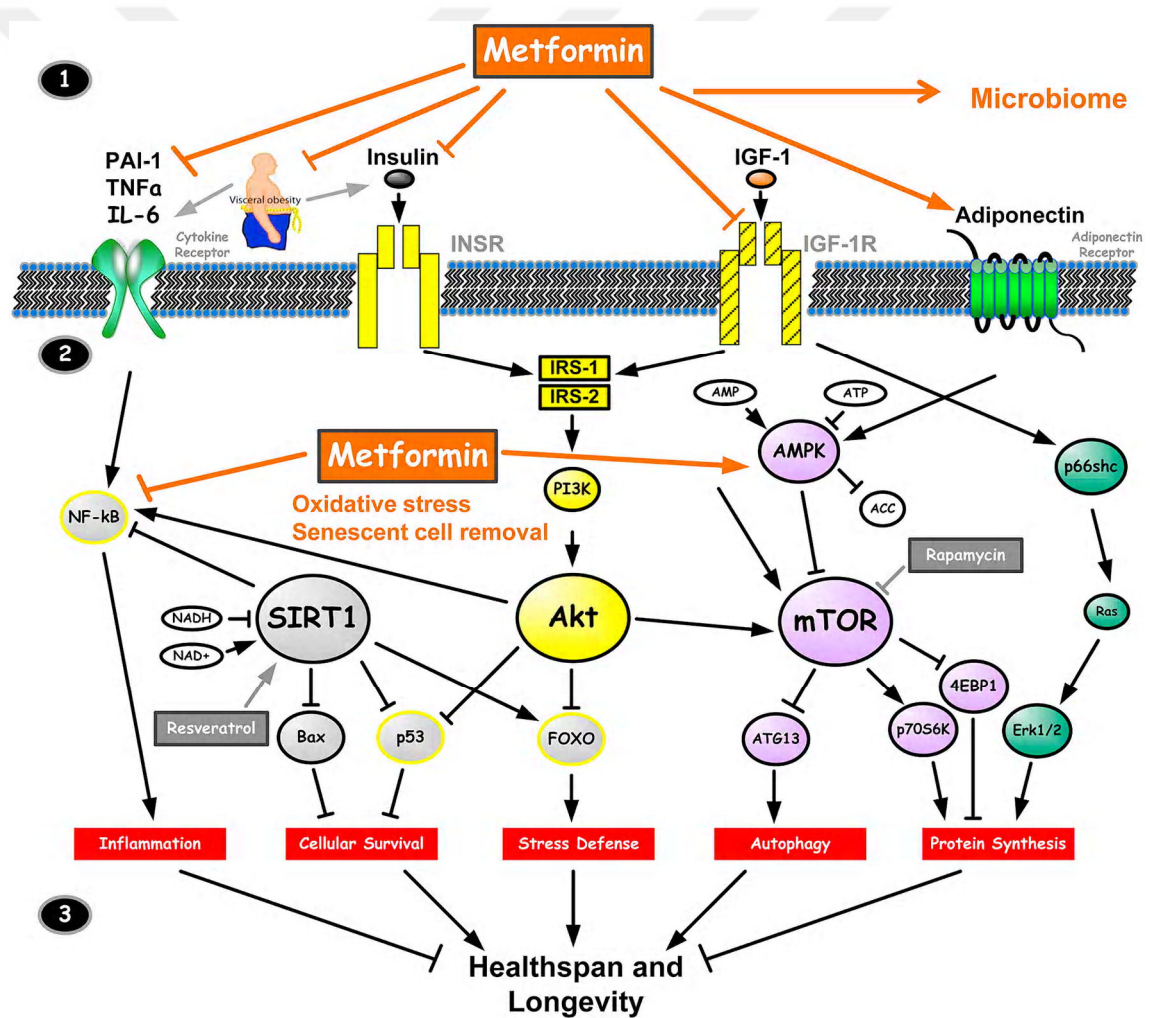
2.3.3. Metformin Üzerine Yapılan Diğer Çalışmalar

Metformin ile ilgili yapılan çalışmaların sayısında son zamanlarda ciddi bir artış vardır. Bu artışın asıl nedeni ise kansere, yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıklara karşı gösterdiği olumlu etkilerdir.

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, metformin dişi *spontaneously hypertensive rat* (SHR) farelere 3 aylıkken verilmeye başlanmış; sonuç olarak ortalama ömürlerini %37 artırmış, maksimum ömürlerini 10 ay artırmış ve aynı zamanda üreme yaşlanmasını da

aynı oranda önlemiştir. Bu olumlu etkilerinin yanında kötü huylu tümör oluşumunu azaltmadığı gözlenmiştir (38). Metforminin, *AMP-activated protein kinase* (AMPK) aktivasyonunda da rol aldığı bilinmektedir (39). AMPK aktivasyonu yaşlanma, hücre senesens ve yaşlanma ile ilgili hastalıklarla bağlantısı olduğu bilinen mTOR'u baskılamaktadır (40-41). Bu durum, metforminin yaşlanmayı geciktirici etkisi olabileceği düşüncesini doğurmuş ve konu hakkında çalışmalar başlamıştır (Şekil 3.1).

Metforminin, kanser üzerine olan etkisi diğer çalışmaların konusu olmuştur. Çalışmalar karışık sonuçlar ortaya koymasına rağmen, bu ilaç üzerine yapılan klinik çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır (42).



Şekil 3.1. Metforminin etkilediği yolaklar.

Metformin sitokinez, insülin, IGF-1 yollarını etkiler. Bu yollar yaşlanma ile aktive olurlar ve modüle edildiklerinde ömür uzunluğu ile ilişkililerdir. Metformin, inflamatuvar yolağını baskılar, AMPK'yı aktive eder bu durum da mTOR baskılanmasını artırır. mTOR, yaşlanmayı modüle etmek için önemli hedeflerden biridir. Bu mekanizmalar, oksidatif stresi modüle eder ve senesent hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Bu işlemler, inflamatuvarı, hücre hayatta kalmayı, stres savunmasını ve otofaj gibi uzun yaşamla ilişkili mekanizmaları etkiler (60).

2.4. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, canlıdan veya dokudan elde edilen bağımsız hücrelerin *in vitro* koşullarda yaşatılmasıdır (43).

Hücre kültürü 1907 yılında Ross Harrison'un, kurbağa embriyosundan aldığı doku parçalarını kültüre almasıyla başlamıştır (43). Aradan geçen bir yüzyıl sonunda çok çeşitli hücrelerin ve kanser hücrelerin kültüre edilebilmesinden, *in vitro* fertilizasyona ve hatta kültüre edilen hücrelerin genetik olarak manipüle edilmesine kadar ilerlemeler gerçekleşmiştir. Deri dokusundan elde edilen nihai farklılaşmış fibroblastların belirli sayıda transkripsiyon faktörü aktarımı ile pluripotent kök hücre elde edilmesine kadar da ilerlenilmiştir.

Hücre kültürü sayesinde hücreler, *in vivo* koşullarındaki özelliklerini kısmen göstermeye devam ederler. Bu sayede canlı hayvan modeli kullanılmaksızın, hücrelere uygulanacak koşullara, kimyasallara ve ilaçlara (diğer test edilecek olası maddelere) nasıl tepki vereceğinin gözlenebileceği deneyler gerçekleştirilebilir ve değerli veriler toplanabilir. Ayrıca son zamanlarda, kültür ortamında kök hücre üretilmesi ve bunun hastalık tedavisi, doku onarımında kullanılması üzerine yapılan çalışmaların sayısı artmış ve sağlık sektöründe ticari önem kazanmıştır (43).

2.4.1. Hücre Kültürünün Avantajları

Hücre kültürünün birçok avantajı vardır, bunlar şu şekilde sıralanabilir:

Kontrol Edilebilir Ortamlar: Ortamın fizyolojik ve fizikokimyasal olarak kontrol edilebilmesi, farklı koşullara hücrenin vereceği tepkinin görülmesi veya hücre kültürünün verimi açısından avantaj olarak kullanılabilir (43).

Örneklerin Karakterizasyonu ve Homojenliği: Hücreler doku içerisinde ve doku örneklerinde örneklerinde genelde oldukça heterojendir. Hücre kültürü sayesinde hücreler seçici baskı aracılığıyla homojen hale getirilir. Bu şekilde her alt kültürde (sub kültür) çoğaltılan örnekler birbirine benzer karakterlerde olur ve istatistiksel analizleri basitleşir. Ayrıca, saklanan stokların aynı olması, ileride yapılacak çalışmaları ve ticari kullanımı kolaylaştırır (43).

Ekonomi, Ölçek ve Mekanikleştirme: Uygulanacak madde belirlenmiş konsantrasyonda doğrudan kültür ortamına uygulanabilir. Bu uygulama ile daha az madde sarfiyatı söz konusu olup, *in vivo* olarak uygulamadaki %90'ı geçen kayıplar önlenebilir. Farklı varyasyon ve tekrarları incelemek daha ucuza halledilebilmektedir. Ayrıca büyük hacimli ve çok örnekli çalışmalarda robotik sistemler ve mekanize teknikler kullanarak istenilen ölçekte, az zamanda ve düşük maliyetli araştırmalar ve üretimler yapılabilir (43).

2.4.2. Hücre Kültürü Ekipmanları

Hücre kültüründe kontaminasyon önemli bir tehdit olduğu için işlemin titizlikle steril bir ortamda yapılması gerekmektedir (43). Kontaminasyon riskini en aza indirmek için kullanılan ekipmanlardan ön önemlisi ise *laminar-flow* kabindir (biyogüvenlik kabini). Çalışmalar kabin içerisinde gerçekleştirilir ve kabin filtrelenmiş homojen hava akışını sağlayarak steril ortam oluşturur (43).

