

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

**METFORMİN UYGULAMASININ REPLİKATİF
SENESENT İNSAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERE
ETKİSİNİN GEN İFADESİ DÜZEYİNDE İNCELENMESİ**

**Hazırlayan
Eda MERT GÖKDUMAN**

**Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN**

Yüksek Lisans Tezi

**Temmuz 2018
KAYSERİ**

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

**METFORMİN UYGULAMASININ REPLİKATİF
SENESENT İNSAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERE
ETKİSİNİN GEN İFADESİ DÜZEYİNDE İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Eda MERT GÖKDUMAN**

**Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TYL-2017-7403 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.

Adı-Soyadı: Eda MERT GÖKDUMAN

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Metformin Uygulamasının Replikatif Senesent İnsan Mezenkimal Kök Hücreleri Üzerine Etkisinin Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi” Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi 'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Eda MERT GÖKDUMAN

Danışman

Prof. Dr. Servet ÖZCAN

Kök Hücre Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Prof. Dr. Servet ÖZCAN danışmanlığında Eda MERT GÖKDUMAN tarafından hazırlanan “**Metformin Uygulamasının Replikatif Senesent İnsan Mezenkimal Kök Hücreleri Üzerine Etkisinin Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

25/07/ 2018

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Servet ÖZCAN

Üye : Prof. Dr. Gazi GÖRÜR

Üye : Doç. Dr. Serpil TAHERİ

**ONAY:**

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

.. /.../2018

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Servet ÖZCAN ve Prof. Dr. Umberto GALDERISI'ye teşekkür ederim. Ayrıca katkılarından dolayı Prof. Dr. Munis DÜNDAR'a, Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a ve Genom ve Kök Hücre Merkezi çalışanlarına teşekkür ederim.

Deneyisel çalışmalarım sırasında karşılaştığım zorlukları aşmamda yardımlarından dolayı Dr. Hilal ÜNLÜ AKALIN'a ve çalışma arkadaşlarım Mustafa Burak ACAR ve Fatih ÖMERLİ'ye teşekkür ederim.

Hayatım boyunca sevgi ve desteklerini esirgemeyen, ideallerime ulaşmam için her zaman yanımda olan annem, babam, kardeşlerim ve sevgili eşime sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: TYL-2017-7403) teşekkür ederim.

Eda MERT GÖKDUMAN

Temmuz 2018, KAYSERİ

METFORMİN UYGULAMASININ REPLİKATİF SENESENT İNSAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERE ETKİSİNİN GEN İFADESİ DÜZEYİNDE İNCELENMESİ

Eda MERT GÖKDUMAN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Kök Hücre Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2018
Danışman: Prof. Dr. Servet ÖZCAN

ÖZET

Mezenkimal kök hücreler (MKH), kendini yenileme potansiyeli ve immün modülatör özelliği sebebi ile törepatik etkiye sahiptirler. MKH'lerin törepatik amaçlı kullanılabilmesi için *in vitro* olarak çoğaltılmaları gerekliliği vardır ve bu durum senesens sebebi ile kısıtlanmaktadır. Senesens hücre bölünmesini durduran, ancak hücrelerin metabolik aktivitelerinin devam ettiği dejeneratif bir süreçtir. Metformin; glukoz, insülin ve IGF-1 seviyesini düşüren, Tip 2 diyabette sıklıkla kullanılan etken bir maddedir. Metforminin etki mekanizması senesens mekanizmasında önemli yeri olan IGF (insülin benzeri büyüme faktörü) sinyal yolağı ile yakından ilişkilidir. Bu sebeple bu tez çalışmasında metformin uygulamasının senesens sürecini geciktireceği düşünülerek kültür ortamında replikatif senesens sürecine sokulan MKH'lere eş zamanlı olarak çeşitli dozlarda metformin uygulaması yapılmıştır. Kontrol grubu hücrelere ve metformin uygulanan hücrelere kültürün 14., 21. ve 28. günlerinde senesens ilişkili β -galaktozidaz testi, hücre döngüsü testi ve RT- qPCR çalışması yapılmıştır. RT-qPCR çalışmalarında senesens süreci ile yakından ilişkili stemness genleri ve DNA tamir yolağı ile ilişkili çeşitli genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelenmiştir. Senesens ilişkili β -galaktozidaz testi ve hücre döngüsü testi sonuçları metformin uygulamasının MKH'lerin senesens sürecini özellikle 28. gün 6 mM ve 9 mM grubunda geciktirdiğini göstermiştir. Metformin uygulamasının kültürün geç safhalarında senesent hücre oranını azalttığı, hücre döngüsü testinde ise hücreleri G0/G1 fazından S fazına geçişini sağladığı gözlenmiştir. Ayrıca stemnes genlerinden hücre döngüsünün G1- S faz geçişini sağlayan *KLF4* geni ekspresyon seviyesinin kültürün geç safhasında artması (28. gün 9 mM dozda) da hücre döngüsü testi bulgusunu desteklemiştir.

Anahtar Kelimeler: Metformin, gen ekspresyonu, mezenkimal kök hücre, senesens.

**INVESTIGATION OF EFFECT OF METFORMIN TREATMENT ON
REPLICATIVE SENESCENT HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS AT
GENETIC EXPRESSION LEVEL.**

Eda MERT GÖKDUMAN

**Erciyes University, Graduate School of Health Science
Department of Stem Cell
M.Sc Thesis, July, 2018
Supervisor: Prof. Dr. Servet ÖZCAN**

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) have therapeutic effect due to their self-renewal potential and immunomodulator effect. MSCs need to be replicated in vitro in order to be used for therapeutic purposes, and this is restricted by the cause of senescence. Senescence is a degenerative process that arrests cell division but continues the metabolic activities of the cells. Metformin is an active ingredient which decreases glucose, insulin and IGF-1 levels and is frequently used in Type 2 diabetes. The mechanism of action of metformin is closely related to the insulin-like growth factor (IGF) signaling pathway, which plays an important role in the senescence mechanism. In this manner, we hypothesize that treatment with metformin would delay the senescence. Metformin was administered at various doses on ongoing culture of MSCs. Control group and the metformin treated group were subjected to senescence-related β -galactosidase test, cell cycle test and RT-qPCR test on days 14, 21 and 28 of the culture. Alterations in gene expression of stemness and DNA damage repair (DDR) genes related to the senescence process were investigated by using RT-qPCR. Results of senescence-related β -galactosidase test and cell cycle test showed that metformin treatment delayed the senescence process of MSCs. It has been observed that 6 mM and 9 mM metformin treatment reduced the senescent cell ratio in the late cultures. In the cell cycle test, it was observed that metformin provided the transition of the cells from the G₀ / G₁ phase to the S phase. In addition, the increase in the late phase of the expression of *KLF4* gene, which is one of the stemness genes, which provides G₁-S phase transition of the cell cycle (9 mM dose, day 28) supports the findings.

Key Words: Metformin, gene expression, mesenchymal stem cell, senescence.

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
KABUL ONAY	iv
ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kök Hücre.....	3
2.1.1. Mezenkimal Kök Hücre	3
2.1.1.1. Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler	4
2.1.1.2. Mezenkimal Kök Hücre Karakteristik Özellikleri.....	5
2.1.1.2.1. Morfoloji.....	5
2.1.1.2.2. Yüzey Belirteçleri	5
2.1.1.2.3. Farklılaşma Kapasiteleri	5
2.1.1.2.4. Mezenkimal Kök Hücre Kullanım Alanları.....	6
2.2. Senesens.....	6
2.2.1. Senesens Türleri.....	7
2.2.1.1. Replikatif Senesens.....	7
2.2.1.2. Akut Senesens	8
2.3. DNA Hasarı Ve Kök Hücrelerde DNA Tamir Genleri	8
2.3.1. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları	9
2.3.1.1. G1 Kontrol Noktası.....	10

2.3.1.2. S Kontrol Noktası	10
2.3.1.3. G2 Kontrol Noktası.....	10
2.3.2. DNA Onarım Mekanizmaları	11
2.3.2.1. Çift Zincir Kırıkları (Double Strand Break).....	11
2.3.2.2. Yanlış Eşleşme Tamiri (Miss Match Repair).....	11
2.3.2.3. Baz Eksizyon Tamiri (Base Excision Repair).....	12
2.3.2.4. Nükleotid Eksizyon Tamiri (Nucleotide Excision Repair).....	13
2.4. Kök Hücrelerde Stemness Genleri	14
2.5. Metformin	15
2.6. Hücre Kültürü.....	16
2.7. Hücre Kültürü Ekipmanları.....	16
2.7.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar.....	17
2.7.1.1. Besiyerleri	17
2.7.1.1.1. Besiyeri İçeriği.....	18
2.7.1.1.1.1. Karbohidratlar	18
2.7.1.1.1.2. Vitaminler.....	18
2.7.1.1.1.3. İnorganik Tuzlar	18
2.7.1.1.1.4. Amino Asitler	18
2.7.1.1.2. Besiyerine Eklenen Maddeler	19
2.7.1.1.2.1. Serum	19
2.7.1.1.2.2. Antibiyotik.....	19
2.7.1.1.2.3. Glutamin	19
2.7.1.1.2.4. Büyüme Faktörleri	19
2.7.1.2. Tripsin.....	19
2.7.1.3. Fosfatla Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS)	20
2.8. Çalışmada Kullanılan Testler.....	20
2.8.1. Senesense Bağlı Beta- Galaktozidaz Testi	20
2.8.2. Hücre Döngüsü Testi.....	20
2.8.3. Real-Time qPCR.....	21

3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Mezenkimal Kök Hücre Eldesi	23
3.2. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	23
3.2.1. Metformin Hazırlanması	23
3.2.2. Besiyeri Hazırlanması	23
3.2.3. Hücre Kültürü	23
3.2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerde Replikatif Senesens Oluşturulması.....	24
3.2.5. Deney Grupları ve Süresi	24
3.3. Testler	25
3.3.1. Beta-Galaktosidaz Testi	25
3.3.2. Hücre Döngüsü Testi.....	26
3.3.3. RNA İzolasyonu.....	26
3.3.4. cDNA Sentezi	27
3.3.6. Quantitative Real Time PCR	28
3.3.7. İstatistiksel Analiz	31
4. BULGULAR	32
4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Senesens Testi Bulguları.....	32
4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Hücre Döngüsü Testi Bulguları	33
4.3. RNA İzolasyonu Bulguları.....	34
4.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin RT-qPCR Çalışmaları Bulguları	35
4.4.1. Stemness Genlerinin RT-qPCR Analizlerinden Elde Edilen Bulgular	35
4.4.2. DNA Tamir Genlerinin RT-qPCR Analizlerinden Elde Edilen Bulgular	39
4.4.2.1. Çift Zincir Kırıkları ile İlişkili Genler	39
4.4.2.2. Yanlış Eşleşme Onarımı ile İlişkili Genler	41
4.4.2.3. Baz Eksizyon Onarımı ile İlişkili Genler	43
4.4.2.4. Nükleotid Eksizyon Onarımı ile İlişkili Genler	46
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	51
5.1. Tartışma	51
5.2. Sonuç ve Öneriler	55

6. KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	68



KISALTMALAR

Sembol	Anlamı
μL	: mikro Litre
ADP	: Adenozin difosfat
AMP	: Adenozin monofosfat
AMPK	: AMP ile aktive protein kinaz
ATM	: Ataksi Telanjiektazi Mutasyona Uğramış Kinaz
ATP	: Adenozin trifosfat
ATR	: ATM ve Rad3 İlişkili Protein Kinaz
BER	: Baz Eksizyon Onarımı
<i>BMI1</i>	: <i>BMI1</i> Proto-Onkogen
<i>BRCA2</i>	: Breast Cancer 2
CD Marker	: Cluster Differentiation Marker
Chk1	: Kontrol Noktası Kinaz 1
Chk2	: Kontrol Noktası Kinaz 2
CO₂	: Karbondioksit
CO₃/HCO₃	: Karbonat/Bikarbonat
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sulfoksit
DNA	: Deoksribo Nükleik Asit
DPBS	: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DSB	: Çift Zincir Kırıkları
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ERAS	: Embryonic Stem Cell Expressed Ras
<i>ERCC3</i>	: ERCC Excision Repair 3
FBS	: Fetal Bovine Serum
FGF2	: Fibroblast Büyüme Faktörü 2

<i>FEN1</i>	: Flap Structure-Specific Endonuclease 1
<i>GAPDH</i>	: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
<i>GMP</i>	: Good Manufacturing Practices
<i>GVHD</i>	: Graft Versus Host Hastalığı
H_2O_2	: Hidrojen Peroksit
<i>HEPES</i>	: 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid
<i>HLA-DR</i>	: İnsan Lökosit Antijeni
<i>HPRT</i>	: Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase
<i>IGF-1</i>	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
<i>IGFBP</i>	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayan Protein
$K_3 (Fe(CN)_6)$: Potasyum Ferrisiyanür
$K_4 (Fe(CN)_6)$: Potasyum Ferrosiyanür
<i>KLF4</i>	: Kruppel Like Factor 4
<i>MBD4</i>	: Methyl-Cpg Binding Domain 4
$MgCl_2$: Magnezyum Klorür
<i>MKH</i>	: Mezenkimal Kök Hücre
<i>mL</i>	: mili Litre
<i>MLH1</i>	: Mutl Homolog 1
<i>mM</i>	: mili Molar
<i>MMR</i>	: DNA Yanlış Eşleşme Onarımı
<i>MPG</i>	: N-methylpurine DNA glycosylase
<i>MSH2</i>	: mutS Homolog 2
<i>MSH5</i>	: mutS Homolog 5
<i>RNA</i>	: Ribonükleik Asit
<i>MUTYH</i>	: Muty DNA Glycosylase
<i>NANOG</i>	: <i>NANOG</i> Homeobox
<i>NER</i>	: Nükleotid Eksizyon Onarımı

<i>NTHL1</i>	: Nth Like DNA Glycosylase 1
<i>OCT4</i>	: Octamer-binding transcription factor 4
<i>OGG1</i>	: 8-Oxoguanine DNA Glycosylase
PI	: Propidyum Iyodür
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
p53	: Protein 53
<i>POLD3</i>	: DNA Polymerase Delta 3
<i>RAD23A</i>	: RAD23 Homolog A
RT- qPCR	: Gerçek Zamanlı
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
SA-βgal	: Senesens İlişkili Beta-galaktozidaz
<i>SALL4</i>	: Spalt Like Transcription Factor 4
<i>SLK</i>	: STE20 Like Kinase
<i>SOX15</i>	: SRY-Box 15
<i>TCL1</i>	: T Cell Leukemia/Lymphoma 1
<i>TREX1</i>	: Three Prime Repair Exonuclease 1
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
X-Gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indoil-D-galaktopiranosid
<i>XPA</i>	: DNA Damage Recognition And Repair Factor
<i>XRCC4</i>	: X-Ray Repair Cross Complementing 4
<i>ZFP42</i>	: Zinc Finger Protein
Rb Protein	: Retinoblastoma Protein

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1. cDNA Sentez Reaksiyon İçeriği	27
Tablo 3.2. Revers Transkripsiyon Protokolü	28
Tablo 3.3. qRT-PCR Reaksiyon İçeriği	28
Tablo 3.4. Çalışmada Kullanılan Referans Genler	29
Tablo 3.5. Çalışmada Kullanılan Stemness Genleri.....	29
Tablo 3.6. Çalışmada Kullanılan DNA Tamir Genleri	30
Tablo 4.1. Hücrelerin Senesens Testi Sonuçları.....	32
Tablo 4.2. Senesens Testi Verilerinin t-Testi Sonuçları.....	32
Tablo 4.3. Hücre Döngüsü Testi Sonuçları	33
Tablo 4.4. Hücre Döngüsü Testi Verilerinin t-Test Sonuçları.....	34
Tablo 4.5. RNA İzolasyonu Nanodrop Sonuçları.....	34

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Senesens Sürecinin Sebep ve Sonuçları	7
Şekil 2.2.	Replikatif ve Akut Senesens	8
Şekil 2.3.	DNA Hasarı Sebep ve Sonuçları.....	9
Şekil 4.1.	Metformin Uygulanmış MKH'lerin 14., 21. ve 28.Güne Ait Hücre Döngüsü Fazlarının Yüzde Dağılımı.....	33
Şekil 4.2.	Referans ve Hedef Genlerin RT-PCR Sonrası Agaroz Jel Görüntüsü.	35
Şekil 4.3.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>NANOG</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	35
Şekil 4.4.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>OCT4</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	36
Şekil 4.5.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>KLF4</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	36
Şekil 4.6.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>SOX15</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	37
Şekil 4.7.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>Eras</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	37
Şekil 4.8.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>TCL1</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	38
Şekil 4.9.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>BMI1</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	38
Şekil 4.10.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>ZFP42</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	38
Şekil 4.11.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>SALL4</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	39
Şekil 4.12.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>BRCA2</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	39
Şekil 4.13.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>XRCC4</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	40

Şekil 4.14.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>MRE11A</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	40
Şekil 4.15.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>MLH1</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	41
Şekil 4.16.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>TREX1</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	41
Şekil 4.17.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>MSH2</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	42
Şekil 4.18.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>MSH5</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	42
Şekil 4.19.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>POLD3</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	43
Şekil 4.20.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>MUTYH</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	43
Şekil 4.21.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>MPG</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	44
Şekil 4.22.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>NTHL1</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	44
Şekil 4.23.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>FEN1</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	45
Şekil 4.24.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>OGG1</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	45
Şekil 4.25.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>MBD4</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	46
Şekil 4.26.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>XPA</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	46
Şekil 4.27.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>RAD23A</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	47
Şekil 4.28.	Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>ERCC3</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	47

Şekil 4.29. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin <i>SLK</i> Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	48
Şekil 4.30. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin Stemness Genlerine Ait RT-qPCR Bulgularının Isı Haritası İle Sunumu.	49
Şekil 4.31. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin DNA Tamir Genlerine Ait RT-qPCR Bulgularının Isı Haritası İle Sunumu.	49



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Mezenkimal kök hücreler (MKH), çeşitli hücrelere farklılaşma yeteneği olan multipotent stromal hücrelerdir (1). Çoğu organ ve dokunun homeostatik dengesini korudukları için önemli bir terapötik potansiyele sahiptirler. Ancak, MKH'lerin terapötik amaçlı kullanılabilmesi için *in vitro* olarak fazla sayıda çoğaltılmaları gerekmektedir. MKH'lerin *in vitro* kültür ortamlarında çoğaltılması, pasaj sayısının artması veya hücrelerin kültürde kalma sürelerinin artmasından dolayı senesens adı verilen süreç nedeniyle kısıtlanmaktadır (2).