Isı kontrollü, nem ayarlı ve istenilen oranda karbondioksit sağlayabilen inkübatörler genel olarak çalışılan hücre tiplerine uygun yaşam alanı sunabilmektedir (43).

Hücrelerin gözlemlenebilmesi, fenotiplerinin incelenmesi, sayılarının belirlenmesi için invört mikroskop gereklidir (43).

Hücrelerin yıkama ve ayrıştırma işlemleri için santrifüj gereklidir (43).

Ayrıca, hücre kültürü sarf malzemelerinin, basiyerlerinin saklanması için +4°C, -20°C ve -80°C dereceli soğutucular gereklidir. Uzun süreli hücre saklanması için ise azot tankı bulunmalıdır (43).

Bu ekipmanlar genel bir hücre kültürü çalışmaları için en temel ekipmanlardır ve yapılacak işlemlere ve deneylere göre özelleşmiş diğer ekipmanlar gerekebilir (43).

2.4.3. Hücre Kültürün Kullanılan Kimyasallar

2.4.3.1. Besiyeri

Hücrelerin kültür ortamında yaşayabilmesi için belirli maddelere ihtiyacı vardır. İlk hücre kültür mediumları; doku ekstraktı, vücut sıvıları ve plazma gibi doğal

besiyerlerine dayanıyordu fakat yüksek miktarda besiyeri ve yüksek besiyeri kalitesi ihtiyacı, kimyasallara dayalı besiyerlerinin geliştirilmesini gerektirmiştir (43).

Hücrelerin kültür ortamında yaşaması için pH'ın 7.4 civarlarında olması gereklidir. Optimum pH hücreden hücreye değişse de genel olarak pH: 7.0-7.7 aralığındadır. Bu pH aralığı besiyeri içerisine eklenen kimyasalların tamponlama yetenekleri ile sağlanmaktadır (43).

Besiyeri için diğer önemli bileşenler ise karbondioksit (CO₂) ve oksijendir (O₂). Gaz halindeki bu bileşenler besiyeri gereksinimini sağlayan özel kaplarda gaz değişimine izin veren (genelde HEPA filtreli düzenekli) açıklıklardan difüze olarak sağlanmaktadır.

Besiyeri sıcaklığı ise hücre kültürünü etkileyen diğer önemli bir unsurdur. Hücreler her ne kadar +4°C'de birkaç gün canlılıklarını koruyabilseler de, memeli hücreleri için en ideal sıcaklık +37°C'dir (43).

2.4.3.2. Tam Besiyeri

Tam besiyeri terimi, istenilen kullanım için gerekli olan tüm bileşen ve takviyeleri içeren besiyerlerini tanımlar. Genellikle stabil olmayan bileşenler içerdiği için ticari temel besiyerlere ilaveler yapılarak elde edilirler (43).

Elde edilmesi, kullanılacak hücre tipine göre değişse de temel bileşenleri: Aminoasitler, vitaminler, tuzlar, glikoz, antibiyotikler ve organik bileşenlerdir (43).

2.4.3.2.1. Aminoasitler

Aminoasitler, kültüre edilen hücrelerin yaşaması ve çoğalması için gereklidir. Hücre tipine göre gereken aminoasitler ve miktarları değişebilir ve istenilen oranlarda eklenir. Stabil olmaması nedeni ile dışarıdan eklenen glutamin zamana bağlı olarak periyodik aralıklarla idame edilerek sağlanmaktadır (43).

2.4.3.2.2. Vitaminler

Vitaminler, hücre metabolizmasında önemli bir yere sahiptir, bu yüzden besiyeri içerisindeki konsantrasyonları önemlidir. Hücre kültürü besiyerlerinde B grubu

vitaminler, folik asit, inositol, biotin, nikotinamit, A, D, E, K vitaminler genelde hazır olarak sağlanmaktadır (43).

2.4.3.2.3. Tuzlar

Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} ve HCO_3^- genel kullanılan tuzlardır ve besiyerinin osmolaritesinde rol oynarlar. Ca^{2+} konsantrasyonu hücrelerin çoğalması veya farklılaşmasını etkileyebilir (43).

2.4.3.2.4. Glikoz

Hücrenin temel enerji kaynağı glikozdur. Besiyeri içerisinde ise farklı derişimlerde bulunur ve hücre hattına göre farklı glikoz konsantrasyonları kullanılabilir (43).

2.4.3.2.5. Antibiyotikler

Antibiyotikler, olası kontaminasyonların önüne geçmek için kullanılmaya başlanmıştır. *Laminar-flow* kabinlerin kullanımı, katı steril teknikler antibiyotik kullanımını azaltmıştır. Fakat, rutinde besiyerlerine sonradan eklenerek kullanım geleneği devam etmektedir (43). En sık kullanılanlar ise penisilin, streptomisin, gentamisin ve amfoterisin'dir.

2.4.3.2.6. Organik Bileşenler

Proteinler (büyüme faktörleri), peptidler, nükleozidler, sitrik asit döngüsü ara ürünleri, pirüvat ve yağlar tam besiyerlerin (komple) genelde bulunurlar. Bu bileşenler genelde serum takviyesi ile çözülsede, bazı özel hücreler için serum eklenmiş olsa dahi sonradan eklenmesi gerekebilmektedir (43).

2.4.3.3. Serum

Serum, hücre proliferasyonunu destekleyen büyüme faktörleri içerir. Bu hücrelerin hem gelişmesini hem de çoğalmasını destekler. Hücre tiplerine göre farklı oranlarda serum besiyerine eklenir. Büyükbaş hayvan, fetal dana, yetişkin at ve insan serumu en çok kullanılan serumlardır (43).

2.4.3.4. PBS (Fosfatla Tamponlanmış Tuz Çözeltisi)

PBS genel olarak, konsantre maddelerin seyreltilmesinde kullanılır. Hücre kültürü için aşırı konsantre olan maddeler PBS ile seyreltilir ve kültürde kullanıma hazır hale getirilir. Mg^{2+} ve Ca^{2+} içermeyen PBS'ler en sık kullanılanlardır (43).

PBS ayrıca, kültürdeki hücrelerin yıkanması, istenmeyen maddelerin ve ölen hücre kalıntılarının uzaklaştırılmasında da kullanılır. Burada da Mg^{2+} ve Ca^{2+} içermeyen PBS kullanılmasının nedeni ise, bu +2 değerlikli iyonların tripsin enzimi aktivitesini engellemesidir (43).

2.4.3.5. Tripsin

Bazı hücreler, bulduğu plastik kültür malzemesinin yüzeyine tutunur. Bu tutundukları yüzeyden ayırmak için ise tripsin enzimi kullanılır (43). Tripsin, hücrelerin yüzeye tutunmak için kullandığı yapıları (ekstra selülar matriks proteinleri) parçalar ve hücrenin serbest kalmasını sağlar. Fakat hücrelerin uzun süre tripsinle muamelesi hücre membranında bulunan protein içerikli yapılara zarar verir ve canlılığı etkiler. Tripsin aktivitesini durdurmak için tripsin inhibitörü veya protein içeren serum kullanılır (43).

2.5. Testler

2.5.1. Apoptoz Testi

Apoptozun erken safhalarında, hücre zarında değişiklikler gerçekleşir. Plazma membranı kompozisyon değişikliği fosfatidilserin (PS) molekülünün iç membran yüzeyinden, dış membran yüzeyine geçmesidir (44). Böylelikle PS, hücrenin dış yüzeyinde açıkta kalır. Annexin V, fosfatidilserine yüksek afiniteli Ca^{+2} bağımlı bir fosfolipit bağlayan proteindir. Bu özelliğinden dolayı, PS için hassas bir belirteç olarak kullanılabilir. Fosfatidilserinin yer değiştirmesi sadece apoptoza has bir özellik olmayıp, nekrozda da gözlenmektedir. Fakat bu iki durumun farkı, apoptozda hücre membranı bütün iken, nekrozda hücre zarı sızıntılıdır. Bu yüzden, apoptoz testinde Annexin V'in yanında, hücre membranı bütünlüğünü belirlemeye yarayan ilave boyalar da kullanılır.

2.5.2. Hücre Döngüsü Testi

Hücre döngüsünün regülasyonu, hücrenin varlığını sürdürmesinde kritiktir. Bu regülasyonlar, genetik hasarı onarır ve kontrolsüz bölünmeyi engeller. Hücre döngüsündeki kusurlar, tümör hücrelerin karakteristik özelliğidir (45).

MSH'lerin hangi hücre döngüsünde olduklarının belirlenebilmesi için flovsitometri temelli bir cihaz olan Muse Cell Analyzer cihazından faydalanılabılır. Bu cihaz için üretilmiş olan Cell Cycle Assay kiti mevcuttur. Bu kitin çalışma prensibi, çekirdek DNA'sının propidyum iyodür (PI) ile boyanmasına dayanmaktadır. Dinlenme devresindeki (G0/G1) hücreler, her bir kromozomdan ikişer kopya bulundurur, sentez (S) aşamasındaki hücreler ise kromozomal DNA sentezlerler daha sonra ise kromozomal DNA ikiye katlanır (G2/M). Bu yöntem ise hücredeki farklı miktardaki boyanmış DNA içeriğine göre okuma yapmaya dayanmaktadır.

2.5.3. Senesens Testi

Hücreler senesense girdiklerinde, proliferasyon özelliklerini kaybederler. Hücrede lizozom sayısının artması ve lizozomal aktivitenin artması replikatif sensesens ile uzun zaman önce bağdaştırılmıştır (46-47-48). Beta-galaktozidaz aktivitesi, lizozomal enzimi eksikliğini artmasıyla ortaya çıkar. Böylelikle beta-galaktozidaz (β -gal) aktivitesi, kültürdeki senesent hücreleri tanımlamayı mümkün kılar. Bu metotta β -gal ile tepkimeye girdiğinde mavi renkte ürün oluşturan bir substrat olan X-gal kullanılır. Hücreler glutaraldehit ile fikse edilir ve boyama solüsyonunda inkübasyon sonucunda senesent hücrelerde mavi renk oluşturduğu gözlenir (27).