Senesens; hücre bölünme sayısındaki artışa bağlı olarak, geri dönüşsüz olarak hücre bölünmesinin durmasıdır. Senesense giren hücreler metabolik olarak aktiftirler ancak bölünemezler (2).

Hücrelerin ulaşabileceği en yüksek bölünme sayısı Hayflick Limiti olarak adlandırılır ve Hayflick Limiti sonucu ortaya çıkan senesens sürecine replikatif senesens denir (3). Senesens sürecinin çeşitli belirteçleri vardır. Örneğin DNA hasarı senesens sürecinin önemli bir belirteçidir. Eğer DNA tamir mekanizması bozulursa kök hücre kompartmanında azalma ya da fonksiyon kaybı oluşabilir ve senesens mekanizması tetiklenebilir. Ayrıca son zamanlarda yapılan çeşitli araştırmalar uzayan kültür süreleri sonucu senesent olan MKH'lerin 'stemness' özelliklerini kaybettiklerini göstermiştir (2).

Metformin; glukoz, insülin ve IGF-1 (Insulin benzeri büyüme faktörü-1) seviyesini düşüren, Tip 2 diyabette sıklıkla kullanılan, yan etkisinin az olduğu düşünülen etken bir maddedir. Metforminin etki mekanizması IGF sinyal yolağı ile yakından ilişkilidir. IGF ve IGFBP'lerin (Insulin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein) senesens mekanizmasında önemli yeri olduğu göz önüne alındığında, metforminin senesens mekanizmasına etkisinin kaçınılmaz olduğu düşünülmektedir (4).

Bu çalışmada metformin uygulamasının mezenkimal kök hücrelerde belirlenen bazı DNA tamir genlerinin ve stemness genlerinin ekspresyon seviyesine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. MKH'ler kültür ortamında replikatif senesens sürecine sokulmuş ve eř zamanlı olarak metformin uygulaması yapılmıştır. Kontrol grubu hücreler ve metformin uygulanan hücreler 14., 21. ve 28. günlerde trizol ile toplanmıştır. RT- qPCR teknikleri kullanılarak belirlenen 'stemness' genleri ile DNA tamir genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin analizleri yapılmıştır. Ayrıca hücrelerin kontrol gruplarına kıyasla senesens sürecine girdikleri β -galaktozidaz boyama ve hücre döngüsü testi yapılarak gösterilmiştir.

Verilerin analizi sonucunda kültürde geçen sreye bağlı olarak MKH'lerin senesens ile ilişkili çeşitli genlerin ekspresyon seviyelerinin değiştiği tespit edilmiştir. Metforminin dokuda senesensi azaltan etken bir madde olduğu düşünüldüğünde, dokuda hücre yaşlanmasına bağlı fonksiyon kayıplarından bazılarının azaldığı gözlemlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

Kök hücreler, yüksek sayıda bölünme kapasitesine sahip, kendini yenileyebilen, farklı hücre tiplerine farklılaşma özelliği olan ve çok hücreli organizmalarda bulunan hücrelerdir. Bu hücreler birçok dokuda, organizmanın hayatı boyunca, hücreleri ikame etmek için sınırsız olarak bölünen bir tür iç onarım sistemi olarak hizmet ederler. Bir kök hücre bölündüğünde, her yeni hücrenin ya bir kök hücre olarak kalması (kendini yenileme) ya da kas, kan, beyin hücresi gibi daha özel bir işleve sahip başka bir hücre tipi olma (farklılaşma) potansiyeli vardır (5).

Memelilerde kök hücreler iki tipte bulunur; embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan "somatik" veya "yetişkin" kök hücreler. Embriyonik kök hücreler, embriyonun blastosist evresindeki iç hücre kütesinden (inner cell mass) elde edilirler. Bu hücreler, kalp, akciğerler, deri, sperm, yumurta gibi birçok özel hücre tipinin ve organının tümü dahil olmak üzere, vücutta hemen hemen her somatik (endodermal, ektodermal ve mezodermal) ve germ hücre tipini oluşturabilirler. Yetişkin kök hücreler ise buldukları dokuların onarımı ve yenilenmesinden sorumludurlar ve multipotent hücreler olarak adlandırılırlar (5).

2.1.1. Mezenkimal Kök Hücre

Mezenkimal kök hücreler (MKH), osteoblast, kondrosit, miyosit ve adiposit gibi mezenkimal dokuların hücrelerine farklılaşma yeteneği olan multipotent stromal hücrelerdir (1,2). Mezenkimal kök hücreler ilk olarak Friedenstein ve arkadaşları tarafından kemik iliğinde tanımlanmış, daha sonra diğer yetişkin ve fetal dokulardan izole edilmiştir. *In vitro* ortamda, farklı doku kökenli MKH'ler, plastik yüzeye tutunma, koloni oluşturma kapasitesi ve hızlı proliferasyon gibi ortak özelliklere sahiptirler (1).

MKH'ler göbek bağı, kemik iliği, adipoz doku gibi birçok kaynaktan izole edilebilirler. Kemik iliği, kordon kanı ve adipoz doku kökenli MKH'lerin koloni oluşturma kapasitelerinin karşılaştırılmaları sonucunda, adipoz doku kökenli hücrelerin kapasitesi en yüksek kordon kanı kaynaklı hücrelerin kapasitesinin en düşük olduğu görülmüştür. İzolasyon verimi açısından yapılan çalışmalarda ise kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı MKH'lerin verimi %100'e yakın iken kordon kanı kaynaklı hücrelerin %30-40 verimle elde edilebildiği görülmüştür. Kemik iliği ve yağ doku kaynaklı hücreler benzer immunolojik özelliklere ve morfolojiye sahip olmasına rağmen yağ dokusundan daha fazla sayıda MKH elde edilir. Ancak kemik iliği kaynaklı MKH'lerin daha uzun süredir çalışılması sebebi ile klinik güvenilirlik ve uygulamalar açısından daha fazla veri bulunmaktadır (6,7).

2.1.1.1. Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler

İnsan MKH'leri adipoz dokuda bol miktarda bulunmaktadır. Kemik iliği ile kıyaslandığında kök hücrelerin yağ dokuda bulunma miktarı daha fazladır. Mezenkimal kök hücreler, lipoaspiratta bulunan çekirdekli hücrelerin %2'sini oluştururken, kemik iliğindeki hücre popülasyonunun ise yalnızca %0.001–0.004'ini oluşturmaktadır (8). Lipoaspiratın her bir mililitresinde bulunan kök hücre sayısı kemik iliğinden 8 kat daha fazladır ve lokal anestezi altında elde edilen lipoaspirat hacmi, kemik iliği için mümkün olandan en az beş kat fazladır (9). Ayrıca adipoz doku kökenli MKH'ler, kemik iliği kökenli kök hücreler ile uzun proliferasyon kapasitesi ve 'multilineage' farklılaşma yeteneği gibi özellikler açısından benzerlik göstermektedir (8). Bu hücreler kartilaj, kemik, kas ve yağ gibi mezenkimal kökenli dokulara farklılaşmaktadır. Üç boyutlu kültür sistemleri ile bu hücrelerin kondrojenik ve osteojenik farklılaşması gerçekleştirilmiştir. MKH'lerin nöral hücreler, kardiyomyositler, hepatositler, pankreatik hücreler ve endotelial hücreler gibi diğer hücre türlerine *in vitro* farklılaşması da rapor edilmiştir. Bu durum da adipoz kökenli MKH'lerin farklı germ tabakalarına farklılaşabildiğini göstermektedir (10).

2.1.1.2. Mezenkimal Kök Hücre Karakteristik Özellikleri

2.1.1.2.1. Morfoloji

MKH'ler *in vitro* ortamda plastik kültür kabına tutunan hücrelerdir. Kültür kabına tutunduklarında mikroskop altında düz yassılaştırmış olarak ya da uzun ve ince fibroblast benzeri yapılar şeklinde gözlenirler. İzole edildikleri dokulara göre hücrelerin morfolojisi değişkenlik gösterebilmektedir (11).

2.1.1.2.2. Yüzey Belirteçleri

2008 yılında Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT), hücrelerin MKH olarak sınıflandırılması için yüzeylerinde CD73 (SH3/4), CD90 ve CD105 (SH2) gibi hematopoetik olmayan hücre yüzey belirteçlerini eksprese ederlerken (pozitif), CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 ve HLA-DR (insan lökosit antijeni-DR) gibi tipik hematopoetik belirteçleri eksprese etmemeleri (negatif) gerektiğini bildirmiştir (12).

Adipoz doku kaynaklı MKH'ler için; CD9, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD140b, CD146, CD166 ve HLA I pozitif belirteçler iken, CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79a, CD133 ve CD144 negatif belirteçler olarak bilinmektedir (13).

2.1.1.2.3. Farklılaşma Kapasiteleri

MKH'lerin morfolojik veya fenotipik özellikleri aracılığı ile belirlenmesinin yanısıra, *in vitro* ortamda kemik, yağ ve kıkırdak dokularına farklılaşma kapasiteleri de MKH olarak tanımlanmalarında önemli rol oynamaktadır. Çeşitli çalışmalar MKH'lerin kemik ve adipositlere farklılaşmalarına ek olarak *in vitro* ortamda uygun koşullarda kondrositler, tenositler, iskelet miyositleri, nöronlar ve viseral mezoderm hücrelerine (endotelial hücreler) de farklılaşabildiklerini göstermiştir (14).

MKH'lerin osteoblastlara farklılaşması için klasik yöntem hücrelerin *in vitro* ortamda askorbik asit, gliserofosfat ve deksametazon ile inkübe edilmesidir. Osteoblastik farklılaşma daha sonra Alizarin Red ya da Von Kossa boyaması ile tespit edilebilmektedir. Adipojenik farklılaşma için ise MKH'ler deksametazon, insülin, izobutil metil ksantin ve indometasin ile inkübe edilir. Adipojenik farklılaşma Oil Red O

boyaması ile gösterilmektedir. Kondrojenik farklılaşma için MKH'lerin üç boyutlu kültür edilmesi ve ortamda dönüştürücü büyüme faktörü- β bulunması gereklidir. Kondrojenik farklılaşma ise Alkalın fosfataz boyaması ile belirlenmektedir (14).

2.1.1.2.4. Mezenkimal Kök Hücre Kullanım Alanları

MKH, kas, kemik, kırıldak gibi farklı hücre tiplerine dönüşme potansiyelinin yanısıra ürettikleri sitokinler ve büyüme faktörleri aracılığı ile immün modülatör etkiye sahiptir. MKH'ler kemik iliği ve yağ dokusundan kolayca elde edilebilmektedir. MKH'lerin çok yönlü farklılaşma potansiyeli, immün modülatör potansiyeli ve kolay elde edilebilirliği hasarlı dokunun onarımı için kullanımlarına olan ilgiyi artırmıştır (15).

MKH'ler ilk olarak kanser hastalarında kemik iliğini desteklemek amacı ile klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra Graft Versus Host Hastalığı (GVHD), Crohn hastalığı, Tip 2 diyabet, Multiple Skleroz gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Ayrıca MKH'ler doku ve organ mühendisliği açısından da umut verici hücrelerdir (15, 16).

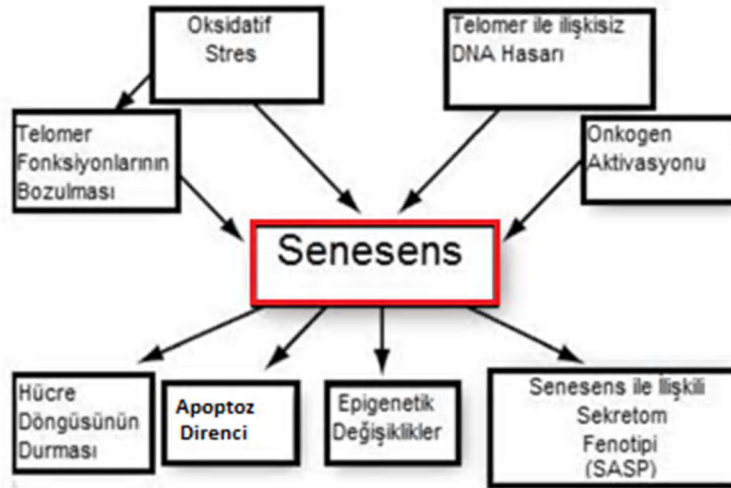
Klinik hücre terapisinde, izolasyondan sonra ve kültür sırasında kök hücre verimi ve elde edilen hücre popülasyonunun saflığı istenen terapötik etkiyi elde etmek için çok önemlidir. Bu nedenle MKH'ler steril ortamlarda üretilir ve kalite kontrol testleri yapıldıktan sonra terapötik amaçlı kullanılır (16).

2.2. Senesens

MKH'ler kendini yenileme kapasiteleri sayesinde çoğu organ ve dokunun homeostatik dengensini korudukları için önemli tedavi edici potansiyele sahiptirler. Ancak MKH'lerin tedavi amaçlı kullanılabilmesi için *in vitro* olarak çoğaltılmaları zorunluluğu mevcuttur. MKH'lerin *in vitro* kültür ortamlarında çoğaltılması senesens adı verilen süreç sebebiyle kısıtlanmaktadır (2).

Senesens; telomer fonksiyon kaybı, reaktif oksijen türleri, DNA hasarının bazı formları ve belirli onkojenlerin aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin reaktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli stres faktörlerinin neden olduğu özel bir hücre bölünmesi durması formudur (Şekil 2.1) (17).

Senesent hücreler diğer bölünmeyen hücrelerden çeşitli belirteçler ve morfolojik değişiklikler aracılığıyla ayırt edilebilir. Örneğin; *in vitro* kültür ortamında senesent hücrelerin boyutlarındaki ve çekirdekçik sayısındaki artış morfolojik değişikliklerdir. Senesens ilişkili β -galaktozidaz olarak bilinen histokimyasal yöntem senesent hücrelerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir belirteçtir. Bu yöntem senesent hücrelerde artan lizozim aktivitesi sonucu pH:6'da artan lizozomal β -Gal aktivitesinin belirlenmesine dayanır. Senesent bir hücrenin diğer belirteci de hücre döngüsünün durmasıdır. Senesent hücrede ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) ve ATR (ATM and Rad3 related protein) gibi kinazlar aktive olur. Bu mekanizma p53'ün dahil olduğu kontrol noktası proteinlerini fosforile ederek bölünmeyi durdurur. Bu sebeple hücrenin DNA içeriği tipik olarak G1 fazındaki bir hücrenin DNA içeriği gibi kalır. Senesent hücreler bölünme yeteneğini kaybetseleler dahi metabolik olarak aktiftirler (18,19).



Şekil 2.1. Senesens Sürecinin Sebep ve Sonuçları (Acar MB, 2015)

2.2.1. Senesens Türleri

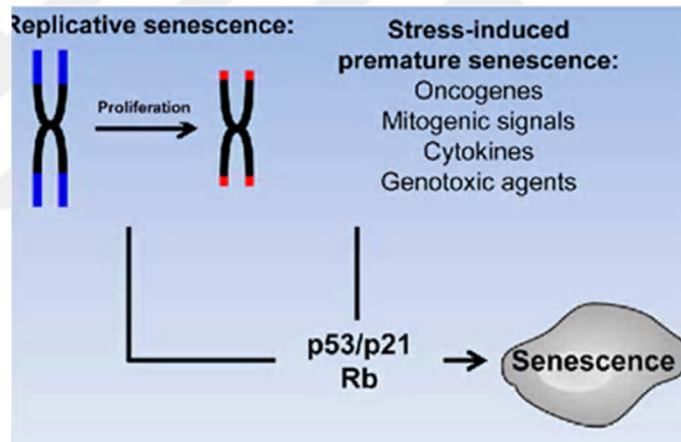
2.2.1.1. Replikatif Senesens

Replikatif senesens, hücre bölünme sayısındaki artışa bağlı olarak, kalıcı şekilde hücre bölünmesinin durması şeklinde tanımlanmıştır. Ökaryotik doğrusal DNA uç kısımlarında, kromozomun bütünlüğünü koruyan telomerler adı verilen tekrar dizileri bulundurulur. DNA replikasyonundan sonra kesintili iplikçikteki son Okazaki fragmetinden sonra gelen primerin çıkarılmasıyla oluşan boşluk sebebi ile her bölünme sonrasında telomerde kısalma meydana gelir. Bu durum hücrelerin bölünme

kapasitelerini kısıtlar ve hücrelerin ulaşabileceği en yüksek bölünme sayısı Hayflick Limiti olarak adlandırılır. Replikatif (kronik) senesens (Şekil 2.2) Hayflick Limiti'nin bir sonucu olarak ortaya çıkar (3).

2.2.1.2. Akut Senesens

Akut senesens, çeşitli kimyasal (Doksorubisin, Hidrojen peroksit (H_2O_2)) ve fiziksel ajanların veya onkogenlerce aktive edilen yolların DNA üzerinde oluşturdukları hasar sonucu ortaya çıkan bir süreçtir. Kronik senesensden farklı olarak, hasar aniden oluşur ve geçici olabilir (20). Örneğin; kemoterapi ajanı Doxorubicin, topoizomerez enzimlerinden biri olan girazı stabilize ederek, DNA'nın açılması sırasında oluşan supercoiling oluşumlarının gevşemesini engeller ve böylece çift zincir kırıklarına yol açarak akut senesensi indükler (21).