2.5.4. Proliferasyon Testi

MSH'lerin proliferasyon durumlarını incelemek amacıyla yaygın olarak kullanılan testlerden biri MTT testidir. Bu metod, suda çözünebilen 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazoliumbromid (MTT) tetrazolium tuzunun, canlı hücre tarafından çözünürlüğü olmayan formazana dönüştürülmesine dayanır (49). Oluşan formazan miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Oluşan formazan DMSO ile çözünür ve palet okuyucular tarafından analiz edilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Multipotent Stromal Hücrelerin Eldesi

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan kök hücreler, Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi Good Manufacturing Practices (GMP) departmanından çıkan, üretim fazlası flow sitometri analizleri yapılmış ve kök hücre olduğu onaylanmış atıl durumundaki kök hücrelerin, Erciyes Üniversitesi Yerel İnsan Etik Kurulunun 96681246 nolu, 2017/53 karar nolu Etik Kurul Kararı ile kullanılması onayı alınmış hücrelerle gerçekleştirilmiştir.

3.2. Multipotent Stromal Hücre Kültürü

3.2.1. Besiyeri Hazırlanması

Multipotent stromal hücreler (MSH) için düşük glikoz DMEM (1g/L glikoz) (Biological Industries) içerisine %10 Fetal Bovin Serum (FBS) (Biological Industries), %1 Penisilin-Streptomisin (Biological Industries) ve %1 L-glutamin (Biological Industries) eklenerek besiyeri hazırlandı.

3.2.2. Metforminin Hazırlanması

Saf metformin, moleküler ağırlığı baz alınarak (165.6 g/mol) 3.45 mg saf metformin, son hacmi 42 mL olacak şekilde dPBS içerisinde çözüldü. Bu şekilde 0.5 M'lık 50x'lik metformin elde edildi.

3.2.3. Hücre Kültürü Basamakları

Önceden dondurulmuş ve sıvı azot tankında saklanan MSH hücreleri, 37 °C'lik su banyosunda ısıtılarak çözüldü ve üzerine 8.5 mL tam besiyeri eklenerek, dondurma solüsyonundaki DMSO (dimetil sülfoksit) seyreltildi. Hücreler 350xg'de 5 dakikada

oda sıcaklığında açılır başlıklı rotorda santrifüj edilerek çökmesi sağlandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellete 10 mL kalsiyum ve magnezyum içermeyen dPBS (Biological Industries) eklendi. Pellet, pipetaj ile dağıtılarak hücreler süspansiyon haline getirildikten sonra tekrar 350xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pellet, tekrar besiyerinde homojenize edildi ve Thoma lamı kullanılarak toplam hücre sayısı ve canlı hücre sayımı Tripkan Mavi ile 1:1 seyreltilerek gerçekleştirildi. Hücreler, 75 cm²'lik kültür kabına, 3.5-4x10⁵ hücre olacak şekilde 8 mL besiyeri içerisinde ekimi yapıldı. Ekimi tamamlanan hücreler 37 °C'lik, %5 CO₂ içeren nemli inkübatöre kaldırıldı.

Hücreler her gün invert mikroskop ile gözlenerek çoğalmaları kontrol edildi.

3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması

Yapışan MSH'lerin kültür kabındaki doluluk oranı %80' ulaştığında, hücreler yeni bir kültür kabına pasajlandı. İlk olarak üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve iki kez kalsiyum ve magnezyum içermeyen dPBS ile yıkandı. Bu yıkama, hücrelerden serumu uzaklaştırmak için yapıldı. Yıkanan hücrelere 5 mL tripsin (2 µL EDTA'lı) eklendi ve 3.5 dakika 37°C'de inkübe edildi. Tutunmuş olan hücrelerin, kültür kabının yüzeyinden sökülüp ve serbest şekilde yüzdüğü gözlemlendikten sonra tripsin miktarının %10'u kadar FBS içeren aynı miktarda besiyeri veya eklenen tripsin miktarının %10'u kadar hacimde tam FBS eklenerek, tripsin aktivitesi durduruldu. Hücreler, falkon tüplere alınarak 350xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler iki defa dPBS ile yıkandıktan sonra 75 cm²'lik kültür kabına, 3.5-4 x 10⁵ hücre olacak şekilde 8 mL tam besiyeri içerisinde ekimi yapıldı.

3.3. Multipotent Stromal Hücre Deney Grupları ve Yapılışı

Bu tez konusu kapsamında çalışma için 5 deney grubu oluşturuldu. Bu grubun 4 adedi farklı son konsantrasyonda olmak kaydı ile (1.5, 3, 6 ve 9 mM) hazırladığımız metformin stoğu ile desteklenerek kültüre edildi ve kalan tek grup ise metformin içermeyen kontrol grubu olarak kültüre edildi. Metforminin yarılanma ömrü dikkate alınarak, hücrelerin besiyerleri günlük değiştirilip, metformin uygulaması yapıldı.

3.3.1. Kontrol Grubu

Kontrol grubu hücrelerin besiyeri hergün taze besiyeri ile değiştirildi ve başka bir işlem yapılmadı.

3.3.2. Metformin Dozaj Grupları

Diğer çalışmalarda kullanılmış olan (55) ve insan günlük kullanımını mimik etme amacı ile günlük insan reçetesi esasında 1-3 adet 1000 mg kapsül kullanımı sınırında belirlenen metformin dozajları 1.5 mM, 3 mM, 6 mM ve 9 mM son konsantrasyonda olacak şekilde hesaplamalar yapıldı. Hazırlanana stok metformin çözeltisinden 1.5 mM için 1 mL'ye 3 µL, 3 mM için 1 mL'ye 6 µL, 6 mM için 1 mL'ye 12 µL ve 9mM için 1 mL'ye 18 µL metformin çözeltisi eklendi. Kültürdeki hücrelerin besiyeri günlük olarak formüle edilen oranda metformin içerecek şekilde değiştirildi.

3.4. Multipotent Stromal Hücrelerde Replikatif Senesens Oluşturulması

Kronik senesens çalışmalarının mimik edilmesi amacı ile; hücreler uzun süre kültüre edilerek ve %80-90 doluluk oranına ulaşıldığında pasajlanarak replikatif senesense girmeleri sağlandı. Deneyin 21. ve 28. günlerinde ise hücrelerin biyolojik durumunu anlamak amacıyla apoptoz, hücre döngüsü, senesens ve proliferasyon testleri gerçekleştirildi.

3.5. Replikatif Senesens Oluşturulmuş Hücrelerin Testleri

3.5.1. Apoptoz Testi

Hücreler, kültürdeki 21. ve 28. güne geldiğinde, kültürdeki her gruptaki hücrelerden tripsinizasyon işlemi sonrasında 1×10^5 hücre alınarak, %1 FBS içeren 100 µL hücre dPBS içerisinde reaksiyon tüpüne aktarıldı ve 100 µL Annexin V/Dead Cell Reagent (Muse-Millipore, MERCK) eklendi. Karanlıkta 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra Muse Cell Analyzer cihazında (Muse-Millipore, MERCK) her örnek 2 defa okutularak analiz edildi.

3.5.2. Hücre Döngüsü Testi

Hücreler, kültürdeki 21. ve 28. güne geldiğinde, kültürdeki her gruptaki hücrelerden tripsinizasyon işlemi sonrasında 5×10^5 hücre alınarak, -20°C 'de önceden soğutulmuş %70'lik 1 mL etanol içerisinde fiksasyon amacıyla -20°C 'lik dondurucuya kaldırıldı. Bir gece bekleyen örnekler, $350 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatantı atılarak etanol uzaklaştırıldı. Hücreler bir defa dPBS ile yıkandı. Pellet $200 \mu\text{L}$ 'lik Muse Cell Cycle Reagent içerisinde çözüldü ve 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından Muse Cell Analyzer cihazında her örnek 2 defa okutularak analiz edildi.

3.5.3. Senesens Testi

Hücreler, kültürdeki 21. ve 28. güne geldiğinde, kültürdeki her gruptaki hücrelerden tripsinizasyon işlemi sonrasında 3×10^4 hücre alınarak, 6 kuyucuklu hücre kabında, her bir kuyucuğa bir grup olmak kaydıyla, ekim yapıldı. Hücrelerin tutunması için 6 saat beklendikten sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyucuklar dPBS ile yıkandı. Her kuyucuğa, %25 glutaraldehit'ten (Sigma) $160 \mu\text{L}$ alınarak 19.84 mL PBS'e eklenerek oluşturulan %0.2 glutaraldehit fiksatif solüsyonundan eklenerek hücreler 15 dakika inkübasyonla fikse edildi. Bu sırada $500 \mu\text{L}$ X-gal solüsyonu (Toz halindeki X-gal (Thermo), N,N-Dimetilformamit içerisinde, konsantrasyonu 40 mg/mL olacak şekilde çözüldü.) 19.5 mL boyama solüsyonuna ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Potasyum ferrisiyanür) ve $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Potasyum ferrosiyanür) (Sigma) çözelti içindeki konsantrasyonları 5 mM olacak şekilde ve MgCl_2 1 M stok solüsyonu (çözelti içindeki konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde PBS içine eklenmesiyle elde edildi) eklendi ve bu şekilde tam boyama solüsyonu elde edildi. İnkübasyon sonunda glutaraldehit uzaklaştırıldı ve hücreler 2 defa dPBS ile yıkandı. Tam boyama solüsyonu eklendikten sonra plağın etrafı parafilm ile kaplanarak hava alması engellendi ve bir gece inkübe edilmesi için 37°C 'lik inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki hücreler 3 alanda 100'er hücre sayılarak senesens yüzdesi belirlendi. Uzun süre saklamak amacıyla kuyucuklardaki boyama solüsyonu uzaklaştırıldı ve üzerlerini kaplayacak şekilde %50'lik gliserol eklendi.