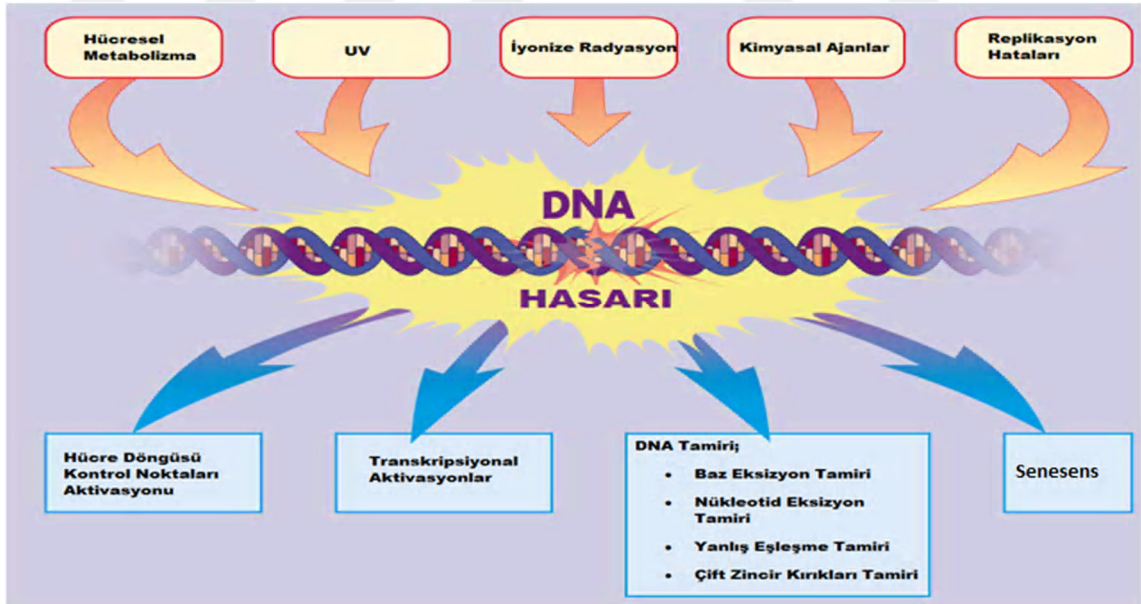
Şekil 2.2. Replikatif ve Akut Senesens. Hücre ve dokularda senesens sürecine sebep olan durumlar ve senesens türleri özetlenmiştir. (Jesus BB, Blasco MA. 2012)

2.3. DNA Hasarı Ve Kök Hücrelerde DNA Tamir Genleri

Kök hücreler, uzun ömürleri nedeniyle birçok iç ve dış strese maruz kalabilir (Şekil 2.3). Hücrenin kendi aktivitesi sonucu oluşan serbest oksijen radikallerinin zamanla birikmesi sonucu ya da iyonize radyasyon ve kemoterapi ajanları gibi çevresel etmenler sonucu DNA hasarı oluşabilir. Öte yandan, hücreler doku ve organ homeostazisini desteklemek için tüm işlevlerini korumalıdır. Bu nedenle, kök hücreler sağlam ve etkili bir DNA hasar kontrol noktasına ve senesens veya apoptozu tetiklemek yerine hücrelerin tamamen iyileşmesini sağlayan DNA onarım

mekanizmasına sahip olmalıdırlar (2,22). DNA tamir mekanizması hücrelerin DNA hasarını minimize etmek için kullandığı temel mekanizmadır (23). Bu mekanizma hasar gören DNA'ların tamir edilmesini sağlar. Ancak DNA tamir mekanizması bozulursa kök hücre kompartmanında azalma ya da fonksiyon kaybı oluşabilir ve senesens mekanizması tetiklenebilir. Bu nedenle DNA hasarı, replikatif senesens sürecinin önemli bir belirteçidir (24).

Tüm ökaryotik hücreler, DNA hasarının potansiyel olarak zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için çok yönlü bir tepki geliştirmiştir (Şekil 2.3). DNA hasarı ya da replikasyonlardaki sorunlar algılandıktan sonra, hücre döngüsü kontrol noktaları, döngünün ilerlemesini durdurmak için aktive edilir. Böylece hasar kardeş hücrelere geçmeden onarım için zaman kazanılmış olur. Kontrol noktası aktivasyonuna ek olarak, DNA hasar cevabı transkripsiyonel programların indüksiyonuna, DNA onarım yollarının uyarılmasına ve hasar seviyesi ciddi olduğunda apoptozun başlatılmasına yol açar. Bu süreçlerin tümü, genetik materyalin doğru şekilde kopyalanması ve korunmasını sağlar (25).



Şekil 2.3. DNA Hasarı Sebepleri ve Sonuçları. (R&D Systems Catalog, 2013)

2.3.1. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

Hücre döngüsü kontrol noktaları, hücre bölünmesinde hücre döngüsü geçişlerinin sırasını ve zamanlamasını izleyen düzenleyici yollardır. Memeli DNA hasar

cevabındaki kontrol noktası yolaklarının kilit düzenleyicileri ATM (mutasyona uğramış ataksia telanjyektazisi) ve ATR (ATM ve Rad3 ile ilişkili protein) protein kinazlardır. ATM ve ATR'nin, çoğu aynı hücrel substratları fosforile ettiği görünse de, genellikle farklı DNA hasar türlerine cevap verirler. ATM, iyonize edici radyasyona maruz kaldığında ortaya çıkabilen DNA çift zincir kırıklarına (DSB) verilen yanıtın birincil aracıdır. ATR ise çift zincir kırıkları cevabında sadece bir destek işlevi görürken, UV hasarı ve DNA replikasyon durmasında verilen ilk yanıtı yönlendirir (25,26).

2.3.1.1. G1 Kontrol Noktası

G1 hücre döngüsü kontrol noktası, hasar görmüş DNA'nın çoğalmasını önler ve memeli hücrelerinde en iyi anlaşılmış kontrol noktasıdır. Bu kontrol noktasının merkezinde p53 proteininin birikmesi ve aktivasyonu vardır. Normal olarak büyüyen hücrelerde p53 düzeyi düşüktür. DNA hasarı sonrası ATM, Chk2'yi (Kontrol Noktası Kinaz 2) aktive eder ve bu da p53'ü fosforile ederek aktiveleştirir. Aktifleşen p53 birikmesi hücre döngüsünün G1 noktasında tutulmasını ya da apoptozun uyarılmasına neden olur (26).

2.3.1.2. S Kontrol Noktası

S fazı kontrol noktası hücre döngüsü ilerlemesini izler ve DNA hasarını takiben DNA sentezini azaltır. Bu kontrol noktası memelilerde en az anlaşılmış kontrol noktasıdır. G1 kontrol noktasında olduğu gibi yine ATM ve ATR'ler görev almaktadır (27).

2.3.1.3. G2 Kontrol Noktası

G2 hücre döngüsü kontrol noktası, kromozom ayırımından önce hücre döngüsünün askıya alınmasını sağlayan önemli bir kontrol noktasıdır. Mitoza girme, sikline bağımlı kinaz Cdc2'nin aktivitesi ile kontrol edilir. Bu kontrol noktası Cdc2 kinaz aktivitesinin inhibisyonuna bağlıdır. Chk1 ve Chk2, Cdc25C'i fosforiller. Chk1 veya Chk2 tarafından serin-216 üzerinde Cdc25c'nin fosforilasyonu, 14-3-3 proteinleri için bir bağlanma alanı yaratır. Nüklear Cdc2, Cdc25c'nin yokluğunda fosforile edilir ve hücreler G2 fazında tutulur. İnsan Chk2, çift zincir kırıkları varlığında ATM'ye bağlı bir şekilde aktive edilir (27).

2.3.2. DNA Onarım Mekanizmaları

2.3.2.1. Çift Zincir Kırıkları (Double Strand Break)

Çift zincir kırıkları (DSB'ler) DNA hasarının en ciddi şeklidir. Çünkü bu hasarlar transkripsiyon, replikasyon ve kromozom ayrımı için problem oluşturmaktadırlar. Bu tip hasarlar, iyonize radyasyon ve bazı genotoksik kimyasallar gibi eksojen ajanlardan ya da endojen olarak üretilen reaktif oksijen türleri, tek iplikli DNA kopmalarının replikasyonu ve kromozomlarda mekanik stres gibi çeşitli sebeplerden kaynaklanabilmektedir (25).

DSB ile ilişkili genler;

BRCA2; Hem *BRCA1* hem de *BRCA2* özellikle çift zincir kırıklarının DNA tamiri için homolog rekombinasyon yoluyla genom stabilitesinin korunması ile ilişkilidirler. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki kalıtsal mutasyonlar, meme ya da yumurtalık kanseri gelişme riskini artırır (26).

MRE11A; Bu gen, homolog rekombinasyon, telomer uzunluğu korunması ve DNA çift zincir kırıklarının onarımında yer alan bir nüklear proteini kodlar. Bu protein 3'- 5' ekzonükleaz aktiviteye ve endonükleaz aktiviteye sahiptir (26).

XRCC4; Bu gen tarafından kodlanan protein, DNA çift zincir kırıklarının onarımı için DNA ligaz IV ve DNA bağımlı protein kinazı ile birlikte işlev görür (26).

2.3.2.2. Yanlış Eşleşme Tamiri (Miss Match Repair)

DNA yanlış eşleşme onarımı (MMR) yolu, sırasıyla nükleotitlerin DNA polimeraz ile yanlış birleşmesinden ve şablon kaymasından kaynaklanan baz-baz uyumsuzlukları ve ekleme / delesyon döngüleri gibi replikasyon hatalarının düzeltilmesinde önemli bir rol oynar (27).

MMR ile ilişkili genler;

MLH1; bu gen tarafından kodlanan protein, DNA yanlış eşleşme onarım sisteminin parçası MutL alfabı oluşturmak için yanlış eşleşme onarım endonükleazı PMS2 ile heterodimerize olur. Kodlanan protein aynı zamanda DNA hasar sinyalizasyonunda yer

alır ve mayoza karışan MutL gama oluşturmak için DNA uyumsuzluğunu onaran protein Mlh3 ile heterodimerize olur (26).

TREX1; bu gen 3'ekzonükleaz aktiviteli bir nüklear preotein kodlar. Kodlanmış protein DNA onarımında rol oynar ve DNA polimeraz için bir düzeltme işlevi görür (26).

MSH2; bu gen tarafından kodlanan protein, DNA replikasyonu sırasında yapılan hataları düzeltmeye yardımcı olur. *MSH2* proteini, DNA replikasyonu sırasında DNA üzerindeki hataların yapıldığı yerleri tanımlar (26).

MSH5; bu gen, DNA uyumsuzluğu onarımı ve mayotik rekombinasyona katılan MutS ailesinden bir üyeyi kodlar. Bu protein, iyonlaştırıcı radyasyonla indüklenen apoptozda rol oynar (26).

POLD3; bu gen, DNA polimeraz deltanın 66 kDa altbirimini kodlar. DNA polimeraz delta hem polimeraz hem de 3'- 5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir ve DNA replikasyonu ve onarımında kritik bir rol oynamaktadır (26).

PRKDC; bu gen DNA bağımlı protein kinazın katalitik alt ünitesini kodlar. DNA çift iplik kırıklarının onarımında ve rekombinasyonunda Ku70 / Ku80 heterodimer proteini ile birlikte çalışır (27).

2.3.2.3. Baz Eksizyon Tamiri (Base Excision Repair)

Baz Eksizyon Onarımı (BER), oksidasyon, metilasyon, deaminasyon veya spontan DNA baz kaybolmasından kaynaklanan hasarları düzelten çok adımlı bir işlemdir. Bu değişiklikler yüksek mutajeniktir ve bu nedenle genom doğruluğu ve stabilitesi açısından önemli bir tehdit oluşturur (28).

BER ile ilişkili genler;

MUTYH; bu gen, oksidatif DNA hasar onarımına katılan bir DNA glikozilazı kodlar. Enzim, adeninin; guanin, sitozin ya da 8-okso-7,8-dihidroguanin ile uygunsuz eşlendiği yerlerde DNA omurgasından adenin bazlarını çıkarır. Bu gen ürününün, oksidatif hasardan sonra tek zincir kırıkları ile apoptoz sinyali vermede rolü olduğu düşünülmektedir (26).

MPG; bu genin ürünü alkilleme lezyonları tarafından oluşturulan hasarlı DNA polimerinden 7-metilguanin hidrolizini sağlar (26).

NTHL1; bu gen tarafından kodlanan protein, endonükleaz III ailesinin bir DNA N-glikosilazıdır (26).

FEN1; bu gen tarafından kodlanan protein DNA onarımında 5 'sarkan kanatları çıkarır ve kesikli iplikçik sentezinde Okazaki fragmanlarının 5' uçlarını işler (26).

OGG1; bu gen, reaktif oksijene maruz kalmanın bir sonucu olarak ortaya çıkan bir mutajenik baz yan ürünü olan 8-oksoguaninin eksizyonundan sorumlu enzimi kodlar. Bu enzimin etkisi, zincir bölünmesi için liyaz aktivitesini içerir (26).

MBD4; bu gen tarafından kodlanan protein, spesifik olarak metillenmiş DNA'ya bağlanabilir ve bazı metillenmiş gen promoterlerinden transkripsiyonu bastırabilir (26).

2.3.2.4. Nükleotid Eksizyon Tamiri (Nucleotide Excision Repair)

Nükleotid Eksizyon Onarımı (NER), DNA hasarlarının çeşitliliği göz önüne alındığında DNA onarım yollarının en esnek olanıdır. Bu hasarların en önemlisi, güneş ışığının UV bileşeninin neden olduğu pirimidin dimerleridir. Diğer NER substratları, ağır kimyasal eklentileri, DNA içbükey çapraz bağları ve bazı oksidatif hasar biçimlerini içerir. NER yolağı tarafından tanınan lezyonların ortak özellikleri, DNA çift ipliğinin hem sarmal bir bozulmasına hem de DNA kimyasının değiştirilmesine neden olmasıdır (28).

NER ile ilişkili genler;

XPA; bu gen, DNA onarımının özel bir türü olan nükleotid eksizyon tamirinde (NER) merkezi bir rol oynayan bir çinko parmak proteini kodlar. Kodlanmış protein DNA ve birkaç NER proteini ile etkileşime girer, DNA hasar alanlarında NER insizyon kompleksini bir araya getirmek için bir iskelet görevi görür (26).

RAD23A; Bu gen tarafından kodlanan protein, nükleotid eksizyon tamirinde yer alan bir protein olan *Saccharomyces cerevisiae* Rad23'in iki insan homologundan biridir. Bu gen tarafından kodlanan protein, nükleotid eksizyon tamirinde ve ayrıca poliübikitinlenmiş proteinlerin proteozoma verilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (26).

ERCC3; bu gen, nükleotid eksizyon tamirinde işlev gören bir ATP bağımlı DNA helikazı kodlar (26).

2.4. Kök Hücrelerde Stemness Genleri

Stemness, kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşmış hücreleri oluşturma özelliklerinin altında yatan moleküler süreci ifade eder. Stemness özelliğini kontrol eden genler başlıca hücrenin kendini yenilemesini ve farklılaşmasını düzenlemede rol oynarlar (2).

OCT4; bu gen embriyonik gelişim ve kök hücre pluripotensinde anahtar rol oynayan bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Bu genin yetişkin dokulardaki istisnai ekspresyonu tümörojenez ile ilişkilidir (26).

NANOG; bu gen tarafından kodlanan protein, embriyonik kök hücre çoğalması, yenilenmesi ve pluripotensini düzenleyen, DNA bağlayan bir transkripsiyon faktörüdür. Kodlanan protein embriyonik kök hücre farklılaşmasını bloklayabilir ve ayrıca farklılaşan hücrelerde kendi ekspresyonunu baskılayabilir (26).

KLF4; bu gen transkripsiyon faktörlerin Kruppel ailesine ait transkripsiyon faktör olan bir protein kodlar. Kodlanan çinko parmak protein cildin bariyer fonksiyonunun normal gelişimi için gereklidir. Kodlanan proteinin, DNA hasarı sonrasında tümör baskılayıcı gen p53 aracılığıyla hücre döngüsünün G1'den S'e geçişini kontrol ettiği düşünülmektedir (26).

SALL4; bu gen, abduzens motor nöronların gelişiminde rol oynadığı düşünülen bir çinko parmak transkripsiyon faktör kodlar (26).

Eras; bu gen küçük GTPaz Ras protein ailesinin sürekli aktif bir üyesi olan geni kodlar. Kodlanan protein farklılaşmamış kök hücrelerdeki fosfotidilinositol 3- kinaz sinyal iletim yolağını aktiveleştirir, fakat farklılaşmış hücrelerde eksprese edilmez. Bu genin kanser ve kemoterapi direnci ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (26).

SOX15; bu gen, hücre kaderinin belirlenmesi ve embriyonik gelişimin düzenlenmesini içeren transkripsiyon faktörlerinin SOX ailesinden bir üyesini kodlar. Kodlanan protein,

diğer proteinlerle bir protein kompleksi oluşturduktan sonra transkripsiyonel düzenleyici olarak davranır (26).

TCLI; insanlarda *TCLI* geninin aşırı ekspresyonu olgun T hücre lösemisi gelişiminde rol oynar. Normal T hücrelerde *TCLI*, CD4-/CD8- hücrelerde eksprese edilir ancak farklılaşan hücrelerde eksprese edilmez. *TCLI*, hücre sağkalım kinazı AKT'nin bir koaktivatörü olarak işlev görür (26).

UTF1; *UTF1* geni tarafından kodlanan protein kromatin ile yakından ilişkilidir ve embriyonik karsinoma ve embriyonik kök hücre farklılaşması için gereklidir. Özellikle pluripotent hücrelerde bulunur ve transkripsiyonel represör olarak işlev görür (26).

BM11; bu gen polykomb grup kompleks I (PRCI)'in ana bileşeni olan bir halka parmak proteini kodlar. Bu kompleks, somatik kök hücrelerde kendini yenileme ve embriyonik gelişimi içeren çoklu düzenleyici genlerin zorunlu epigenetik represörü olarak kromatin yeniden düzenlenmesinde işlev görür. Bu protein DNA hasarı tamirinde de önemli rol oynar. Bu gen bir onkogendir ve uygunsuz ekspresyonu çok sayıda kanserle ve kemoterapi direnciyle ilişkilidir (26).

ZFP42; bu gen pluripotensin bilinen bir belirteçidir ve genellikle farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerde bulunur. Pluripotens için bir belirteç olmasının yanı sıra, düzenlenmesi pluripotensinin sürdürülmesinde de önemli rol oynar (29).

2.5. Metformin

Metformin; glukoz, insülin ve IGF-1 seviyesini düşüren, tip 2 diyabette sıklıkla kullanılan bir anti-diabetik ilaçtır (4). Metformin, iyi tolere edilmesi ve farmakokinetik olarak güvenli bulunması sebebiyle Tip 2 diyabet tedavisinde sıkça tercih edilmektedir. Metformin hepatik glikoneojenezi inhibe ederek etki gösterir. Anti-hiperglisemik etkisine, hepatik insülin duyarlılığı ve kaslardaki glikoz emiliminin artışı aracılık eder (30,31).

Mitokondri metformin için önemli bir hedeftir. Mitokondriyal aktivite sonucu oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) hücreler için toksiktir ve DNA hasarı oluşturabilir. Bu durum oksidatif strese ve mitokondri fonksiyon bozukluğuna sebep olur. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun karaciğer, kas, yağ, kalp ve pankreas gibi dokularda insülin

direnci ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (32). Ayrıca metforminin AMP-activated protein kinaz (AMPK) mekanizmasını da aktive ettiği gözlenmiştir. Glukoz eksikliği ve hipoksi gibi metabolik stres koşullarında artan AMP:ATP oranı AMPK'yı aktive eder. Hepatositlerde mitokondri matriksinde metformin birikir ve mitokondrial solunum zincirindeki kompleks I'ı hedef alır. Kompleks I inhibe edildiğinde ATP üretimi azalır, ADP ve AMP seviyesi artar ve bu durum AMPK aktivasyonuna yol açar. AMPK glikoneojenik gen transkripsiyonunu ve insülin duyarlılığına sebep olan yapı üretimini inhibe eder. Ayrıca metformin uygulamasının DNA hasarı oluşturan ajanların aktive ettiği mekanizmaları baskıladığı gözlemlenmiştir (33).

2.6. Hücre Kültürü

Doku kültürü, yirminci yüzyılın başında, hem normal homeostaz sırasında hem de bir deneyin stresinde *in vivo* olarak ortaya çıkabilecek değişikliklerde hayvan hücrelerinin davranışını incelemek için tasarlanan bir yöntemdi. Daha sonra dokulardaki hücrelerin ekstrasellüler matriks proteinleri ve hücre-hücre bağlantılarını kesecek enzimler kullanımı ile bireysel olarak izole edilebileceği anlaşıldı. Bu durum, bir dokudaki hücrelerin mekanik ya da enzimatik yollarla ayrıştırılması ve organizma dışı ortamlarda hücrelerin yetiştirilmesini sağlayan yöntem olan hücre kültürü teriminin ortaya çıkmasını sağlamıştır (34).

Hücre kültürü, dokulardan gelen hücrelerin homojenizasyonunu ve karakterizasyonu kolaylaştırması ve *in vitro* ortamların modellemesine olanak vermesi sebebiyle avantaj sağlar. Ayrıca, hücrelerin çeşitli etken maddeler, kimyasallar ve ilaçlar ile etkileşimlerinin incelenmesine olanak sağlar. Bu yönü ile hücre kültürü yeni tedavi edici ajanların da bulunmasına katkı sağlar (34).

2.7. Hücre Kültürü Ekipmanları

Hücrelerin kültüre edilmesi için hücre kültürü laboratuvarlarında bulunması gereken temel ekipmanlar vardır. Hücre çalışmalarının yapıldığı steril kabin, kültüre edilen hücrelere uygun yetiştirme ortamı sağlayan (%5 CO₂, 37 °C) karbondioksit inkübatörü ve hücrelerin gözlemlenmesini sağlayan invert mikroskop bu ekipmanların en temelleridir. Hücrelerin pasajlama aşamalarında çöktürülmesinde kullanılan santrifüjler, hücrelerin sayılmasında kullanılan lamalar, kültür malzemelerinin muhafazası için gerekli

soğutucular (+4 °C, -20 °C, -80 °C) ve hücrelerin uzun dönem muhafazası için gerekli azot tankları da hücre kültür laboratuvarlarının önemli malzemeleridir (34).

2.7.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar

2.7.1.1. Besiyerleri

Kültüre edilen hücreler steril bir ortam ve büyümek için besinlere ihtiyaç duyarlar. Besiyerleri hücrelerin büyüüp çoğalması için gerekli besinleri sağlayan sıvılardır. Hücrelerin büyümesi için gerekli amino asitler, vitaminler, yağ asitleri, tuzlar besiyerinin içeriğini oluşturmaktadır. Besiyerleri pH açısından stabil olmak zorundadır. Çoğu hücre 7.2-7.4 pH aralığında yaşar ve pH'nın stabilitesi optimum hücre kültürü koşulları için zorunludur. pH 'nın düzenlenmesi çeşitli tampon sistemleri aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Bunlardan ilki karbon dioksitin (CO₂) besiyerinin karbonat/bikarbonat (CO₃ /HCO₃) içeriği ile dengelendiği doğal tampon sistemidir. Bir diğeri ise HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) olarak adlandırılan bir ziviteryonun kullanıldığı kimyasal tamponlama sistemidir. Doğal bikarbonat/ CO₂ tamponlama sistemleri kullanan kültürler genellikle % 5-10 CO₂ sağlayan inkübatörlerde inkübe edilmelidir. Bu sistemin düşük maliyetli olması, toksik olmaması ve hücrelere kimyasal faydalar sağlaması avantajlarındanır. HEPES, pH 7.2-7.4 aralığında çok iyi tamponlama kapasitesine sahiptir. Pahalı olması ve yüksek dozlarda bazı hücre grupları için toksik olması dezavantajlarındanır. HEPES sistemi kontrol altında tutulan gaz ortama ihtiyaç duymamaktadır. Çoğu ticari kültür medyumları pH indikatörü olarak fenol red içermektedir. Kültür medyumunu, rengi sarıya (asidik) ya da mora (bazik) döndüğünde değiştirilir (35).

Hücre kültüründe besiyerinin sıcaklığı da önemli bir etkidir. Kullanım dışında soğutucularda saklanan besiyerleri hücre kültür ortamına uygulanmadan önce 37 °C'ye ısıtılmalıdır (35).

2.7.1.1.1. Besiyeri İçeriği

2.7.1.1.1.1. Karbohidratlar

Besiyerlerinde enerjinin temel kaynağı şeker formundaki karbohidratlardır. Genellikle glukoz ve galaktoz besiyerlerinin temel şekerleridir. Ancak bazı besiyerleri maltoz ya da sükroz da içerebilmektedir. Besiyerlerinin şeker oranı 1g/L ile 4.5g/L arasında değişebilmektedir. Yüksek şeker oranına sahip besiyerleri çok yaygın olmayan hücrelerin büyümesini desteklerken, MKH'ler için düşük glukozlu (1 g/L) besiyerleri kullanılmaktadır (35).

2.7.1.1.1.2. Vitaminler

Hücre kültürlerinde kullanılan serum vitaminlerin temel kaynağıdır. Ancak çoğu besiyeri vitaminlerce zenginleştirilmiştir. Vitaminler birçok kofaktörün öncülleridir. B grubu vitaminleri gibi çoğu vitaminler hücre büyümesi ve proliferasyonu için zorunludur. Bazı besiyerleri vitamin A ve E'den zengindir. Vitaminler genellikle besiyerine riboflavin, tiyamin ve biotin sağlamak için kullanılırlar (35).

2.7.1.1.1.3. İnorganik Tuzlar

Besiyerinde bulunan inorganik tuzlar, hücrelerin osmotik dengesini korumasına ve kalsiyum, potasyum, sodyum gibi iyonlar aracılığıyla membran potansiyelini düzenlemesine yardımcı olur. Tüm bunlar hücre tutunması ve enzim kofaktörleri olarak hücre matriksi için gereklidir (35).

2.7.1.1.1.4. Amino Asitler

Amino asitler proteinlerin yapı taşlarıdır. Hücreler esansiyel amino asitleri kendileri sentezleyemedikleri için bu amino asitler besiyerine eklenmek zorundadır. Glutamin, hücre kültüründe kullanılan esansiyel amino asittir. Glutamin hızlı degrade olduğu için, besiyeri kullanılmadan hemen önce eklenerek hücrelerin optimum performans göstermesi sağlanır. Bazı besiyerleri daha kararlı olan L-Alanil glutamin içerirler. Esansiyel olmayan amino asitlerin de besiyerine eklenmesi hem hücre büyümesini tetikler hem de kültür süresince canlılıklarını uzatır (35).

2.7.1.1.2. Besiyerine Eklenen Maddeler

2.7.1.1.2.1. Serum

Serum, MKH'lerin besiyerlerine eklenen önemli bileşenlerdendir. Genellikle besiyerlerine %10 oranında katılan serumlar; çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve hücrelerin kültür kaplarına tutunmasını sağlayan faktörler içerirler. Fetal Bovine Serum (FBS); trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF2-ya da bFGF), epidermal büyüme faktörü ve az miktarda farklı büyüme faktörleri içermektedir (36).

2.7.1.1.2.2. Antibiyotik

Hücre kültürü çalışmalarının aseptik koşullarda yapılması ve besiyerinin steril olması önem arz etmektedir. Bakteri ve fungus kontaminasyonundan hücreleri korumak amacıyla besiyerlerine antibiyotikler eklenir. Sıklıkla kullanılan antibiyotikler; penisilin, streptomisin, gentamisin ve amfoterisin'dir (36).

2.7.1.1.2.3. Glutamin

Glutamin, hücre kültüründe kullanılan esansiyel amino asittir. Glutamin hızlı degrade olduğu için, besiyeri kullanılmadan hemen önce eklenerek hücrelerin optimum performans göstermesi sağlanır (35).

2.7.1.1.2.4. Büyüme Faktörleri

Serum çeşitli büyüme faktörlerini içermesine rağmen bazı hücrelerin daha iyi büyümesi için besiyerine büyüme faktörü ilavesi gerekebilmektedir. Yaygın olarak Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGF), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) ve insulin benzeri büyüme faktörleri olan IGF-I ve IGF-II'ler kullanılmaktadır (36).

2.7.1.2. Tripsin

MKH'ler gibi kültür kabına tutunan hücrelerin yeterli yoğunluğa ulaşması sonucu ya da analizler için toplanması amacı ile kültür kabından kaldırılması için Tripsin enzimi kullanılmaktadır. Ancak Tripsin enziminin proteolitik aktivitesi hücre yüzey reseptörleri

ya da membran proteinlerini keserek hücreye zararlı olabilir. Bu nedenle hücreler Tripsin enzimi ile kısa süreli muamele edilir ve enzim aktivitesi serum ile durdurulur (37).

2.7.1.3. Fosfatla Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS)

Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltileri (PBS) genellikle hücre yüzeyinin yıkanması amacı ile kullanılmaktadır. Hücrelerin idamesi ya da pasajlanması sırasında tutunan hücre yüzeyinin yıkanmasını ve tripsin enziminin aktivitesini önleyecek serum kalıntılarının uzaklaştırılmasını sağlar. Hücre kültüründe yıkama işlemleri için kullanılan PBS kalsiyum ve magnezyum içermez. Kalsiyum ve magnezyum içeren PBS ise genellikle primer kültür sırasında kollejenaz enziminin aktivitesini sağlar (36).

2.8. Çalışmada Kullanılan Testler

2.8.1. Senesense Bağlı Beta- Galaktozidaz Testi

Senesens ilişkili Beta Galaktozidaz aktivitesi, replikatif senesens biyomarkırı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Senesent hücrelerdeki lizozomal kütle artışının bir sonucu olarak, klasik lizozomal enzim seviyesindeki artışın hücrelerde tespit edilen pH 6 β -galaktosidaz aktivitesi ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (38).

pH 6.0'da saptanabilen Senesense Bağlı Beta-Galaktozidaz (SA- β gal) aktivitesi, kültürdeki ve memeli dokularındaki senesent hücrelerin tanımlanmasına olanak sağlar. β -galaktosidaz enzimi ile çözünmeyen bir mavi bileşik oluşturan kromojenik substrat 5-bromo-4-kloro-3-endoil-D-galaktopiranosid (X-gal) kullanılarak senesent hücrelerin tespiti sağlanır. Lizozomal B-galaktozidaz aktivitesi, çoğu memeli hücresinde, normal olarak pH 4'te, X-Gal kullanılarak gerçekleştirilen sitokimyasal boyama vasıtasıyla yerinde tespit edilebilir. Ancak spesifik olarak senesent insan fibroblast kültürlerinde bulunan, fakat 'quisent' veya farklılaşmış hücrelerde bulunmayan bir pH 6-galaktozidaz aktivitesi senesent hücrelerin ayrımını sağlar (18,39).

2.8.2. Hücre Döngüsü Testi

Hücre döngüsü, ökaryotik hücrelerin büyümesi ve iki yavru hücreye bölünmesi ile sonuçlanan önemli ve temel süreçlerden birini temsil eder. Hücre döngüsünün

düzenlenmesi, genetik hasarın onarımını ve kontrolsüz hücre bölünmesinin önlenmesini düzenlediği için hücre sağ kalımı açısından kritiktir. Hücre döngüsü regülasyonundaki bozukluklar, tümör hücrelerinin karakteristik bir özelliğidir ve hücre döngüsünün kontrol edilmesinde rol oynayan genlerdeki mutasyonlar, kanserde oldukça yaygındır. Bu sebeplerden dolayı hücre döngüsü analizi, kanser karşıtı bileşiklerin etkisini anlamada veya hücre bölünmesi mekanizmalarını incelemede giderek daha önemli hale gelmiştir (40,41)

Akım sitometri temelli bir cihaz olan Muse Cell Analyzer, Muse™ (Merck Millipore, ABD) Cell Cycle Kiti aracılığı ile hücrelerin hücre döngüsü aşamalarının tespitinin gerçekleştirilmesine olanak sağlar. Cell Cycle kiti, özel bir formülasyonda nükleer DNA'ya bağlanan Propidyum Iyodür (PI) boyası ve RNAz A içeren bir solüsyon sunar. PI, DNA boyanmasının özgünlüğünü arttıran RNAz varlığında hücrelerin farklı DNA içeriğine dayanarak, hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki hücreleri ayırır (42).

Dinlenme fazındaki hücreler (G0/G1), her bir kromozomun iki kopyasını içerir. Hücreler döngüye girdiklerinde, kromozomal DNA'yı (S fazı) sentezlerler. Tüm kromozomal DNA iki katına çıkana kadar (G2/M fazı) PI'dan gelen floresan yoğunluğu artar. Bu aşamada, G2/M hücreleri, G0/G1 popülasyonunun iki katı yoğunlukta floresana sahiptir. Bu analiz, her hücre döngüsü fazındaki (G0/G1, S ve G2/M) hücre yüzdesini ayırt etmek ve ölçmek için DNA içeriğinin PI ile boyanmasına dayanmaktadır (42).

2.8.3. Real-Time PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), kompleks bir DNA havuzundan spesifik bir DNA fragmentinin çoğaltılmasını sağlayan basit, enzimatik bir yöntemdir (43). Her PCR reaksiyonu hedef DNA bölgesinin çoğaltılması için kalıp DNA, primerler, nükleotitler ve DNA polimeraz enzimine gereksinim duyar. DNA polimeraz enzimi, bireysel nükleotitleri birbirine bağlayarak PCR ürününü oluşturan enzimdir. Nükleotitler, DNA yapısında bulunan adenin, guanin, sitozin ve timin bazlarıdır. Primerler, çoğaltılacak hedef DNA dizisine tamamlayıcı, kısa DNA parçalarıdır. Primerler DNA polimeraz enzimi için uzama noktası sağlarlar ve her hedef bölge için özel üretilirler. Tüm bu bileşenler reaksiyon tüpünde karıştırılıp 'Thermal Cycler' cihazında tekrarlayan döngülere tabi tutularak DNA amplikasyonu gerçekleştirilir (43,44).

PCR reaksiyonu temelde üç basamaktan oluşur; denatürasyon, hibridizasyon (annealing) ve uzama. Denatürasyon, çift iplikli kalıp DNA'nın yüksek sıcaklıkta (95-98 °C) ayrıştırılması ve tek iplikçikler oluşturularak primerler için hedef haline getirildiği basamaktır. Daha sonra sıcaklık tek iplikçikli kalıp DNA'daki hedef dizinin primerler ile birleşmesine izin verecek şekilde düşürülür ve bu basamak hibridizasyon ya da annealing olarak adlandırılır. Hibridizasyon sıcaklığı, doğrudan primerin uzunluğuna ve bileşimine bağlıdır. Primerler bağlandıktan sonra DNA polimeraz enziminin hedef bölgeye özgün olarak bazları eklemesi ve istenen DNA bölgesini çoğaltılması uzama basamağı olarak adlandırılır. Uzama basamağı genellikle 72-78 °C'de gerçekleştirilir. Bu üç döngünün her bir tekrarı DNA miktarının iki katına çıkması ile sonuçlanır (44).

PCR'ın geliştirilmiş versiyonu olan gerçek zamanlı PCR olarak adlandırılan teknik gen ekspresyon seviyesinin kantitatif ölçümlerinin yapılabilmesine olanak verir. Kantitatif gerçek zamanlı PCR (RT-qPCR), DNA'nın sadece belirlenmesinin ötesinde DNA hakkında bilgi sağlar. qPCR, PCR ürünü sentezlenirken eş zamanlı olarak ürünün hem saptanması hem de nicelleştirilmesini sağlar (45). Biriken ürünün gerçek zamanlı izlenmesi, primerlerin, problemlerin veya PCR ürününün fluorojenik moleküller ile etiketlenmesi ile mümkün kılınır (46). PCR ürünlerinin belirlenmesi ve miktarının saptanması için yaygın olarak iki yöntem kullanılır. Bu yöntemlerden ilki çift iplikli DNA'ya nonspesifik olarak bağlanan florasan boyaların kullanılması iken (YO-PRO-1, Sybr Green 1, EvaGreen vb.), ikincisi ise florasan etiketli dizi spesifik DNA problemlerin kullanılmasıdır (43,46). En yaygın olarak kullanılan ve bu çalışmada da kullanılan SYBR Green I, standart PCR koşulları altında iki pozitif yükü ile çift iplikli DNA'ya yüksek bağlanma afinitesi olan asimetrik bir siyanin boyasıdır. Ortamda çift iplikli DNA sayısı arttıkça Sybr Green floresan ışınması da birikir ve ürün miktarı hakkında bilgi verir (47).

DNA polimeraz enziminin hata yapma eğilimi sonucu hedef dizide mutasyonlar oluşabilmesi, primerlerin kalıp DNA üzerinde farklı bölgelere bağlanarak spesifik olmayan dizileri çoğaltabilmesi ve her PCR döngüsünün kalıp DNA'ya gereksinmesi gibi metodun kısıtlamaları olmasına rağmen PCR yöntemi araştırmacılar ve klinisyenler tarafından yaygın olarak kullanılmaya devam edilmektedir (43).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Mezenkimal Kök Hücre Eldesi

Bu çalışmada adipoz doku kaynaklı insan mezenkimal kök hücreleri kullanılmıştır. Kullanılan hücreler; Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi Good Manufacturing Practices (GMP) ünitesinden temin edilmiştir. Erciyes Üniversitesi İnsan Etik Kurulunun 96681246 sayılı 09.02.2017 tarihli etik kurul kararı ile kullanımı onaylanmıştır.

3.2. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

3.2.1. Metformin Hazırlanması

Bu çalışmada, saf metformin (165.6 g/mol) kullanıldı. 3.45 mg saf metformin 42 mL DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) içinde çözülüp, 0.22 µm filtre (Merck Millipore, ABD) ile süzülerek stok solüsyon hazırlandı. Hazırlanan metformin solüsyonu, 1.5 mM, 3 mM, 6 mM ve 9mM dozlarda hücrelere uygulandı.