3.5.4. Proliferasyon Testi

Multipotent stromal hücreler, kültürdeki 21. ve 28. güne geldiğinde, proliferasyon oranlarını belirlemek amacı ile MTT testi yapıldı. Bu amaçla 96 kuyucuklu hücre kültür kabında her kuyucuğa 2000 hücre gelecek şekilde toplamda 200 µL hacimde ekim yapıldı. Hücrelerin üzerine 0. saatte, 24. Saatte, 48. saatte ve 72. saatte her kuyucuğa, son konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde MTT (Serva) solüsyonu (100 µL) eklendi. En az 4 saat MTT varlığında 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında MTT içeren besiyeri uzaklaştırıldı. Oluşan formazan kristaller DMSO ile çözüldü. Glomax Elisa Reader (Promega) cihazında 560 nm ve 750 nm olmak üzere çift dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Bu test her örnek için 3 tekrarlı olarak yapıldı.

3.6. İstatistiksel Analiz

Gruplar arasındaki farkların anlamlılığını belirlemek için T-test (Microsoft Excel) kullanıldı ve $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edilmiştir. [$0.01 \leq p < 0.05$: İstatistiksel anlamlılık(*). $0.001 \leq p < 0.01$:Yüksek düzey istatistiksel anlamlılık(**). $p < 0.001$: Çok yüksek düzey istatistiksel anlamlılık(***)]. $p > 0.10$: İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır].

4. BULGULAR

4.1. Apoptoz Testlerinden Elde Edilen Bulgular

Multipotent stromal kök hücre üzerine metformin aktif maddesinin apoptotik etkisini test etmek hedefiyle kontrol ve paralel kültür olarak dozaj grupları kültüre alınmıştır. Multipotent stromal hücre kültürün 21. ve 28. gününde toplanmış ve bu kök hücreler Annexin V ile protokole uygun bir şekilde boyanmış ve Muse Cell Analyzer (Muse-Millipore, MERCK) cihazında ölçülmüştür. Analiz sonuçları Tablo 4.1.'de özetlenmiştir. 21. gün kontrol hücrelerinde %13.82 oranında apoptotik hücre belirlenmiştir. Metformin uygulamalarının 1.5 mM dozunda %12.7, 3 mM dozunda %12.32, 6 mM dozunda %12.45, 9 mM dozunda %13.22 oranında apoptotik hücre tespit edilmiştir. Metformin uygulanmamış kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında en az apoptoz oranına %12.32 ile 3 mM konsantrasyonunda rastlanmıştır. Uzayan kültürün 28. gün kontrol hücrelerinde %13.79 oranında apoptotik hücre sayısı belirlenmiştir. Metformin uygulamalarının 1.5 mM dozunda %7.31, 3 mM dozunda %7.79, 6 mM dozunda %19.38, 9 mM dozunda %17.66 oranında apoptotik hücre tespit edilmiştir. Metformin uygulanmamış kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında en az apoptoz oranına %7.31 ile 1.5 mM, en fazla apoptoz oranına %19.38 ile 5 mM konsantrasyonda rastlanmıştır.

Tablo 4.1. 21. Gün ve 28. Gün Hücrelerin Apoptoz Test Sonuçları

Gün ve Test	Kontrol	Dozaj			
		1.5 mM	3 mM	6 mM	9mM
21. Gün Apoptotik Hücre Yüzdesi	13.82	12.7	12.32	12.45	13.22
21. Gün Yaşayan Hücre Yüzdesi	84.35	85.6	86.25	86.22	84.9
28. Gün Apoptotik Hücre Yüzdesi	13.79	7.31	7.79	19.38	17.66
28. Gün Yaşayan Hücre Yüzdesi	83.05	91.44	90.7	79.67	81.54

4.2. Hücre Döngüsü Testlerinden Elde Edilen Bulgular

Multipotent stromal kök hücre üzerine metformin aktif maddesinin hücre döngüsüne olan etkisini test etmek hedefiyle kontrol ve paralel kültür olarak dozaj grupları kültüre alınmıştır. Multipotent stromal hücre kültürünün 21. ve 28. gününde toplanan kök hücreler Cell Cycle Kit (Muse-Millipore, MERCK) protokolüne uygun bir şekilde işlemden geçirilmiş, Muse Cell Analyzer (Muse-Millipore, MERCK) cihazında ölçülmüştür ve metforminin MSH hücre döngüsü üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları ise Tablo 4.2.'de gösterilmiştir. 21. gün kontrol hücreleri %74.85 oranında G0/G1 fazında oldukları belirlenmiştir. Metformin uygulamalarının 1.5 mM dozunda %72.7, 3 mM dozunda %71.75, 6 mM dozunda %70.35, 9 mM dozunda %69.85 oranında G0/G1 fazında hücre bulunduğu tespit edilmiştir. Metformin uygulanmamış kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında en az G0/G1 fazı oranına %69.85 ile 9 mM konsantrasyonunda rastlanmıştır. Uzayan kültürün, 28. gün kontrol hücrelerinde %80.8 oranında G0/G1 fazında hücre belirlenmiştir. Metformin uygulamalarının 1.5 mM dozunda %78.3, 3 mM dozunda %74.4, 6 mM dozunda %73.55, 9 mM dozunda %73 oranında G0/G1 fazında hücre tespit edilmiştir. Metformin uygulanmamış kontrol

hücreleri ile karşılaştırıldığında en az G0/G1 faz oranına %73 ile 9 mM, konsantrasyonda rastlanmıştır.

Analizlerden elde edilen sonuçlara göre 21. ve 28. günlerde metformin uygulanan tüm grupların G0/G1 yüzdelerinin kontrol gruplarına göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.2.). Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak ele alındığında ise 21. gün G2/M fazı 1.5 mM'lık dozaj uygulaması haricindeki değerlerin istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar verdiği (Tablo 4.3.) gözlemlenmiştir.

Tablo 4.2. 21. Gün ve 28. Gün Hücrelerin Hücre Döngüsü Test Sonuçları

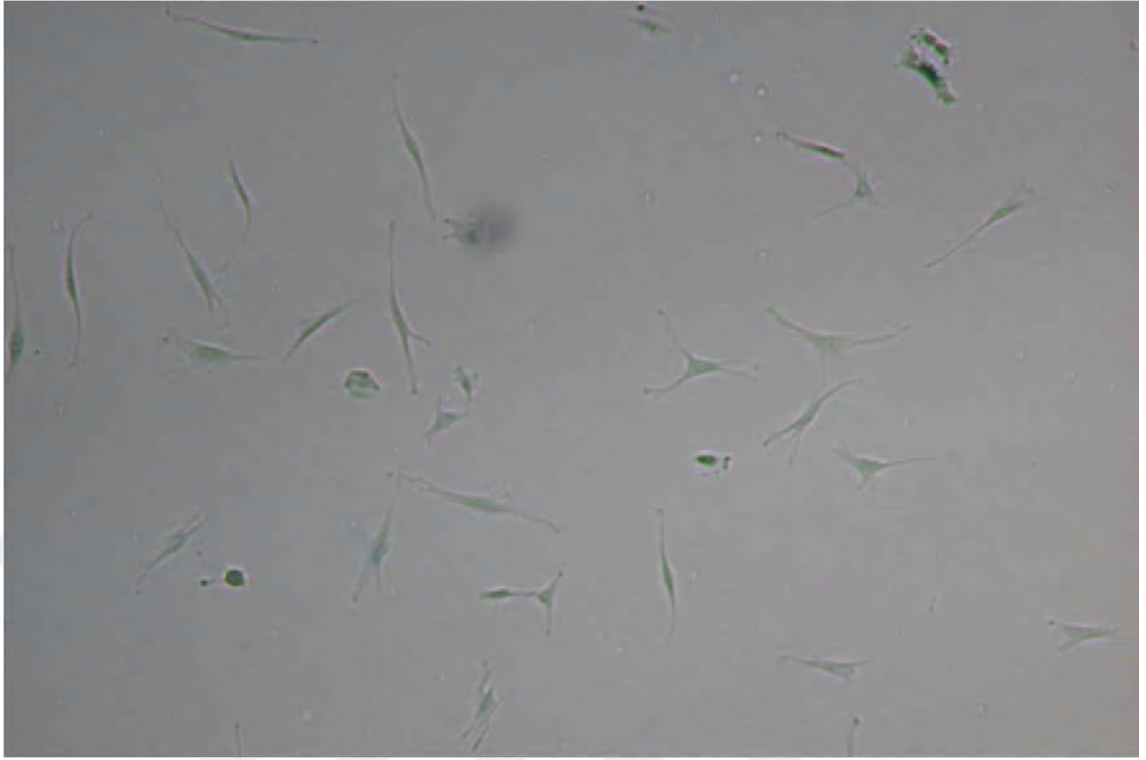
Gün ve Test	Kontrol	Dozaj			
		1.5 mM	3 mM	6 mM	9mM
21. Gün G0/G1 Fazı Yüzdesi	74.85	72.7	71.75	70.35	69.85
21. Gün S Fazı Yüzdesi	6.3	8.75	7.9	11.3	7.45
21. Gün G2/M Fazı Yüzdesi	12.45	12	14.1	10.35	17.45
28. Gün G0/G1 Fazı Yüzdesi	80.8	78.3	74.4	73.55	73
28. Gün S Fazı Yüzdesi	8.7	7.45	7.9	7.75	11.2
28. Gün G2/M Fazı Yüzdesi	11.4	13.95	12.9	13.9	12.55