3.2.2. Besiyeri Hazırlanması

Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin kültürü için, %10 FBS (Biological Industries, İsrail), %1 L-glutamin (Gibco, UK) ve %1 Penisilin-Streptomisin (PAA) içeren düşük glukozlu DMEM (1g/L glukoz) (Biological Industries, İsrail) besiyeri hazırlandı.

3.2.3. Hücre Kültürü

Azot tankında saklanan MKH'ler, çözülerek deneysel çalışmalarda kullanıldı. 1.5 mL dondurma solüsyonu içerisinde bulunan hücreler su banyosunda ısıtılarak çözüldükten

sonra üzerine 8.5 mL besiyeri eklendi. Hücreler 350 xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücre pelleti 10 mL besiyeri ile resüspanse edilerek tekrar 350 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet besiyeri ile resüspanse edilip Thoma lamı ile hücreler sayıldı. 75 cm²'lik kültür kabına 4x10⁵ hücre olacak şekilde 8 mL besiyeri ile ekim yapıldı. Hücreler %5 CO₂ içeren inkübatörde 37 °C'de inkübe edildi.

Hücreler her gün kontrol edildi ve kültür kabındaki yoğunlukları %80'e ulaştığında pasajlanarak yeni kültür kaplarına ekim yapıldı. Pasajlama sırasında kültür kabından besiyeri uzaklaştırıldı ve serum kalıntılarının Tripsin enzimi aktivitesini engellemesini önlemek amacıyla hücreler iki defa DPBS ile yıkandı. Kültür kabından hücreleri kaldırmak amacıyla 3 mL Tripsin enzimi eklendi ve 37 °C'de 4 dakika inkübe edildi. Hücreler kültür kabından kalkınca kullanılan tripsin enziminin %10'u kadar FBS(Fetal Bovine Serum) eklenerek enzim aktivitesi durduruldu. Hücreler falkon tüplere alınıp 350 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. DPBS ile 2 defa yıkama işlemi gerçekleştirildi ve hücreler farklı kültür kabına 4x 10⁵ hücre olacak şekilde 8 mL besiyeri ile ekildi.

3.2.4. MKH'lerde Replikatif Senesens Oluşturulması

Kültürün erken safhalarındaki MKH kültür kabındaki yoğunluğu % 80'e her ulaştığında pasajlanarak 28 gün boyunca kültüre edildi.

3.2.5. Deney Grupları ve Süresi

Deney grupları, kontrol grubu ve dört farklı dozda metformin uygulanan MKH'lerden oluşmaktadır. Literatürde yapılan araştırmalar doğrultusunda yaygın kullanılan doz aralığında olan olan 1.5 mM, 3mM, 6 mM ve 9 mM dozajları kullanıldı (48). Normal ilaç alımı günlük olduğu için bu durumu simule edebilmek amacıyla hücrelerin besiyerleri günlük değiştirilip metformin uygulaması yapıldı. Kontrol grubunu oluşturan hücreler herhangi bir ilaç uygulaması yapılmaksızın diğer gruplar gibi besiyerleri her gün değiştirilerek kültüre edildi.

Senesens sürecinin gözlenebilmesi için deney süresi 28 gün olarak belirlendi. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaşınca pasajlanarak kültüre edilmeye devam edildi. 14., 21. ve 28. günlerde kontrol gruplarına ve metformin uygulanmış hücre gruplarına senesens ve

hücre döngüsü testi yapıldı. RT-qPCR çalışmasında trizol kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı.

3.3. Testler

3.3.1. Beta-Galaktosidaz Testi

X-gal Stok Solüsyonu: 200 mg toz halindeki X-gal (Thermo, ABD), 5 mL N,N-Dimetilformamit içinde çözüldü. Konsantrasyonu 40mg/ml olan stok solüsyon uzun süreli kullanım amacıyla ışıktan korunarak -80 °C'de muhafaza edildi.

Boyama Solüsyonu: 0.165 gr $K_3 (Fe(CN)_6)$ (Potasyum ferrisiyanür) ve 0.22 gr $K_4 (Fe(CN)_6)$ (Potasyum ferrosiyanür) (Sigma, ABD) tartıldı. 200 μ L 1M $MgCl_2$ ve tartılan maddeler 100 mL PBS içerisinde çözüldü. pH: 6 olacak şekilde ayarlandı.

Tam Boyama Solüsyonu: 19.5ml boyama solüsyonuna 500 μ l X-gal stok solüsyonu eklenerek toplamda 20ml tam boyama solüsyonu elde edildi.

Fiksatif Solüsyonu: % 0.2 konsantrasyonda 20ml fiksatif solüsyonu elde etmek için %25 Glutaraldehit'ten (Sigma, ABD) 160 μ l alınarak 19.84ml PBS'e eklendi.

14, 21, ve 28. günlerde tripsin ile kaldırılan hücrelerden her bir grup için 30 000 hücre 6 kuyucuklu plağa ekildi. Yaklaşık 8 saat sonra hücreler tutununca, besiyeri uzaklaştırıldı, hücreler DPBS ile yıkandı. Her kuyucuğa %0.2 glutaraldehit (Sigma, ABD) eklendi ve 15 dakika inkübe edilerek hücreler fikse edildi. İnkübasyon sırasında önceden hazırlanmış X-gal stok solüsyonu, boyama solüsyonuna eklenerek tam boyama solüsyonu oluşturuldu. İnkübasyondan sonra glutaraldehit uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez DPBS ile yıkandı. Tam boyama solüsyonu eklendi ve plağın etrafı parafilmle kaplanarak hava alması engellendi. 18 saat 37 °C'de inkübe edildi. 18 saat sonunda her kuyucukta toplam 3 alanda 100'er hücre sayıldı. Her bir alanda sayılan hücrelerden senesent fenotipi gösterenleri (mavi renkle boyanmış, dağınık ağısı yapı ve çok çekirdekli), genç hücrelere (boyanmamış ve ince ipliksi) oranlanarak senesent hücre yüzdeleri belirlendi.

3.3.2. Hücre Döngüsü Testi

14, 21. ve 28. Günlerde tripsin ile kaldırılan hücre grupları Muse™ Cell Cycle Kit protokolüne (Merck Millipore, ABD) göre test edildi. Kitin talimatları doğrultusunda; 500.000 hücre tripsin ile kaldırıldıktan sonra bir defa PBS ile yıkandı. Süpernatant atıldı. Hücrelerin üzerine vortekslenerek yavaşça 1 mL soğuk %70'lik etanol eklendi ve bir gece -20 °C 'de bekletildi. Fikse olan hücrelerden 200 µL yeni bir endorf tüpe alındı. Hücreler 300 xg'de oda ısısında 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pellet 250 µL DPBS ile resuspense edildi. Tekrar 300xg'de oda ısısında 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet üzerine 200 µL 'Muse™ Cell Cycle Reagent' (Merck Millipore, ABD) eklenerek karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnekler Muse™ Cell Analyzer (Merck Millipore, ABD) cihazında analiz edildi.

Hücre döngüsü analizi, her hücre döngüsü fazındaki (G0/G1, S ve G2/M) hücre yüzdesini ayırt etmek ve ölçmek için DNA içeriğinin Propidyum İyodür (PI) ile boyamasına dayanmaktadır.

Muse Cell Cycle (Merck Millipore, ABD) kiti, nüklear DNA'ya bağlanan Propidyum İyodür (PI) boyası ve RNAz A içeren solüsyonu aracılığı ile hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki hücreleri bu hücrelerin farklı DNA içeriğine dayanarak ayırmayı sağlar. Dinlenme fazındaki hücreler (G0/G1), her bir kromozomun iki kopyasını içerir. Hücreler döngüye girdiklerinde, kromozomal DNA'yı (S fazı) sentezlerler. Tüm kromozomal DNA iki katına çıkana kadar (G2/M fazı) PI'dan gelen floresan yoğunluğu artar. Bu aşamada, G2/M hücreleri, G0/G1 popülasyonunun iki katı yoğunlukta floresana sahiptir. Bu floresan ışımaya yoğunlukları farkından faydalanarak Muse™ Cell Analyzer cihazı hücre döngüsü analizini gerçekleştirir (42).

3.3.3. RNA İzolasyonu

14., 21. ve 28. günlerde her bir hücre grubu üzerine, buz üzerinde 500 µL trizol (TriPure Isolation Reagent, Sigma, ABD) eklendi ve hücreler kültür kabından kazınarak etiketlenen endorf tüplere alındı. Örnekler çalışma yapılana dek -80 °C 'de saklandı.

-80 °C'de saklanan örnekler 5 dakika oda ısısında bekletilerek çözüldü. Örnekler üzerine 200 µL kloform (Sigma, ABD) eklendi. 15 saniye çalkalandı. Oda ısısında 15

15 dakika inkübe edildi. Faz ayrımını sağlamak için 12 000 x g'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Üstte oluşan, RNA'yı içeren aköz faz yeni tüpe alındı. Aköz faz üzerine 500 µL izopropanol (Sigma, ABD) eklenip çalkalandı. 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. 12 000 x g'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Örnekler üzerine 1 mL %75 Etanol (Sigma, ABD) eklenip vorteksledi. 7500 x g'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Tüpler ağzı açık şekilde kurutularak etanol kalıntısı uzaklaştırıldı. Sonrasında RNA pelleti DEPC (diethylpyrokarbonat) ile muamele edilmiş su (Thermo Fisher, ABD) ile çözüldü. 60 °C'de 10 dakika bekletilerek pelletin iyice çözünmesi sağlandı. RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflıkları Nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop 2000, ABD) ile ölçülerek belirlendi.

3.3.4. cDNA Sentezi

EvoScript cDNA Synthesis Kit (Roche, İsviçre) protokolü takip edilerek konsantrasyonları belirlenen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. Tablo 3.1'de içeriği verilen cDNA reaksiyon içeriği kalıp RNA hariç olarak buz üzerinde miks olarak hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon miksi etiketlenen PCR tüplerine 15'er µL dağıtıldı. Her bir RNA örneğinden kendi tüpüne 5 µL eklendi. Tablo 3.2'de verilen parametrelerde revers transkripsiyon Thermal Cycler (Sensoquest, Almanya) cihazında gerçekleştirildi. Protokol tamamlandıktan sonra cDNA örnekleri -20 °C'de bekletilerek reaksiyon durduruldu ve örnekler kullanılabilecek şekilde -20 °C'de saklandı. Yapılan optimizasyon sonucu cDNA'ların 1:10 oranında seyreltilerek kullanılmasına karar verildi.

Tablo 3.1. cDNA İzolasyon Kokteyli

cDNA Kokteyli Bileşenleri	Hacim (µL)
Reaksiyon Buffer(5x)	4
Kalıp RNA	5
Su, PCR	9
Enzim Karışımı (10x)	2
Total	20

Tablo 3.2. Revers Transkripsiyon Protokolü

Basamak	Sıcaklık	Süre (dakika)
1	+42 °C	15
2	+85 °C	5
3	+65 °C	15
4	+4 °C	Sonsuz

3.3.6. Quantitative Real Time PCR

Metformin uygulanan insan MKH'lerin 14., 21. ve 28. günlerdeki gen ekspresyonlarındaki değişimin incelenmesi amacıyla Roche LightCycler 480 II cihazında, LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, İsviçre) kiti kullanılarak 'quantitative RT-PCR' çalışmaları gerçekleştirildi. Tablo 3.3'te içeriği verilen reaksiyon miksi cDNA'lar hariç örnekler için hazırlandı. 96 kuyucuklu plağa hazırlanan miks bütün kuyucuklara 15'er µL dağıtıldı. cDNA'lar ilgili kuyucuklara 5'er µL eklendi. Plate dikkatlice kapatıldı ve santrifüj edilerek cihaza yerleştirildi. Syber Green I 96-II protokolü seçilerek PCR çalışmaları gerçekleştirildi.

Hedef genlerin mRNA düzeyi, *GAPDH* ve *HPRT* referans genleri ile elde edilen CT değerleriyle $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre normalize edilmiştir.

PCR çalışmalarında kullanılan primerlere ait bilgiler Tablo 3.4, Tablo 3.5 ve Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.3. RT-qPCR Kokteyli Bileşenleri

qRT-PCR Bileşenleri	Hacim (µL)
Sybr Green I Master (2x)	10
Forward Primer	0.5
Reverse Primer	0.5
Su, PCR Grade	4
cDNA	5
Total	20

Tablo 3.4. Çalışmada Kullanılan Referans Genler

Referans Genler	Primer Pozisyonu	Primer Dizisi	PCR Ürünü Uzunluğu (bp)
<i>GAPDH</i>	382	5' AATCCCATCACCATCTTCCA 3'	82
	463	5' TGGACTCCACGACGTACTCA 3'	
<i>HPRT</i>	489	5' GACCAGTCAACAGGGGACAT 3'	132
	620	5' CCTGACCAAGGAAAGCAAAG 3'	

Tablo 3.5. Çalışmada Kullanılan Stemness Genleri

Stemness Genleri	Primer Pozisyonu	Primer Dizisi	PCR Ürünü Uzunluğu (bp)
<i>OCT4</i>	1121	5' TCCCATGCATTCAAACCTGAGG3'	103
	1223	5'CCAAAAACCCTGGCACAAACT3'	
<i>NANOG</i>	1169	5' TGGACACTGGCTGAATCCTTC 3'	103
	1310	5' CGTTGATTAGGCTCCAACCAT 3'	
<i>KLF4</i>	1508	5' CTGCGGCAAAACCTACACAA 3'	142
	1689	5' GGTCGCCATTTTTGGCACTG 3'	
<i>ERAS</i>	969	5' AATGTAGACCTTTCCCCAGGC 3'	182
	1103	5' AAAGCCCCTCACCAAGTGAA 3'	
<i>SOX15</i>	315	5' GAACAGGTTGGAAGCAAAGGC 3'	135
	441	5' GCGTCGATCCTGAAAATGGA 3'	
<i>DPPA2</i>	798	5' AGCCATGTTGGCATCATGG 3'	110
	9025	5' GAGGCTTGCAGCAAAAAGGC 3'	
<i>SALL4</i>	2394	5' GCCCAGATATCCTGGAAACCA 3'	127
	2509	5' TTCTCGGAGCTCTCTGCTTTG 3'	
<i>TCL1</i>	667	5' CTCGGCTTTTTCTCAGCTGGAT 3'	108
	793	5' GGTGAATCGGCTGTGTTCTCA 3'	
<i>ZFP42</i>	953	5' ATGACAGTCTGAGCGCAATCG 3'	115
	1085	5' AACGCTTTCCCACATTCCG 3'	
<i>UTF1</i>	876	5' CGACATCGCGAACATCCTG 3'	127
	992	5' AGAATGAAGCCCACGGCCA 3'	
<i>BMI1</i>	437	5' AATGTCTTTTCCGCCCCTG 3'	133
	575	5' ACCCTCCACAAAGCACACACAT 3'	

Tablo 3.6. Çalışmada Kullanılan DNA Tamir Genleri

DNA Tamir Genleri	Primer Pozisyonu	Primer Dizisi	PCR Ürünü Uzunluğu (bp)
<i>BRCA2</i>	3732	5' AATGCCCCATCGATTGGTC 3'	153
	3884	5' AAAGCCCCTAAACCCCACTTC3'	
<i>MRE11A</i>	675	5' GGCAATCATGACGATCCCA 3'	101
	775	5' TCCACAGACATTGAACGTCCA 3'	
<i>XRCC4</i>	781	5' TTCTGAAATGACTGCTGACCGA 3'	101
	881	5' TTACAGCAGCTGAAGCCAACC 3'	
<i>MLH1</i>	1517	5' CCCGAAAGGAAATGACTGCA 3'	118
	1634	5' AACATCTCCCGGAGAACCCTCA 3'	
<i>TREX1</i>	1195	5' ACACAATGGTGACCGCTACGA 3'	111
	1305	5' TTCAGCGCAGTGATGCTATCC 3'	
<i>MSH2</i>	2058	5' TTCCACATCATTACTGGCCCC 3'	103
	2160	5' CACATGGCACAACACCCA 3'	
<i>MSH5</i>	2353	5' GCCACCAACTTTCTGAGCCTT 3'	102
	2454	5' GACAAGATCGTTGCCATCCTC 3'	
<i>PRKDC</i>	3141	5' TTGTGGTTCGGTGTATTCGAGAA 3'	102
	3242	5' CGCTTGAAAAGCGATTTGGT 3'	
<i>POLD3</i>	178	5' CAGTGTCTGTACGGAACCAA 3'	128
	305	5' CTCGCTTCCCCCTTTTTTTT 3'	
<i>MUTYH</i>	1601	5' TGACGCAGGAGGAATTCACA 3'	101
	1701	5' TTTGGAACCCATACAGGTCCC 3'	
<i>MPG</i>	341	5' CAGCATCTATTTCTCAAGCCCA 3'	139
	479	5' TGCGAGTTCTGTGCCATTAGG 3'	
<i>NTHL1</i>	331	5' CAAAAAGGATGCACCTGTGGA 3'	113
	443	5' TTTGGCTGGAGAGCATCAGTG 3'	
<i>FEN1</i>	464	5' TGGCCATTGATGCCTCTATGA 3'	127
	590	5' CGAATGGTGCGGTAGAACATG3'	
<i>OGG1</i>	2074	5' CATATGTGGCACATTGCCCA 3'	107
	2180	5' CTCCGGAAAAAGTTTCCCAGTT 3'	
<i>MBD4</i>	384	5' GCTTCTGCTCAGTTTGGTGCT 3'	104
	487	5' CCTGCTGTCTTCCCAAATAACC 3'	
<i>XPA</i>	738	5' GAATTGCGGCGAGCAGTAA 3'	136
	873	5' ATGTCAGTTCATGGCCACACA 3'	
<i>RAD23A</i>	146	5' CAGACCTTCAAGATCCGCATG 3'	110
	255	5' ATGAGTTTCTGTCCAGCCACG 3'	
<i>ERCC3</i>	1222	5' CCCAGTTCAAGATGTGGTCCA 3'	103
	1324	5' TAGGTGCTAATGGCAACGGAG 3'	
<i>SLK</i>	2607	5' AAATTTCCGGCGCTTTGAC 3'	107
	2713	5' TTCCAGGCGTTCGATAGTCTG 3'	

3.3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Prism, San Diego, CA) yazılımı kullanıldı. Grupların karşılaştırılması amacı ile two way Anova testi kullanıldı. Senesens testi sonuçları için t-Test (Microsoft Excel) kullanıldı ve $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edildi. ($0.01 \leq p < 0.05$: 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. Mezenkimal Kök Hücrelerin Senesens Testi Bulguları

Metformin uygulaması ile eş zamanlı olarak replikatif senesens sürecine sokulan MKH'ler senesense bağlı beta-galaktozidaz aktivitesinin belirlenmesi amacı ile boyanmıştır. Metformin uygulamasının kontrol grubu hücrelere kıyasla özellikle 21. ve 28. günlerde senesent hücre yüzdesini düşürdüğü gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Verilerin istatistiksel analizi sonucunda 14. ve 21. gün 1.5 mM doz grupları istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. t-Testi sonuçları Tablo 4.2'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. Hücrelerin Senesens Testi Sonuçları

Günler	Kontrol	1.5 mM	3 mM	6 mM	9 mM
14. Gün	% 8	% 4	% 3*	% 4*	% 4*
21. Gün	% 10	% 8	% 6*	% 7*	% 6*
28. Gün	% 35	% 23**	% 20**	% 16***	% 14***

Tablo 4.2. Senesens Testi Verilerinin t-Testi Sonuçları

Günler	1.5 mM	3 mM	6 mM	9 mM
14. Gün	0.143932	0.015347	0.018081	0.035242
21. Gün	0.143932	0.018139	0.070033	0.018139
28. Gün	0.00158	0.001585	0.0004	0.000272

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.

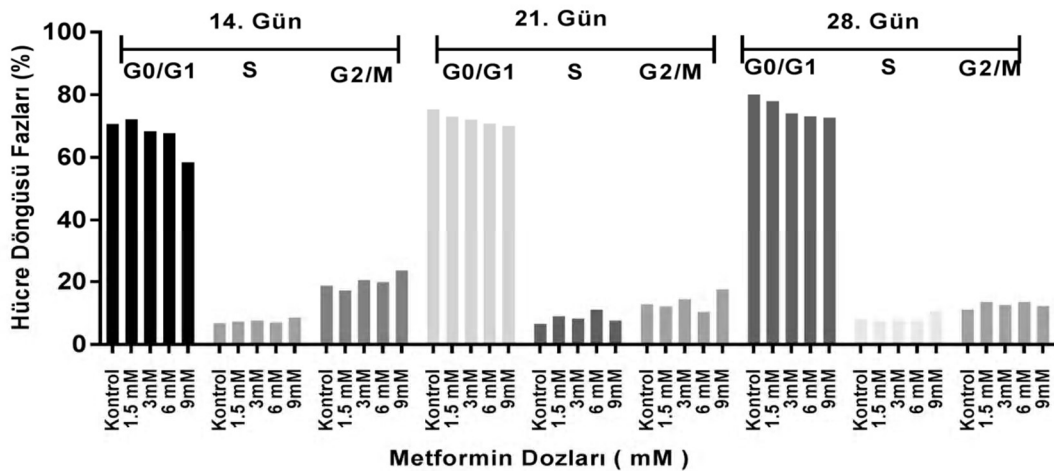
4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Hücre Döngüsü Testi Bulguları

Replikatif sensens sürecine sokulan MKH'lerin hücre döngüsü üzerine metformin etkisinin analizi için Muse™ Cell Cycle Kiti ile hücre döngüsü testi gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen veriler incelendiğinde 14. günde kontrol gruplarına kıyasla G0/G1 fazındaki hücrelerin tüm metformin doz gruplarında azaldığı gözlenmiştir. 14. günde 9mM doz grubunda G0/G1 fazındaki hücrelerin oranında ortalama %10 azalma gözlenmiştir. 14. Günde S ve G2/M fazlarındaki hücrelerin kontrol grubuna kıyasla arttığı gözlenmiştir. 21. ve 28. günlerde de benzer tablo oluşmuştur. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3 ve Şekil 4.1'de sunulmaktadır. Verilerin t-Test sonuçları Tablo 4.4'de sunulmaktadır.

Tablo 4.3. Hücre Döngüsü Testi Sonuçları

Hücre Döngüsü Fazı (%)	14. Gün			21. Gün			28. Gün		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
Kontrol	70.7	6.75	18.75	75.4	6.6	12.75	80.15	8.1	11.1
1.5 mM	72.18	7.35	17.3*	73**	9.05*	12.15	78.05*	7.25	13.55*
3 mM	68.35**	7.6	20.55	72.05**	8.25*	14.45*	74.15***	7.55	12.65***
6mM	67.7**	7	19.98*	70.8***	11.1**	10.4**	73.1***	7.5	13.65***
9 mM	58.45**	8.65**	23.65**	70.1***	7.6	17.6**	72.7***	10.6*	12.3***



Şekil 4.1. Metformin Uygulanmış MKH'lerin 14., 21. ve 28.Güne Ait Hücre Döngüsü Fazlarının Yüzde Dağılımı.

Tablo 4.4. Hücre Döngüsü Testi Verilerinin t-Test Sonuçları

Metformin	14. Gün			21. Gün			28. Gün		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
1.5 mM	0.182338087	0.104585	0.035784	0.006041	0.037786	0.232873	0.02497	0.163829	0.038666
3mM	0.006643196	0.257997	0.145808	0.001963	0.094919	0.042303	0.000645	0.217884	7.91E-05
6 mM	0.003266688	0.269572	0.021537	0.000101	0.006754	0.006643	0.000834	0.143897	1.78E-05
9mM	0.004148812	0.0049	0.003884	0.000533	0.230487	0.001613	0.000784	0.012823	6.24E-05

0.01 ≤ p < 0.05: İstatistiksel anlamlılık(*). 0.001 ≤ p < 0.01: Yüksek düzey istatistiksel anlamlılık(**). p < 0.001: Çok yüksek düzey istatistiksel anlamlılık(***). p > 0.10: İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.

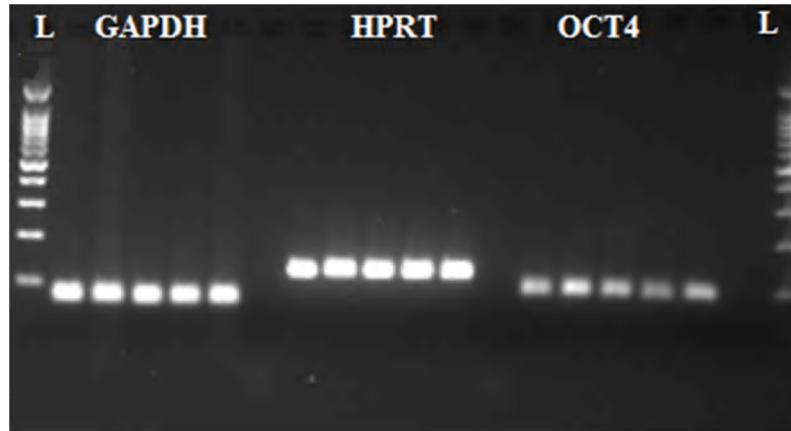
4.3. RNA İzolasyonu Bulguları

Trizol ile toplanan örneklerden izole edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları Nanodrop 2000 cihazı (Thermo Scientific, ABD) ile ölçülmüştür. İzole edilen RNA'ların saflıkları çalışma için uygun bulunmuştur. Tüm RNA örneklerinin konsantrasyonları 300 ng/ µL'ye ayarlanarak RT-qPCR çalışmalarında kullanılmıştır. Nanodrop ölçümü sonucu elde edilen veriler Tablo 4.5'da sunulmuştur.

Tablo 4.5. RNA İzolasyonu Nanodrop Sonuçları

Günler	Örnekler	RNA Konsantrasyonu (ng)	Abs 260/280	Abs 260/230
14.Gün	Kontrol	366	2.07	1.8
	1.5 mM	437	2.08	1.79
	3 mM	630	2.05	1.83
	6 mM	428	2.06	1.8
	9 mM	463.9	2.04	1.81
21.Gün	Kontrol	228.6	1.97	1.71
	1.5 mM	200.3	1.98	1.69
	3 mM	130	2	1.58
	6 mM	200	2	1.61
	9 mM	202	2	1.69
28.Gün	Kontrol	441	2.02	1.71
	1.5 mM	769	1.96	1.89
	3 mM	488	2	1.7
	6 mM	715	1.97	1.85
	9 mM	677	1.99	1.8

4.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin RT-qPCR Çalışmaları Bulguları



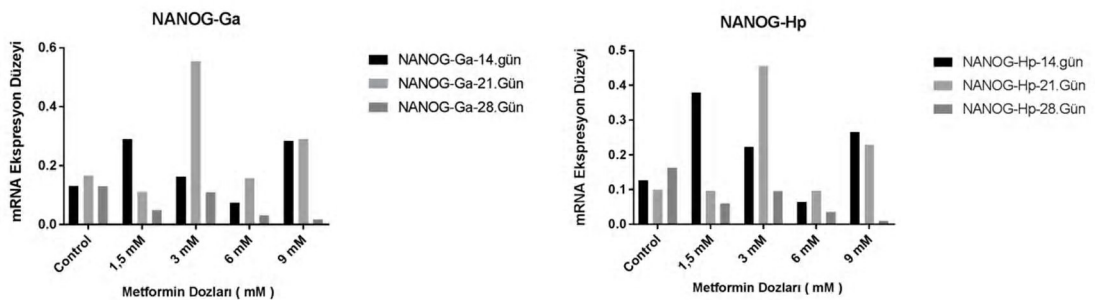
L:GeneRuler 100 bp DNA Ladder. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (*GAPDH*;82 bp) Referans Geni, Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase (*HPRT*;132 bp) Referans Geni, Octamer-binding transcription factor 4 (*OCT4*,103 bp) Geni.

Şekil 4.2. Referans ve Hedef Genlerin RT-PCR Sonrası Agaroz Jel Görüntüsü.

RT- qPCR analizi sonrası elde edilen ürünler %2'lik agaroz jelde yürütülerek tüm hedef genlerin doğru bölgesinin çoğaltıldığı kontrol edilmiştir. Şekil 4.2'de referans genler *GAPDH* ve *HPRT* ile hedef genlerden biri *OCT4* genine ait PCR ürününün agaroz jel görüntüsü sunulmuştur.

4.4.1. Stemness Genlerinin RT-qPCR Analizlerinden Elde Edilen Bulgular

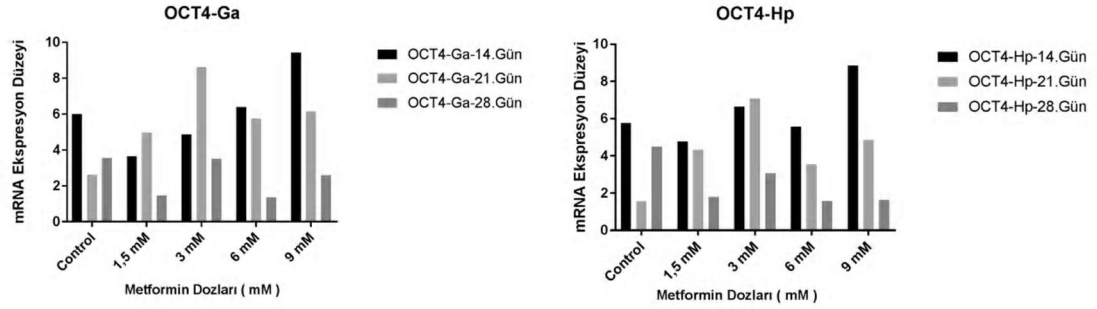
Stemness genlerinin ekspresyon seviyesi üzerine metformin uygulamasının 14., 21. ve 28. günlerde etkisini incelemek amacı ile RT-qPCR çalışması yapılmıştır.



Şekil 4.3. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *NANOG* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri (Ga: *GAPDH*, Hp: *HPRT*)

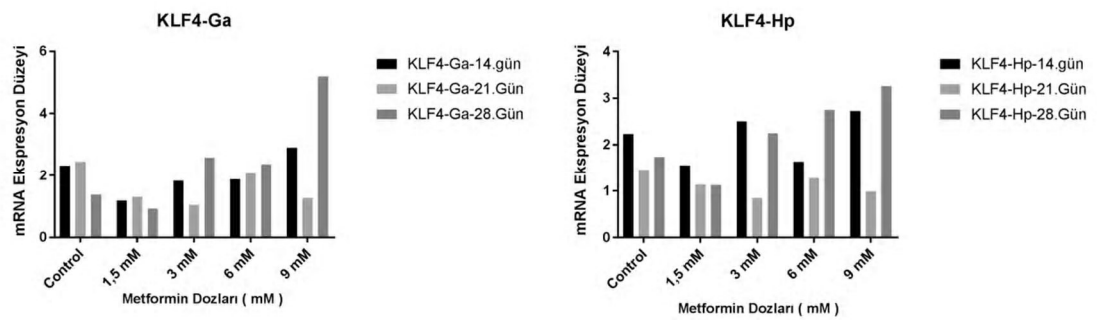
Kontrol grupları kıyaslandığında *NANOG* gen ekspresyon seviyesinin uzayan kültür süresi ile azaldığı gözlenmiştir. 21. günde 3 mM metformin dozu uygulanan hücrelerin

NANOG gen ekspresyon seviyesinin kontrol ve diğer deney gruplarına kıyasla arttığı gözlenmiştir. Ancak 28. günde *NANOG* gen ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna oranla tüm doz gruplarında düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.4. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *OCT4* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

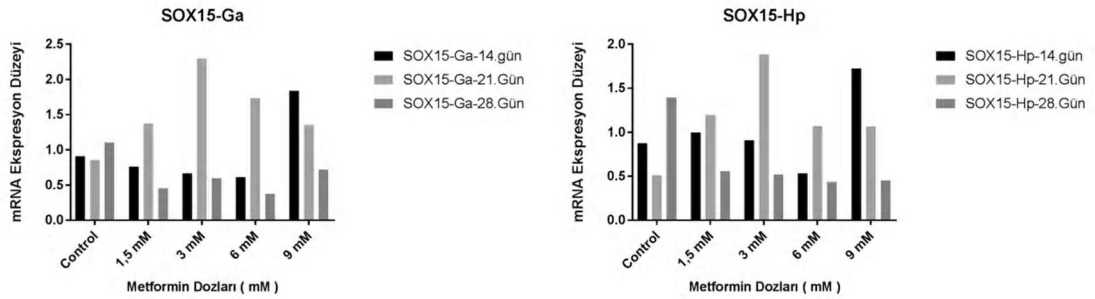
OCT4 geni analizleri sonucunda kontrol grupları kıyaslandığında *OCT4* gen ekspresyon seviyesinin uzayan kültür süresi ile azaldığı gözlenmiştir. *NANOG* gen ekspresyonuna benzer şekilde 21. Günde 3 mM dozda *OCT4* gen ekspresyon seviyesinde artış gözlenirken 28. günde kontrol grubuna kıyasla tüm doz gruplarında ekspresyon seviyesinde azalma gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.5. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *KLF4* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

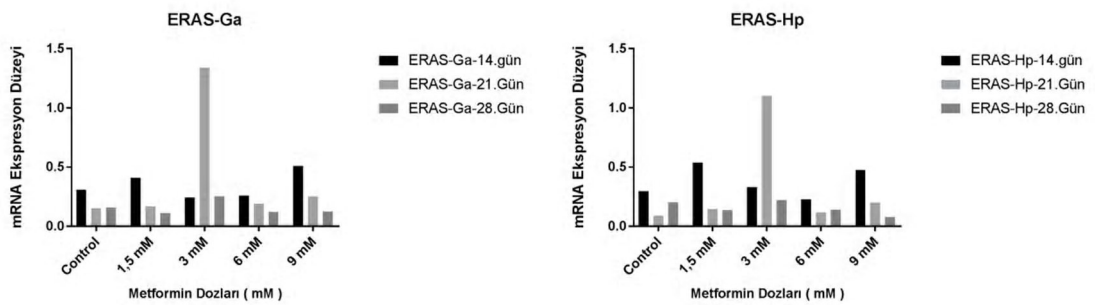
KLF4 geni analizleri sonucunda kontrol grupları kıyaslandığında *KLF4* gen ekspresyon seviyesinin uzayan kültür süresi ile azaldığı gözlenmiştir. 21. günde tüm doz

gruplarında düşüş gözlenirken, 28. günde kontrol grubuna kıyasla 3mM, 6 mM ve 9 mM dozda *KLF4* gen ekspresyon seviyesinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.5).



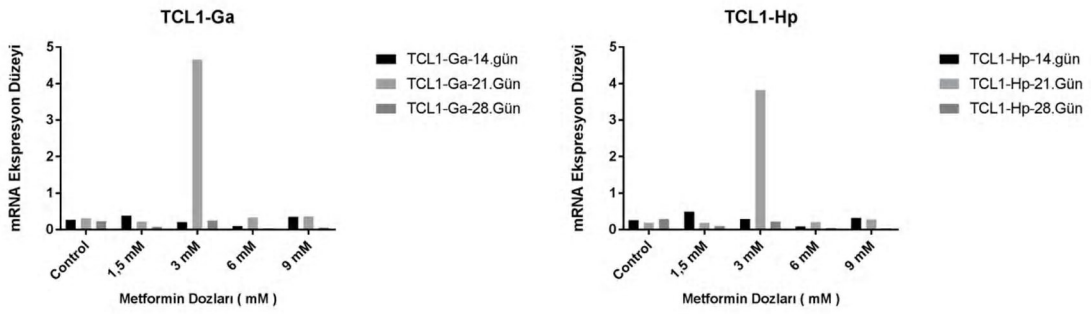
Şekil 4.6. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *SOX15* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

SOX15 geninin ekspresyon seviyelerinin analizleri sonucunda 14.günde 9 mM doz grubunda kontrol ve diğer doz gruplarına kıyasla gen ekspresyon seviyesinde artış olduğu gözlenmiştir. 21. günde tüm doz gruplarında kontrol grubuna kıyasla gen ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir. 21. günde 3 mM doz grubunda bütün gruplara göre maksimum gen ekspresyon seviyesi gözlenmiştir. Ancak 28. günde kontrol grubuna kıyasla tüm doz gruplarında gen ekspresyon seviyesinin düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.6).