Tablo 4.3. Hücre Döngüsü Testi - T-Test *p* Değerleri

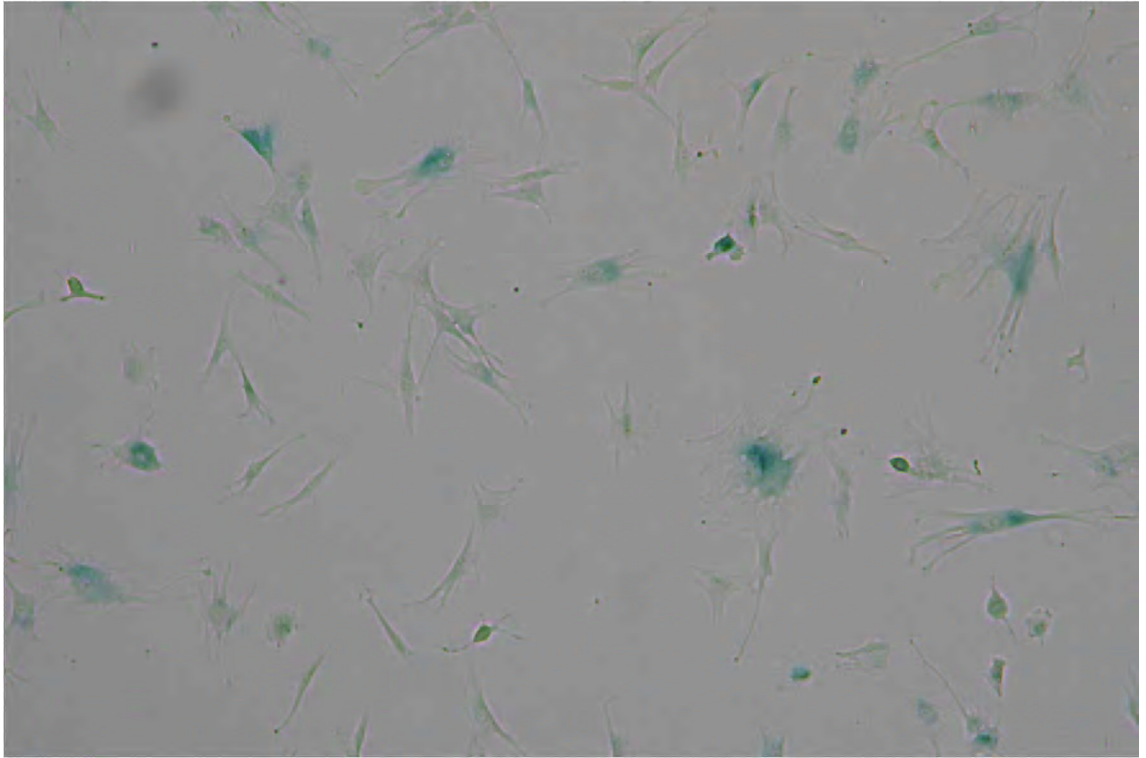
Gün ve Test	Dozaj			
	1.5 mM	3 mM	6 mM	9mM
21. Gün G0/G1 Fazı	0,000212***	0,000863***	0,000863***	0,000011***
21. Gün S Fazı	0,001473**	0,002316**	0,000042***	0,02262*
21. Gün G2/M Fazı	0,132497	0,003364**	0,001293**	0,000543***
28. Gün G0/G1 Fazı	0,001549**	0,000041***	0,000023***	0,000065***
28. Gün S Fazı	0,001607**	0,037553*	0,00573122**	0,000318***
28. Gün G2/M Fazı	0,013881*	0,002237**	0,000502***	0,042916*

4.3. Senesens Testlerinden Elde Edilen Bulgular

Multipotent stromal hücreler kültürün 21. ve 28. gününde toplanarak kök hücreler senesense bağlı β -galaktozidaz aktivitesini belirlemek için sitokimyasal yöntemler ile boyanmıştır. Boyama sonucunda mavi boyanan, birden çok çekirdeğe sahip olan, büyük vezüküllü, genişlemiş ve hücre iskeletinin bariz belirgin olduğu hücreler senesent hücre kabul edilmiş ve sayılmıştır (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2.). İvert mikroskopi ile birden fazla bağımsız farklı alanlar taranarak birbirinden bağımsız olarak iki set olacak şekilde her örnekten minimum 300 hücre sayımı yapılmıştır. Elde edilen ortalama sonuçlar Tablo 4.4.'de verilmiştir. İstatistiksel analiz sonuçları ise Tablo 4.5.'de gösterilmiştir. 21. gün kontrol grubunda %10.6'lık bir senesens hücre oranı tespit edilmiştir. Metformin uygulamalarının 1.5 mM dozunda %8, 3 mM dozunda %6, 6 mM dozunda %5.6, 9 mM dozunda %6.3 oranında senesens hücre tespit edilmiştir. Metformin uygulanmamış kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında en az senesens oranına 6 mM konsantrasyonda rastlanmıştır. Uzayan kültürün 28. gün kontrol grubunda %24.6'lık bir senesent hücre oranı tespit edilmiştir. Metformin uygulamalarının 1.5 mM dozunda %14.3, 3 mM dozunda %14, 6 mM dozunda %16.6, 9 mM dozunda %17 oranında senesens hücre tespit edilmiştir. Metformin uygulanmamış kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında en az senesens oranına 3 mM konsantrasyonda rastlanmıştır.



Şekil 4.1. Genç multipotent stromal hücre β -gal boyama görüntüsü



Şekil 4.2. Senesent multipotent stromal hücre β -gal boyama görüntüsü

Sayımlardan elde edilen sonuçlara göre 21. ve 28. günlerde metformin uygulanan tüm grupların senesens yüzdelerinin kontrol gruplarına göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.4.). Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak ele alındığında ise 21. gün 1.5 mM'lık dozaj uygulaması haricindeki değerlerin istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar verdiği (Tablo 4.5.) saptanmıştır.

Tablo 4.4. 21. Gün ve 28. Gün Hücrelerin Senesens Test Sonuçları

Gün	Kontrol	Dozaj			
		1.5 mM	3 mM	6 mM	9 mM
21. Gün Senesens Hücre Yüzdesi	10.6	8	6	5.6	6.3
28. Gün Senesens Hücre Yüzdesi	24.6	14.3	14	16.6	17

Tablo 4.5. Senesens Testi - T-Test *p* Değerleri

Gün	Dozaj			
	1.5 mM	3 mM	6 mM	9 mM
21. Gün	0.056025264	0.004618292**	0.001905827**	0.007899924**
28. Gün	0.018670677*	0.018456588*	0.018147491*	0.023113337*

4.4. Proliferasyon Testlerinden Elde Edilen Bulgular

Multipotent stromal hücre kültürünün 21. ve 28. gün MTT testinde 0 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyondan sonra oluşan formazan kristalleri DMSO ile çözülmüş ve OD₅₆₀₋₇₅₀ dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Hesaplamalar sırasında T₀'daki absorbans değeri ekim yapılan sayıdaki hücrenin absorbans değeri olarak kabul edilir. 24. 48. ve 72. saatte alınan absorbans değerleri T₀ değerinden çıkarılır ve absorbans artışı veya düşüşü bulunur. Absorbans artışları veya düşüşleri T₀'daki absorbans değeri ile doğru orantılı olacak şekilde hesaplanır ve diğer saatlerdeki hücre sayıları tahmin edilir.

Bu testin sonuçlarının ortalamaları Tablo 4.6.'de gösterilmiştir. İstatistiksel analiz sonuçları ise Tablo 4.7.'de gösterilmiştir. 21. gün kontrol grubundaki değer göz önüne

alındığında, metformin uygulamalarının 3 mM, 6 mM ve 9 mM dozunda proliferasyon azalmıştır. Metformin uygulanmamış kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında en az proliferasyona 9 mM konsantrasyonda rastlanmıştır. Uzayan kültürün 28. gün kontrol grubundaki değer göz önüne alındığında, metformin uygulamalarının 1.5 mM, 6 mM ve 9 mM dozunda proliferasyon artmıştır Metformin uygulanmamış kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında en çok proliferasyona 6 mM konsantrasyonda rastlanmıştır.

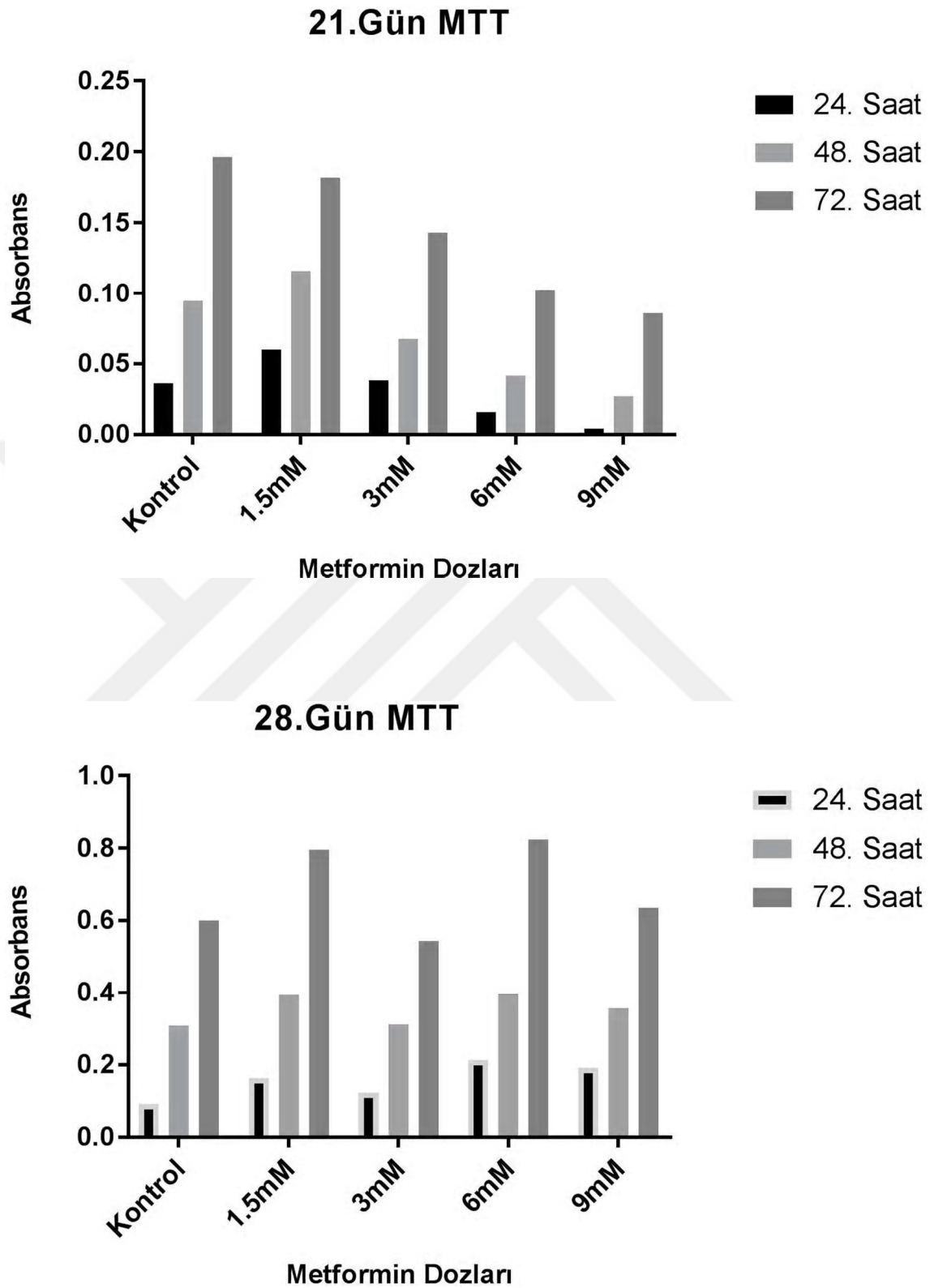
Proliferasyon testlerinden elde edilen sonuçlara göre, metformin 21. günde 1.5 mM dozaj haricinde diğer dozaj gruplarında, kontrol grubuna göre proliferasyonu azaltmıştır (Tablo 4.5.). 28. günde ise 3 mM'lık dozaj haricinde, diğer metformin dozajlarının proliferasyonu, kontrol grubuna göre artmıştır (Tablo 4.6.). Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak ele alındığında ise 21. Gün 1.5 mM'lık dozajın 48. ve 72. Saatlerinin ve 28. Günün 3 mM 48. Saat ve 9 mM 72. Saat haricindeki değerlerin istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar verdiği (Tablo 4.7.) gözlemlenmiştir. Sonuçlar grafiksel olarak Grafik 4.1. de gösterilmiştir.

Tablo 4.6. 21. ve 28. Gün Proliferasyon Test Sonuçları

Gün ve Saat	Kontrol	Dozaj			
		1.5 mM	3 mM	6 mM	9 mM
21. Gün 24. Saat	0.036439808	0.060126917	0.03840925	0.01596715	0.004247567
21. Gün 48. Saat	0.09474555	0.116079433	0.067309067	0.041508975	0.027034667
21. Gün 72. Saat	0.196590575	0.181718142	0.143329775	0.102597408	0.085925967
28. Gün 24. Saat	0.091625408	0.16405985	0.124024767	0.212596967	0.1917458
28. Gün 48. Saat	0.308847392	0.393565992	0.312169817	0.397170875	0.35666915
28. Gün 72. Saat	0.599207617	0.796426592	0.542519042	0.82418255	0.634379475

Tablo 4.7. 21. ve 28. Gün Proliferasyon - T-Test p Değerleri

Gün ve Saat	Dozaj			
	1.5 mM	3 mM	6 mM	9 mM
21. Gün 24. Saat	0.000100413***	0.006026869**	0.00012719***	0.0000000282***
21. Gün 48. Saat	0.083184876	0.0000073***	0.00000012***	0.000000014***
21. Gün 72. Saat	0.086742612	0.00131071**	0.0000356***	0.00000614***
28. Gün 24. Saat	0.0000000497***	0.000252059***	0.0000000246* **	0.00000213***
28. Gün 48. Saat	0.00000022***	0.423744847	0.00000596***	0.047012091*
28. Gün 72. Saat	0.00000636***	0.012371746*	0.0000105***	0.057509152



Şekil 4.3. Proliferasyon Testleri Grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Multipotent stromal hücreler (MSH), farklı dokularda bulunan ve canlının yaralarının iyileşmesinde, doku onarımında ve genel olarak canlının hematopoezisini sağlamada önemli görevler yerine getirirler. MSH'ler, doku onarımında önemli faktörler (büyüme faktörleri gibi stokinler veya SASP) salgılayarak dokunun mikroçevresini değiştirir ve doku onarımını desteklerler. MSH'lerinin fonksiyon kaybı, sayısal azalması veya kalitesinin düşmesi gibi nedenler iyileşme sürecini yavaşlatmaktadır. Hasarlı dokuda ise dokunun işlev kaybına kadar önemli hasara neden olan sorunlar ortaya çıkabilmektedir. Her hücrede olduğu gibi, Multipotent stromal hücrelerin de belirli bir çoğalabilme kapasiteleri vardır bu olgu Hayflick limiti olarak bilinir (18) hücrenel yaşlanmayı ifade eden bu durum senesense olarak adlandırılmaktadır. Senesens, hücrenel yaşlanma, canlılığın ilerleyen safhalarında sorunlara yol açabilmektedir. Senesense girmiş hücreler nihayetinde doku rejenerasyonunu yavaşlatmakta, iyileşme sürecini uzatmakta ya da tamamen durmasına neden olabilmektedir. Ayrıca alzheimer, pulmoner fibrosis ve arterioskleroz gibi genelde yaşlılıkla ilişkilendirilen hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu olumsuz sonuçlarına ek olarak, DNA hasarı ve mutasyonların birikmesi sonucunda bu hücrelerin tümör oluşturma potansiyellerini artırmaktadır (50).

Rejeneratif tıp, kemik, eklem ve kırıldak tamiri tedavi amaçlı olarak MSH'lerin kullanılmasının önündeki önemli engellerden biriside, üretilen hücrelerin erken pasajlarda kullanılmasının gerekmesidir. Bu durumu yaratan gerekçe işe pasaj sayısı artışıyla hücrenin kültürde kalma süresi uzamakta, hücrenel yaşlanmaya bağlı olarak kök hücreler özelliklerinin kaybetmeye başlamaları ve tümör oluşturma potansiyeli kazanmalarıdır.

Bu nedenlerden dolayı hücrelerin daha uzun süre fonksiyonlarını korumalarını sağlamak ve tümör oluşturma potansiyellerinin önüne geçmek, hem yaşlılık etkilerinin

ve yaşa bağı hastalıkların engellenmesi hem de tedavi amaçlı kullanımının ideal hale gelmesi açısından büyük önem arz etmektedir.

Senesens, telomer erozyonu veya iç ve dış etkenlerin yarattığı strese (kimyevi veya fiziki) maruz kalan, metabolik olarak aktif, fakat hücre döngülerini durdurarak işlevlerini yerine getirmeye devam ettikleri bir durumdur. Bu duruma DNA hasarları neden olabileceği gibi belirli bir bölünme geçirip Hayflick limitine ulaşılması da neden olabilmektedir.

DNA hasarı oluşan ve tamir edilemeyen hücrelerde, hücre döngüsü geri dönüşümsüz olarak bloklanır ve böylece hücreler senesense girerler. Bu mekanizma hasarlı hücrenin kontrolsüz çoğalmasını engelleyerek neoplastik dönüşümünü baskılar. Senesens, yararlı olabileceği gibi, zararlı da olabilir. Senesent hücreler salgıladıkları senesense bağı sekretom fenotipi (SASP) proteinleri ile mikroçevreyi değiştirir. Parakrin etki sonucunda, sağlıklı hücreler SASP proteinleri etkisi ile senesense duyarlı hale gelebilir ve zamanından öncede senesent olabilirler. Bu durumlar, risk altındaki kök hücrelerin kanserleşmeden hücre döngülerini durdurarak organizmaya fayda sağlasa da sağlıklı kök hücreleri etkileyerek, doku yenilenmesini sekteye uğratarak organizmayı zarara uğratabilir. Buna ek olarak; bu hücreler kanser oluşumunun ilerleyen aşamalarında, kanser hücreleri ile iletişime geçtikten sonra, salgıladıkları SASP molekülleri ile tümör gelişimini teşvik edici unsurlar haline gelmektedir (33).

Sağlıklı kök hücreler, salgıladıkları sekretom proteinleri ile kendilerinin ve çevresindeki hücrelerin, kök hücre özelliklerini korumada, stres altında hayatta kalmaya ve bağışıklık düzenlemeye de katkı sağlar. Bu nedenlerden dolayı kök hücreleri sağlıklı tutmak ve erken senesense girmelerini önlemek, organizmanın genel sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır (51).

Metformin, uzun yıllardır Tip-2 diyabet hastalığına karşı kullanılan, yan etkileri alternatiflerinden daha az olan bir ilaçtır. Tip-2 diyabette kullanılmasına karşın son yıllarda farklı etkileri de gözlenmiş ve konu üzerinde araştırmalara başlanmıştır.