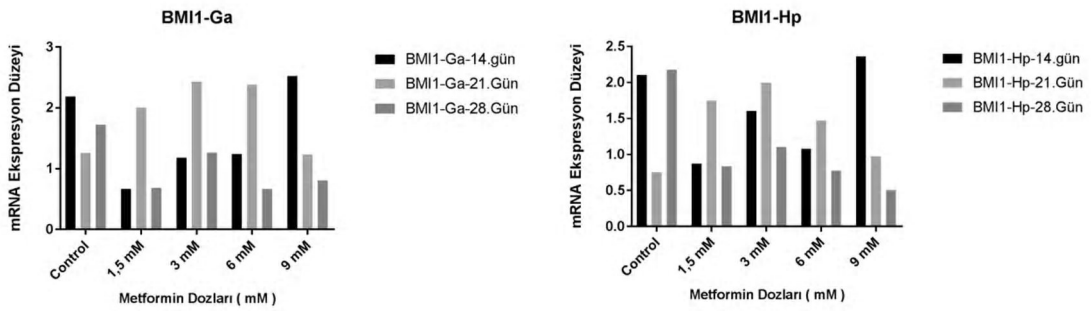
Şekil 4.7. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *Eras* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

Eras gen ekspresyon seviyesi, kontrol gruplarında ve 1.5 mM, 3mM ve 9 mM doz gruplarında uzayan kültür süreleri ile azalırken, 21. günde 3 mM doz grubunda artış gözlenmiştir (Şekil 4.7).



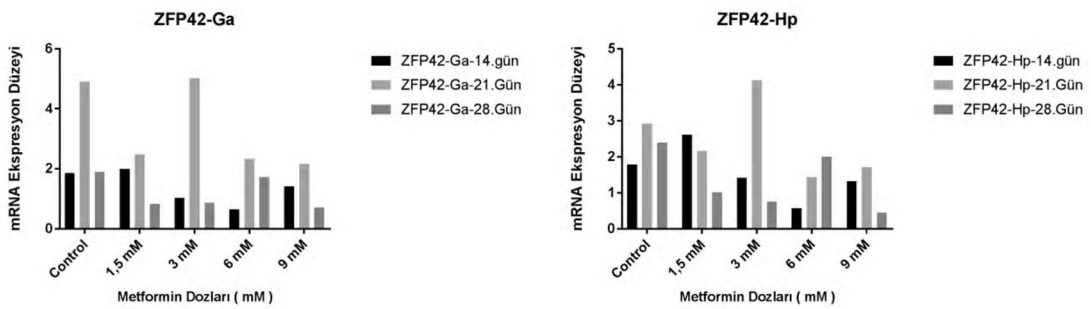
Şekil 4.8. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *TCL1* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri

TCL1 gen ekspresyon seviyesinin kontrol grubu ve tüm doz gruplarında düştüğü gözlenmiştir. 21. gün 3 mM dozda ekspresyon seviyesinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.8).



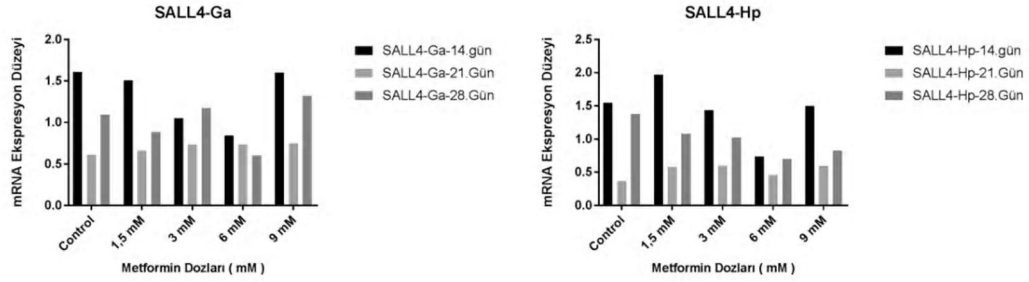
Şekil 4.9. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *BMI1* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

BMI1 gen ekspresyon seviyesi 21. günde kontrol grubuna kıyasla tüm doz gruplarında artış gösterirken, 28. günde ise kontrol grubuna kıyasla tüm doz gruplarında ekspresyon seviyesinin düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.10. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *ZFP42* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

ZFP42 geninin ekspresyon seviyesi 14. ve 28. günlerde kontrol grubuna kıyasla azalırken, 21. günde 3 mM doz grubu hariç tüm doz gruplarında seviyenin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.10).



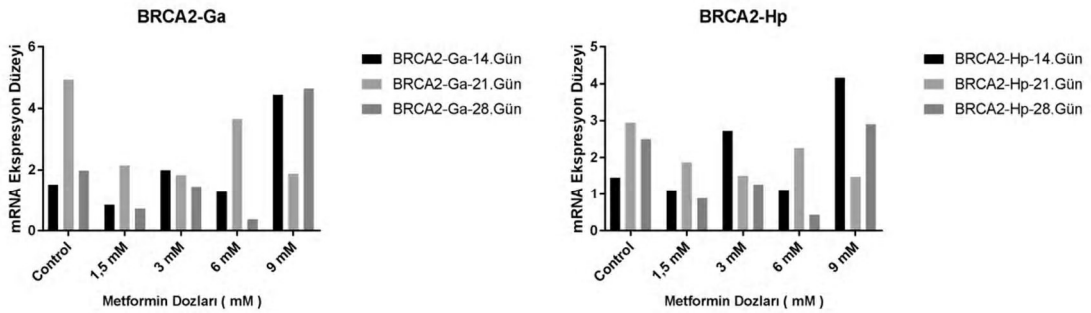
Şekil 4.11. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *SALL4* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

SALL4 geni analizleri sonucunda kontrol grupları kıyaslandığında *SALL4* gen ekspresyon seviyesinin uzayan kültür süresi ile azaldığı gözlenmiştir. Metformin uygulanan doz gruplarında da kontrol gruplarına kıyasla *SALL4* geni ekspresyon seviyesinin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.11).

4.4.2. DNA Tamir Genlerinin RT-qPCR Analizlerinden Elde Edilen Bulgular

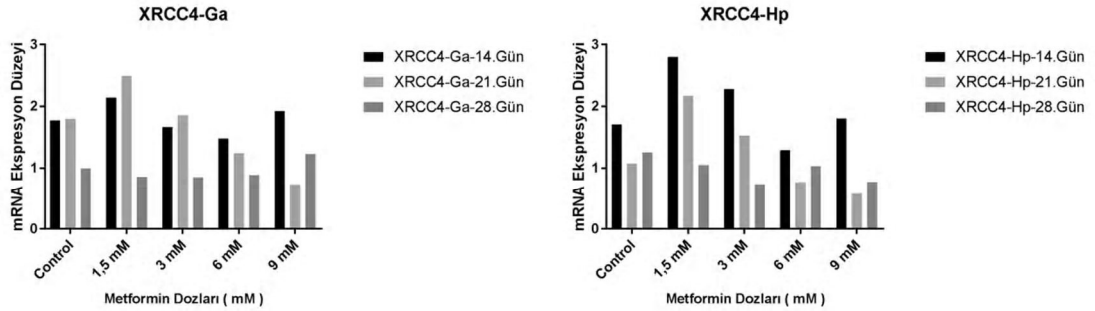
DNA tamir yolları ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi üzerine metformin uygulamasının 14., 21. ve 28. günlerde etkisini incelemek amacı ile RT-qPCR çalışması yapılmıştır.

4.4.2.1. Çift Zincir Kırıkları ile İlişkili Genler



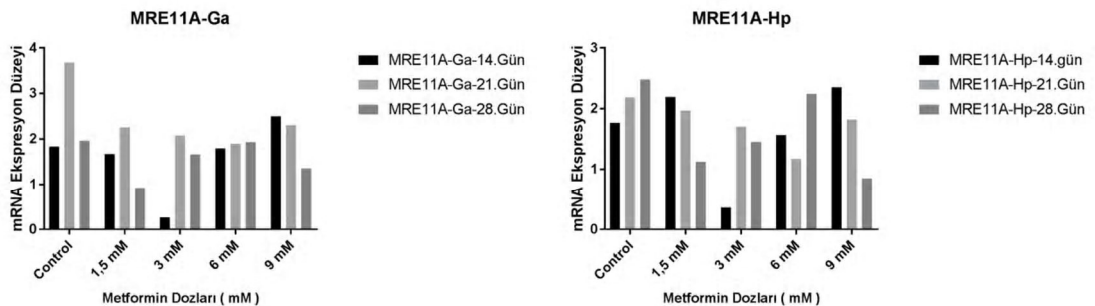
Şekil 4.12. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *BRCA2* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

BRCA2 geninin ekspresyon seviyesi kontrol grupları arasında kıyaslandığında 21. ve 28. günlerde 14. güne oranla artış olduğu gözlenmiştir. 14. günde kontrol grubuna kıyasla 3 mM ve 9mM metformin doz grubunda 2 kat artış gözlenirken 21.günde tüm doz gruplarında azalma gözlenmiştir. 28. günde ise 9mM doz grubunda kontrol grubuna kıyasla ekspresyon seviyesinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.13. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *XRCC4* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

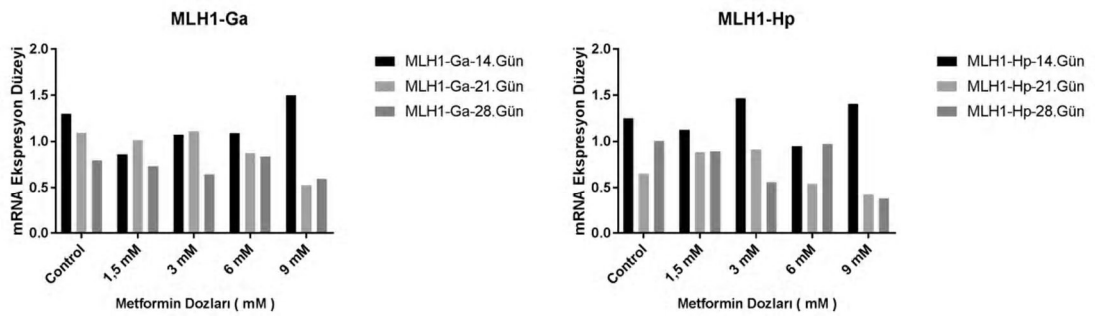
XRCC4 geninin ekspresyon seviyesi kontrol gruplarında kıyaslandığında uzayan kültür süresi ile ifadenin azaldığı gözlenmiştir. 1.5 mM ve 3mM metformin doz gruplarında *XRCC4* geninin ekspresyon seviyesinde 14. ve 21. günde artış gözlenirken, 28. günde kontrol grubuna kıyasla tüm doz gruplarında gen ekspresyon seviyesinin düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.14. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *MRE11A* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

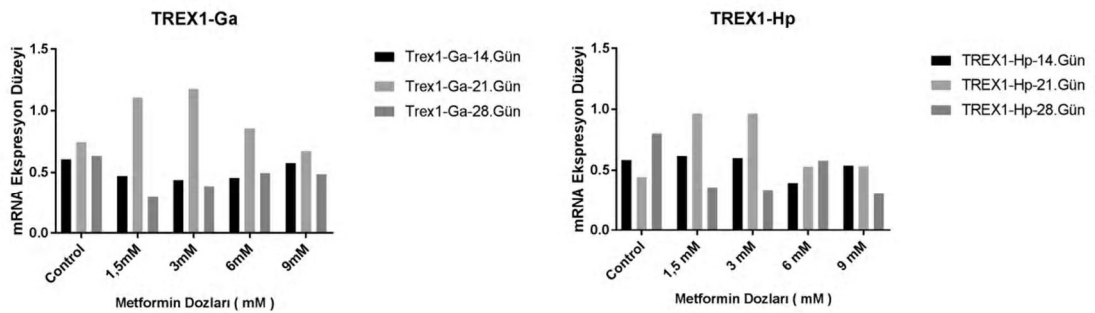
MRE11A geninin ekspresyon seviyesi kontrol grupları arasında kıyaslandığında uzayan kültür süresi ile ekspresyon seviyesinin arttığı gözlenmiştir. Metformin uygulamasının 21. ve 28. günlerinde ise tüm doz gruplarında kontrol gruplarına oranla genin ekspresyon seviyesinde azalma olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14).

4.4.2.2. Yanlış Eşleşme Onarımı ile İlişkili Genler



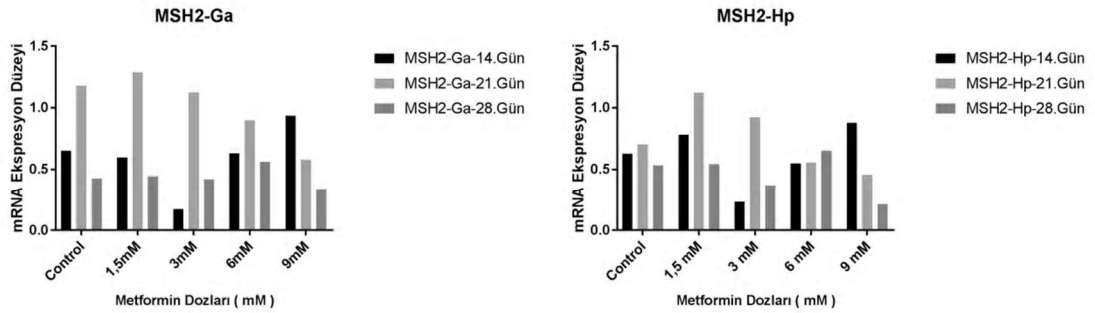
Şekil 4.15. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *MLH1* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

MLH1 geninin ekspresyon seviyesi kontrol gruplarında kıyaslandığında uzayan kültür süresi ile ifadenin azaldığı gözlenmiştir. Metformin uygulanan tüm doz gruplarında kontrol gruplarına oranla genin ekspresyon seviyesinde azalma olduğu gözlenmiştir. Sadece 14. günde 9 mM dozda metformin uygulanan grupta gen ekspresyon seviyesinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.15).



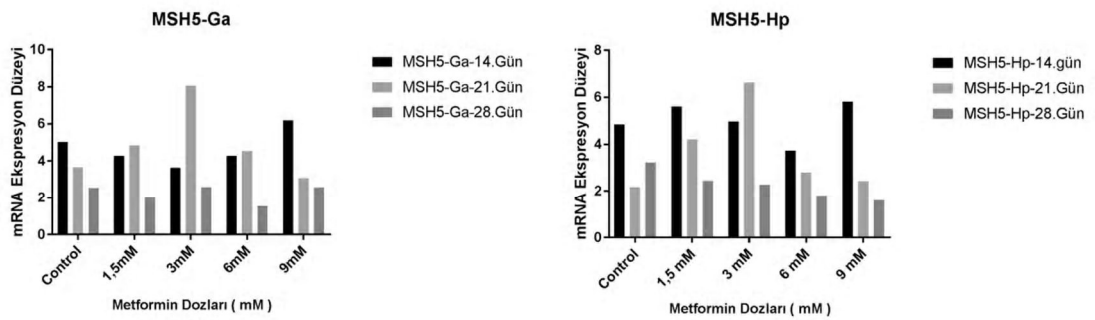
Şekil 4.16. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *TREX1* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

TREX1 geninin ekspresyon seviyesinin 14. günde kontrol ve metformin doz gruplarına oranla 21. günde arttığı gözlenmiştir. Ancak 28. günde tüm gruplarda tekrar düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.16).



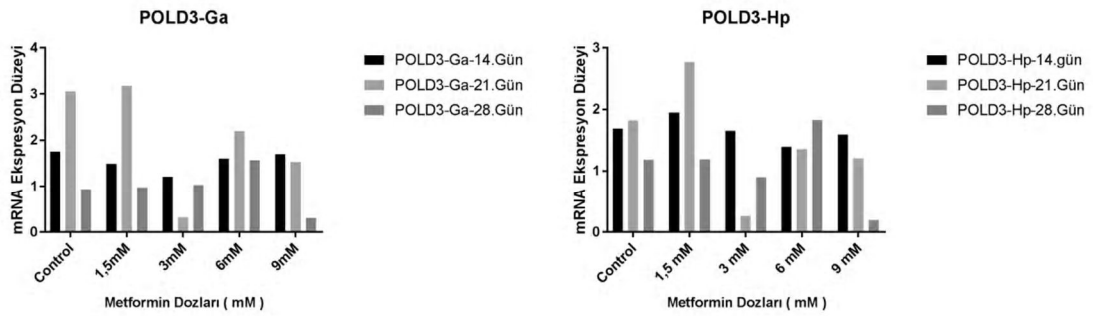
Şekil 4.17. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *MSH2* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

MSH2 gen ekspresyon seviyesinin 14. gün kontrol ve metformin doz gruplarına oranla 21. günde arttığı gözlenmiştir. Ancak 28.günde tüm gruplarda tekrar düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.18. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *MSH5* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

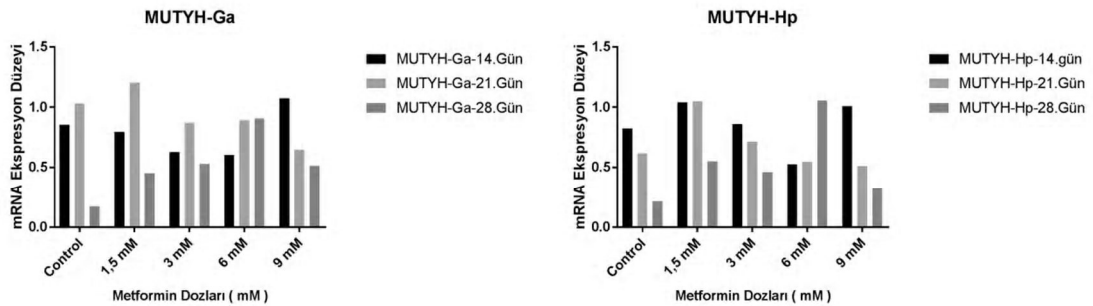
MSH5 geninin ekspresyon seviyesi kontrol gruplarında kıyaslandığında uzayan kültür süresi ile ifadenin azaldığı gözlenmiştir. 21.günde 3mM doz grubunda kontrol ve diğer gruplara oranla gen ekspresyon seviyesinde artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.19. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *POLD3* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

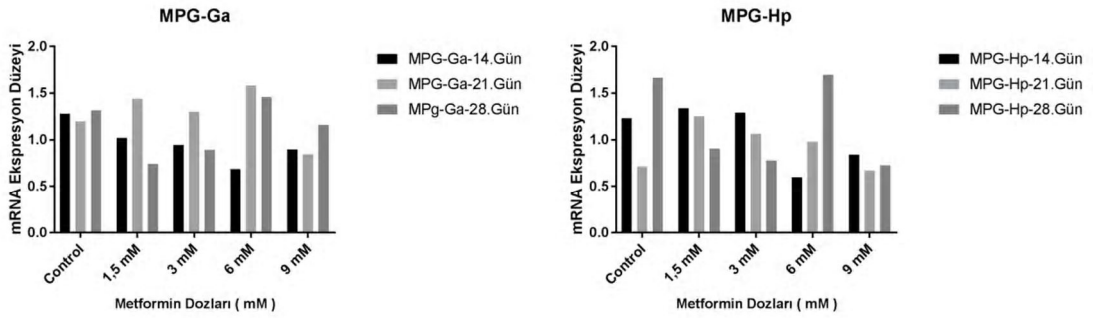
POLD3 gen ekspresyon seviyesi uzayan kültür süresi ile kontrol ve metformin doz gruplarında azalmıştır. 21. günde kontrol ve 3 mM doz grubu hariç diğer doz gruplarında artış gözlenmiştir (Şekil 4.19).