Yapılan birçok çalışmada metforminin AMPK yolağını aktive ettiği ve mammalian target of rapamycin complex (mTOR) yolağını baskıladığını ortaya çıkarmıştır. AMPK hücre gelişmesi ve metabolizmanın yeniden programlanmasında rol oynar. Ayrıca

AMPK, hücre gelişmesini mTOR'u baskılayarak düzenler (52). mTOR, baskılandığında farelerin yaşam sürelerinin uzadığı gözlenmiştir (53). Bu yolağın aktivitesinin artması, hücre döngüsünün ilerlemesini teşvik eder ve proliferasyonu artırır. Fakat bu durum tümör baskılama mekanizmalarına da zarar verir. Yolağın baskılanması ise kanseri, yaşlanmayı ve diyabeti önlemektedir (54).

Bu bilgiler doğrultusunda metforminin bir *anti-aging* ilacı olarak kullanılabilceği düşünülmektedir ve bu yolda klinik çalışmalar başlatılmıştır.

Anisimov at al (38) yaptığı çalışmada, iki grup dişi SHR fare ırkı ele alınmış, bir grup kontrol iken diğer gruba metformin verilmiştir. Çalışmalar sonucunda metformin verilen grubun, kontrol grubuna göre ortalama %38 daha uzun süre hayatta kaldıkları ve daha uzun süre doğurgan kaldıkları gözlenmiştir (38). Bu çalışma göz önüne alındığında, metforminin kök hücrelerin üzerinde olumlu etkileri olabileceği düşünülmektedir. Eğer farelerin ömürleri ve doğurganlıkları artıyorsa, kök hücrelerin de daha uzun süre özelliklerini korudukları ve senesense daha az maruz kaldıkları çıkarımları yapılabilir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmada, metformin uygulamasının multipotent stromal hücreler üzerinde yapacağı biyolojik etkileri gözlemek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda kültüre alınan multipotent stromal hücrelere hergün metformin etken maddesi verilmiştir. Dört ayrı dozaj grubu (1.5 mM, 3 mM, 6 mM ve 9 mM) ve bir kontrol grubu ile yapılan kültürün 21. ve 28. günlerinde bu hücrelere apoptoz, hücre döngüsü, senesens ve proliferasyon testleri uygulanmıştır.

Bu testler sonucunda, 21. günde kontrol grubunda %10.6'lık bir senesens oranı gözlenmişken metformin dozaj gruplarında sırasıyla %8, %6, %5.6 ve %6.3'lık bir senesens oranı gözlenmiştir. Yani senesens oranı, dozaj gruplarında yaklaşık olarak ortalama %40 azalmıştır. Uzayan kültürün 28. gününe gelindiğinde ise kontrol grubu %24.6 oranında senesens özelliği gösterirken dozaj grupları sırasıyla %14.3, %14, %16.6, %17 oranında senesens fenotipi göstermiştir. Yani senesens oranı, dozaj gruplarında yaklaşık olarak ortalama %37 azalmıştır. Test sonuçlarında gözlemlendiği gibi metformin uygulaması yapılan multipotent stromal hücrelerde, uygulama yapılmayan hücrelere oranla senesense girme sürecini azalttığı ve dolayısı ile hücrelerin

genç kalmasını sağladığı gözlenmiştir. Bu durum Anisimov et al (38) yaptığı çalışma sonuçları ile örtüşmektedir.

Aktif olarak bölünen hücreleri DNA içeriği çoğunluğunu G0/G1 fazındaki olduğu gibi 2n olsa da, önemli bir kısmı da replikasyonun ve mitoz öncesinde 4n halde bulunur. Hücre döngüsü testlerinde ortaya çıkan sonuçlara göre 21. gün kontrol grubunda %74.85 oranında G0/G1 evresinde hücre gözlenmiştir. Dozaj gruplarında da sırasıyla %72.7, %71.75, %70.35, %69.85 oranında G0/G1 evresinde hücre gözlenmiştir. 28. günde ise kontrol grubunda %80.8 oranında G0/G1 evresinde hücre gözlenmiştir. Dozaj gruplarında sırasıyla %78.3, %74.4, %73.55, %73 oranında G0/G1 evresinde hücre gözlenmiştir. Dozaj gruplarında G0/G1 evresinde daha az hücrenin gözlenmesi, senesens testlerinde gözlenen değerler ile göz önüne alındığında aralarında paralellik göstermektedir. Bu durum hakkında bir literatür olmadığı için, farklı kaynaklardan karşılaştırma yapılamamıştır. Kontrol grubu hücre döngüsünde, dozaj gruplarına göre daha fazla G0/G1 evresinde olan hücre görülmesi, senesens sonuçlarında bahsedilen durum ile benzerdir. Senesent hücre miktarı daha fazla olan kontrol grubunun hücre döngüsü sekteye uğramış ve sonuç olarak G0/G1 evresindeki hücre oranı daha fazladır. Dozaj grubunda daha az senesent hücre gözlemlenmiş böylece hücre döngüsünü devam ettiren hücre sayısı kontrol grubundan fazladır. Sonuç olarak, dozaj grubunda kontrol grubuna göre daha az G0/G1 evresinde hücreye rastlanmıştır. Bu durum senesens test sonuçları paralellik göstermektedir.

Metformin *AMP-activated protein kinase* (AMPK) yolağını aktive eder. Bu yolak ise mTOR'u baskılamaktadır. mTOR yaşlanma, hücre senesens, otofaj ve protein sentezi ile ilgili bağlantısı olan bir yolaktır. Bu yolağın baskılanmasının canlı ömrünü uzattığı, ayrıca hücre gelişimini ve çoğalmasını baskıladığı, hücre bölünmesi için gerekli olan protein sentezlerini durdurduğunu da ayrıca gözlenmiştir (39-40-41). Proliferasyon testlerinde ise 21. günde kontrol grubu dozaj gruplarına göre daha yüksek proliferasyon oranı gözlenmiş. 28. günde dozaj grupları, kontrol grubundan daha az proliferatif olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada proliferasyon sonuçlarını yorumlandığında, 21. günde, metformin gruplarında proliferasyon azalmıştır. Bu azalma 72. saatte 9 mM dozajda yaklaşık %57'lik bir azalma ile en düşük proliferasyon değeri olmuştur. Bu durum metforminin hücre çoğalmasıyla bağlantılı olan mTOR'u baskıladığı bilgisi ile paralellik göstermektedir. Bu bilgi ile yola çıkarak, bu yolağın baskılandığı için

proliferasyon kontrole göre düştüğü ve senesent hücre sayısının azaldığı söylenebilir. 28. günde ise kontrol grubunun senesens oranı artmış ve bu durumla paralel olarak proliferasyon oranı, dozaj grubuna göre düşmüştür. Senesens oranı düşük yani daha genç ve çoğalabilen hücrelere sahip olan dozaj gruplarının ise proliferasyon oranı daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu artış 72. saatte 6 mM dozajda yaklaşık %37'lik bir artış ile en yüksek proliferasyon değeri olmuştur. Bu durum senesens hücre sayısı azalan ve proliferasyonu kontrol altında olan dozaj grubu hücrelerinin, 28. güne gelmesine rağmen proliferasyon için hala genç ve gerekli potansiyelin korunduğu söylenebilir.

Bu tez kapsamında elde edilen verilere dayanarak, metforminin beklenildiği gibi hücrel senesensi baskıladığı ve / veya geciktirdiği gözlenmiştir. Daha az hücre G0/G1 fazında kalmış ve hücre döngüsünün devam ettiği gözlenmiştir. Proliferasyonun baskılanması daha fazla hücrenin kök hücre potansiyelini kaybetmesinin önüne geçebilecek potansiyeli olduğuna işaret etmektedir. Bu durum tedavi amaçlı kültür ortamında gerekli olan hücre sayısının, kısıtlı pasaj sayısından dolayı ulaşılmasına karşı kullanılabileceği, canlının ömür uzunluğu sağlamak için, yaşlılık ve buna bağlı olan kanser ve diğer dejeneratif hastalıklara karşı kullanılabilecek potansiyeli olduğunu da işaret etmektedir.

Kullandığımız dozajlar arasında çok açık bir istatistiksel fark oluşmaması, konu üzerinde daha fazla çalışmanın gerektiğini göstermektedir. Ayrıca, yaptığı etkinin daha ayrıntılı incelenip, moleküler olarak ele alınması potansiyel olarak daha ayrıntılı tedavilere ve yöntemlere yol açacak olup, yaşlılık ve kanser konularına önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 174: 249-82
2. Ema H, Suda T. Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. *Blood*. 2012; 120: (11): 2174-81
3. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant*. 2011; 20: 5-14
4. Ziegler DV, Wiley CD, Velarde MC. Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell* 2014; 14: 1-7
5. Blagosklonny MV, Campisi J. Cancer and aging: More puzzles, more promises? *Cell Cycle* 2008; 17: 2615-8
6. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961; 14: 213–22
7. Stewart Sell, *Stem Cells Handbook* (2nd ed), Humana Press, 2013
8. Klingemann H, Matzilevich D, Marchand J. Mesenchymal Stem Cells - Sources and Clinical Applications. *Transfus Med Hemother*. 2008; 35: (4): 272-277
9. Nardi NB, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization, In: *Stem Cells, Handbook of Experimental Pharmacology*, Wobus AM, Boheler K. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2006: p 249-282.
10. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy* 2006; 8: (4): 315-317

11. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: (5309): 71-74
12. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells* 2007; 25: (11): 2896-2902
13. Chamberlain G, Fox J, Aston B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; 25: (11): 2739-2749
14. Iso Y, Spees JL, Serrano C, et al. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infraction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 354: (3): 700-706
15. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007; 213: (2): 341-347
16. Baglio SR, Pegtel DM, Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Front Physiol.* 2007; 6: (3): 359
17. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med.* 2013; 15: (45): e54
18. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961; 25: 585–621
19. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: (9):729-40
20. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35: (4): 495–516
21. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70
22. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010; 5: 99-118

23. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011; 21: 192(4): 547-56
24. Matsumura T, Zerrudo Z, Hayflick L. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. *J Gerontol.* 1979; 34: (3): 328-34
25. Zhang H, Pan KH, Cohen SN. Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2003; 100: 3251–3256
26. Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b–ARF–INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2006; 7: 667–677
27. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009; 4: (12): 1798-806
28. Sherr CJ, DePinho RA. Cellular senescence: Mitotic clock or culture shock? *Cell* 2000; 102: 407–410
29. Kuilman T, Michaloglu C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010; 24: (22): 2463-2479
30. Özcan S, Alessio N, Acar MB, et al. Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. *Aging* 2016; 8: (7): 1316-29
31. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature* 2014; 509: 439-446
32. Liu D., Hornsby PJ. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res.* 2017; 67: 3117-3126
33. Özcan S, Alessio N, Acar MB, et al. Myeloma cells can corrupt senescent mesenchymal stromal cells and impair their anti-tumor activity. *Oncotarget* 2015; 6: (37): 39482-92.
34. Bailey CJ, Day C. Metformin: it's botanical background. *Practical Diabetes International* 2004; 21: (3): 115-117

35. Rojas LBA, Gomes MB. Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr*. 2013; 5: (1): 6
36. Bennett WL, Wilson LM, Bolen S, et al. Oral Diabetes Medications for Adults with Type 2 Diabetes: An Update. Rockville MD, Agency for Healthcare Research and Quality, 2011
37. Qaseem A, Humphrey LL, Sweet DE, et al. Oral Pharmacologic Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: A Clinical Practice Guideline From the American College of Physicians. *Ann Intern Med*. 2017; 156: (3): 218-31
38. Anisimov VN, Berstein LM, Egorin PA, et al. Metformin slows down aging and extends life span of female SHR mice. *Cell Cycle* 2008; 7: (17): 2769-73
39. Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, et al. Activation of the AMP-activated Protein Kinase by the Anti-diabetic Drug Metformin in Vivo. *J Biol Chem*. 2004; 279: (42): 43940-51
40. Blagosklonny MV. Aging and immortality: quasi-programmed senescence and its pharmacologic inhibition. *Cell Cycle* 2006; 5: (18): 2087-102
41. Tzatsos A, Kandror KV. Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 2006; 26: (1): 63-76
42. Gong J, Kelekar G, Shen J, et al. The expanding role of metformin in cancer: an update on antitumor mechanisms and clinical development. *Target Oncol*. 2016; 11: (4): 447-67
43. R. Ian Freshney, *Culture of Animal Cells A Manual Of Basic Technique and Specialized Applications* (6th ed), Wiley-Blackwell, New Jersey, 2010
44. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995; 184: (1): 39-51
45. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts k, Walter P. *Molecular Biology of the Cell* (6th ed), Garland Science, New York, NY, 2014

46. Brunk U, Ericsson JL, Ponten J, Westermark B. Residual bodies and 'aging' in cultured human glia cells. Effect of entrance into phase 3 and prolonged periods of confluence. *Exp. Cell Res.* 1973; 79: 1-14
47. Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG, Torres C, Tresini M. Replicative senescence: a critical review. *Mech. Ageing Dev.* 2004; 125: 827–848
48. Robbins E, Levine EM, Eagle H. Morphologic changes accompanying senescence of cultured human diploid cells. *J. Exp. Med.* 1970; 131: 1211–1222
49. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65 (1-2): 55-63
50. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007; 25: (11): 2896-902
51. Alessio N, Özcan S, Tatsumi K, et al. The secretome of MUSE cells contains factors that may play a role in regulation of stemness, apoptosis and immunomodulation. *Cell Cycle* 2017; 16: (1): 33-44
52. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol.* 2011; 13: (9): 1016-23
53. Arriola Apelo SI, Pumper CP, Baar EL, et al. Intermittent Administration of Rapamycin Extends the Life Span of Female C57BL/6J Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2016; 71: (7): 876-81
54. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12: (1): 21-35
55. Sacco F, Silvestri A, Posca D, et al. Deep Proteomics of Breast Cancer Cells Reveals that Metformin Rewires Signaling Networks Away from a Pro-growth State. *Cell Syst.* 2016; 23: 2(3): 159-71
56. Hayes M, Curley G, Ansari B, Laffey JG. Clinical review: Stem cell therapies for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome - hope or hype? *Crit Care.* 2012; 16: (2): 205

57. Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008; 103: (11): 1204-19
58. Burton DG, Krizhanovsky V. Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71: (22): 4373-86
59. Hoare M, Das T, Alexander G. Ageing, telomeres, senescence, and liver injury. *J Hepatol.* 2010; 53: 5: 950-61
60. Barzilai N, Crandall JP, Kritchevsky SB, Espeland MA. Metformin as a Tool to Target Aging. *Cell Metab.* 23: (6): 1060-1065



EKLER



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı : 96681246/
Konu :

12.01.2017

Sayın Doç. Dr. Seruet Özcan
Genom ve Kök Hücre Merkezi

Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu tarafından 20.01.2017 tarihinde yapılan toplantıda çalışmanız ile ilgili alınan Etik Kurul Kararı ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.


Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
Etik Kurul Başkanı

Eki: adet

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Multipotent stromal hücreler üzerine metforminin etkilerinin analizi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLEN DİRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Version Numarası	DİLİ		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama
		SIGORTA
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	
	ILAN	
	YILLIK BİLDİRİM	
	SONUÇ RAPORU	
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	
	DİĞER	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2017/53	Tarih : 20.01.2017
Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereği, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıda katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.		

KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Klavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma ile İlgili	Katılım (*)	İmza
Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL	Çocuk Sağ ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Ahmet ÖZTÜRK	Halk Sağlığı	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Kemal DENİZ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ	Çocuk Sağ. ve Hast.l	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Aydın ÜNAL	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Güven KAHRİMAN	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Kemal ÖZYURT	Dermatoloji	Kayseri Eğitim Hast.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi	E.Ü. Diş Hek. Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Cihangir BIÇER	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Yard. Doç. Dr. Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Yard. Doç. Dr. Gökmen ZARARSIZ	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Av. Serhat ÜSTÜNEL	Avukat	Hukuk Müşaviri	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Sevlap Koçer	Sivil Üye	Serbest	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>

*: Toplantıda Bulunma

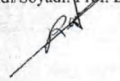
Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır

KLINİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (FF-1, KAEK-90)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Multipotent stromal hücreler üzerine metforminin etkilerinin analizi		
VARSA A FAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU				
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU		
	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı/Melikgazi/KAYSERİ		
	TELEFON	0 352 437 49 10 - 11		
	FAKS	0 352 437 52 85		
	E-POSTA	byancar@erciyes.edu.tr		
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Doç.Dr.Servet Özcan		
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Biyoloji, Kök Hücre , Proteom		
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi, Gönüm ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri		
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ ADI SOYADI			
	DESTEKLEYİCİ			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>	
FAZ 4		<input type="checkbox"/>		
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>		
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>		
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>		
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>		
Diğer ise belirtiniz	Yüksek Lisans Tezi			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOKMERKEZ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:





Funda HANCI ZMECİ
Etik Kurul Sekreteri

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır

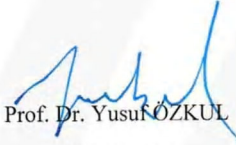
Sayı: 68742022- 604.01.02-187
Konu: Değerlendirme ve Onay

29/11/2016

Sayın Doç.Dr. Servet ÖZCAN ;

“Multipotent Stromal Hücreler Üzerine Metforminin Etkilerinin Analizi” başlıklı projenizi Merkezimiz Kök Hücre Biriminde (Muse Cell Analyzer cihazı) gerçekleştirilmesi tarafımızca uygun bulunmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.


Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL
Müdür V.

Multipotent Stromal Hücreler Üzerine Metforminin Etkilerinin Analizi

ORIGINALITY REPORT

2%	1%	1%	1%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	www.ofimaquinas.com Internet Source	1%
2	www.medipol.edu.tr Internet Source	<1%
3	www.toraks.org.tr Internet Source	<1%
4	Submitted to Erciyes Üniversitesi Student Paper	<1%
5	Submitted to Konya Necmettin Erbakan University Student Paper	<1%
6	Naama Shoham, Aviad Levi Sasson, Feng-Huei Lin, Dafna Benayahu, Rami Haj-Ali, Amit Gefen. "The mechanics of hyaluronic acid/adipic acid dihydrazide hydrogel: Towards developing a vessel for delivery of preadipocytes to native tissues", Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials,	<1%

Fatih Ömerli
fett

Prof. Dr. Fatih Ömerli

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Fatih Ömerli

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 30 Ağustos 1987, Kayseri

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: +90 555 306 65 64

email: fatihomerli@gmail.com

Yazışma Adresi: Gevher Nesibe mh. Gök Geçidi sk. Kocaağa apt. No: 3/4
Kocasinan/Kayseri

EĞİTİM

Derece

Lisans

Kurum

EÜ Fen Bilimleri Biyoloji
Bölümü

Mezuniyet Tarihi

2013

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl

2012-2014

Kurum

AkSoft Bilgisayar

Görev

Teknik Servis Elemanı

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. Özcan S., Alessio N., Acar MB., Mert E., **Ömerli F.**, Peluso G., Galderisi U. Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. Aging. 8(7):1316-29. 2016.