4.4.2.3. Baz Eksizyon Onarımı ile İlişkili Genler



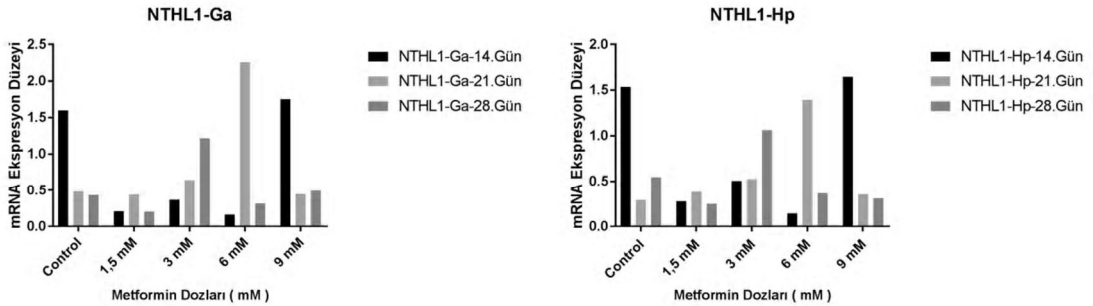
Şekil 4.20. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *MUTYH* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

MUTYH geninin ekspresyon seviyesi kontrol gruplarında kıyaslandığında uzayan kültür süresi ile ifadenin azaldığı gözlenmiştir. 21. günde kontrole kıyasla doz gruplarında ekspresyon seviyesinde düşüş olduğu ancak 28. günde kontrole göre tüm doz gruplarında gen ekspresyon seviyesinin arttığı gözlenmiştir. (Şekil 4.20)



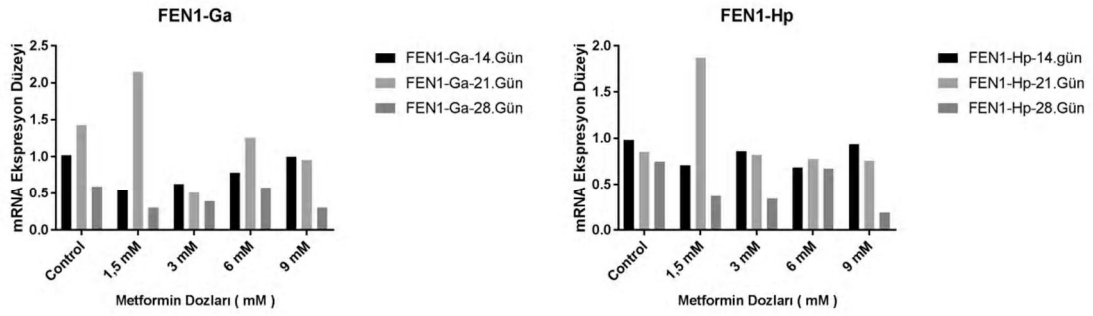
Şekil 4.21. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *MPG* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

MPG gen ekspresyon seviyesinin kontrol grupları arasında 14. güne kıyasla 21. günde düştüğü ancak 28. günde genin ekspresyon seviyesinin tekrar arttığı gözlenmiştir. 1.5 mM, 3 mM ve 9 mM metformin doz gruplarında uzayan kültür süresi ile gen ekspresyon seviyesinin düştüğü gözlenirken, 6 mM doz grubunda artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.21).



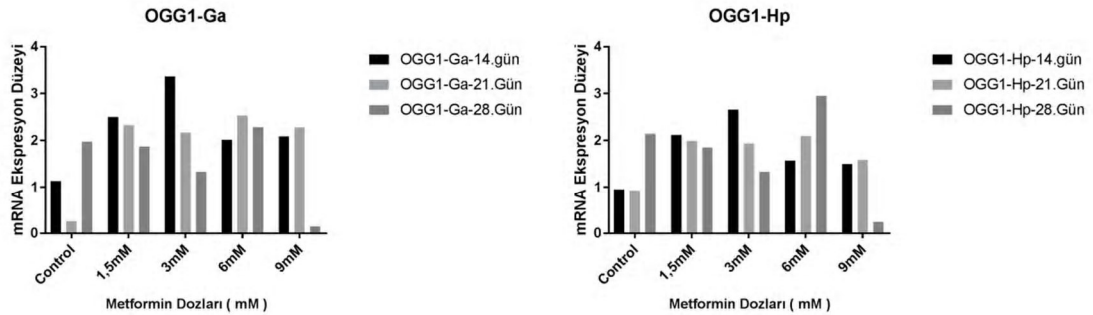
Şekil 4.22. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *NTHL1* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

NTHL1 geninin ekspresyon seviyesi kontrol grupları arasında kıyaslandığında uzayan kültür süresi ile gen ekspresyon seviyesinin azaldığı gözlenmiştir. 21. günde 6 mM doz grubunda gen ekspresyon seviyesinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.22).



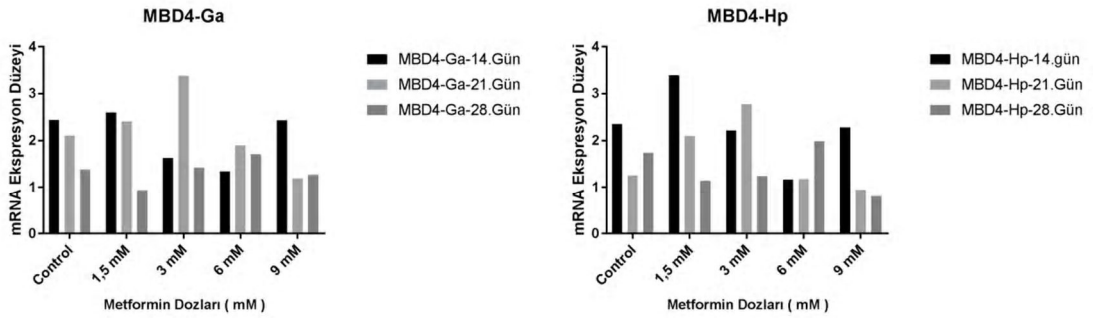
Şekil 4.23. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *FEN1* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

FEN1 geni ekspresyon seviyesi 14. ve 28. günlerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm metformin doz gruplarında azalırken, 21. günde de 1.5 mM hariç tüm doz gruplarında kontrol grubuna kıyasla azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.24. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *OGG1* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

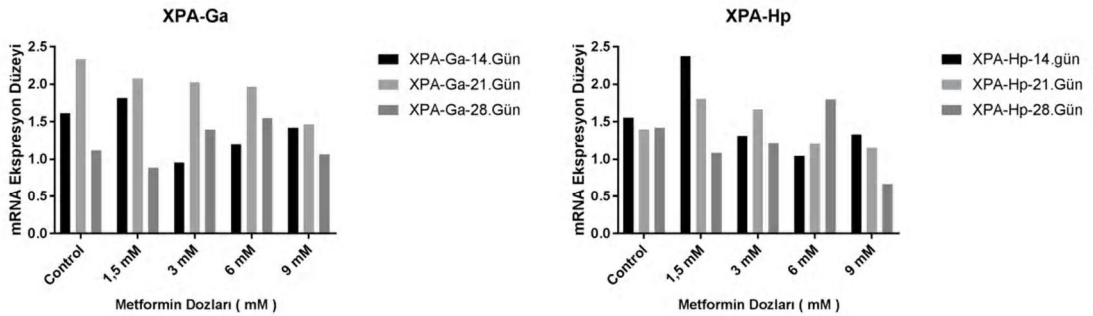
OGG1 geni ekspresyon seviyesinde kontrol grupları kıyaslandığında 28. günde gen ekspresyon seviyesinde 14. ve 21. günlere göre artış olduğu gözlenmiştir. 1.5 mM, 3 mM ve 9 mM metformin doz gruplarında uzayan kültür süresi ile gen ekspresyon seviyesi düşerken, 6 mM doz grubunda gen ekspresyon seviyesinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.25. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *MBD4* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

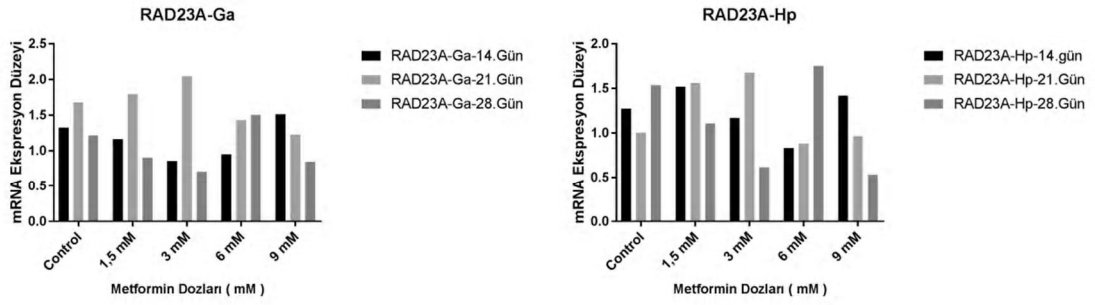
MBD4 geninin ekspresyon seviyesi kontrol grupları arasında kıyaslandığında uzayan kültür süresi ile ifadenin azaldığı gözlenmiştir. 1.5 mM ve 9 mM metformin doz gruplarında da uzayan kültür süresi ile ifadenin azaldığı gözlenmiştir. 21. günde 3 mM doz grubunda ifadenin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.25).

4.4.2.4. Nükleotid Eksizyon Onarımı ile İlişkili Genler



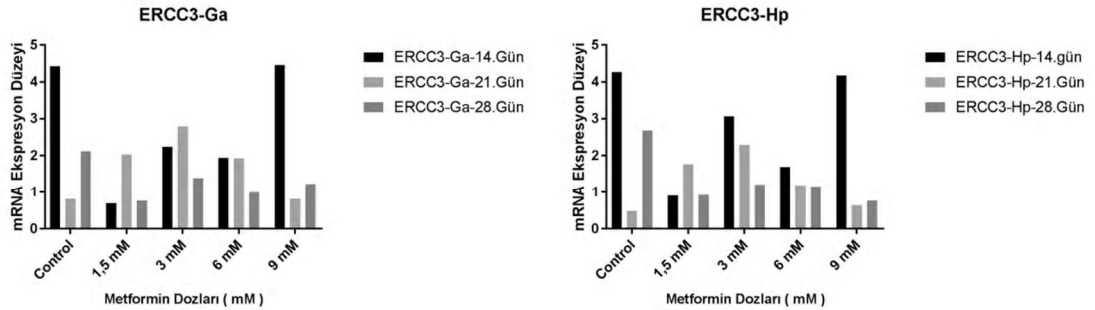
Şekil 4.26. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *XPA* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

XPA geninin ekspresyon seviyesinde kontrol grubunda 21. ve 28. günlerde 14. güne kıyasla gen ekspresyon seviyesinde azalma olduğu gözlenmiştir. 1.5 mM ve 9 mM metformin doz gruplarında uzayan kültür süresi ile genin ekspresyon seviyesinde düşüş olurken, 6 mM doz grubunda artış gözlenmiştir (Şekil 4.26).



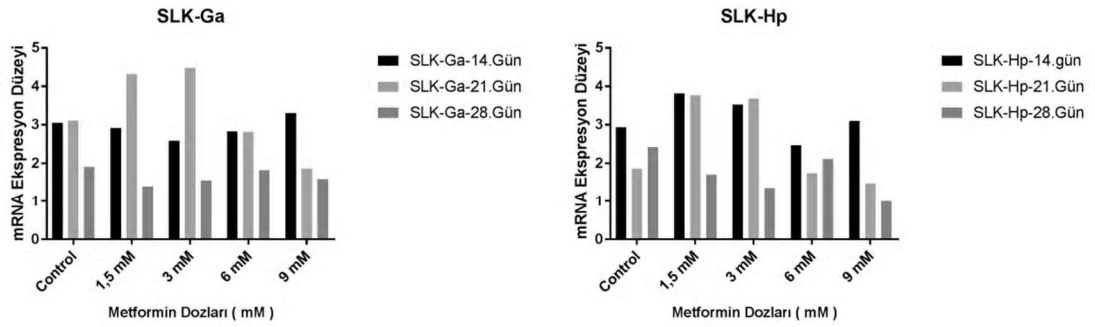
Şekil 4.27. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *RAD23A* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

RAD23A gen ekspresyon seviyesinin 1.5 mM, 6 mM ve 9 mM metformin doz gruplarında uzayan kültür süresi ile azaldığı gözlenmiştir. 3 mM doz grubunda 21. günde 14. güne kıyasla artan gen ekspresyon seviyesi 28. günde tekrar düşüş göstermiştir (Şekil 4.27).



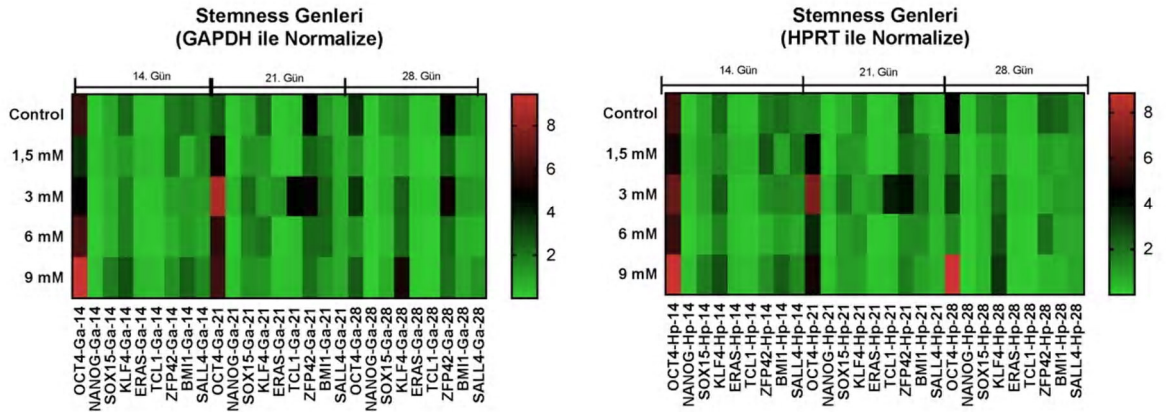
Şekil 4.28. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *ERCC3* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

ERCC3 geninin ekspresyon seviyesi kontrol grupları arasında kıyaslandığında uzayan kültür süresi ile ifadenin azaldığı gözlenmiştir. 3 mM, 6 mM ve 9 mM metformin doz gruplarında da benzer durum gözlenmiştir. 21. günde kontrol grubuna kıyasla 1.5 mM, 3 mM ve 6 mM doz gruplarında gen ekspresyon seviyesinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.28).

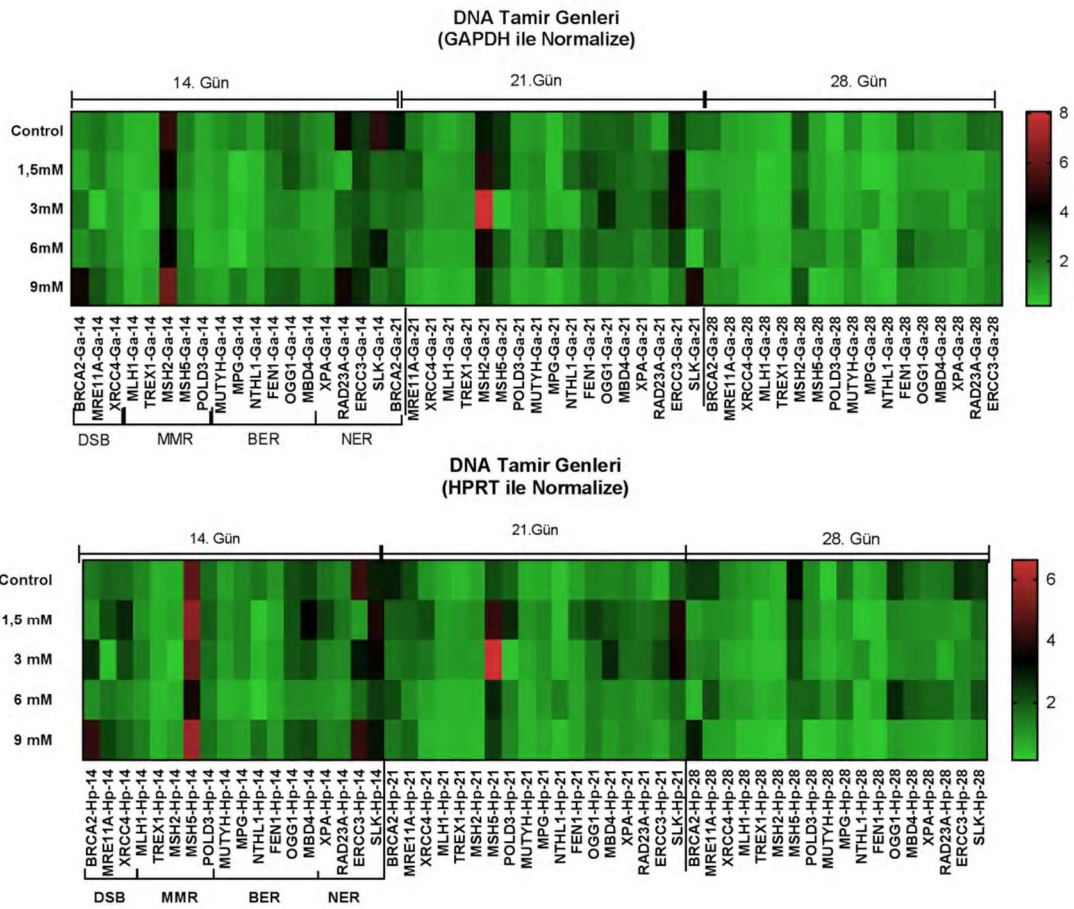


Şekil 4.29. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin *SLK* Geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.

SLK geninin ekspresyon seviyesi kontrol gruplarında kıyaslandığında uzayan kültür süresi ile ifadenin azaldığı gözlenmiştir. 6 mM ve 9 mM metformin doz gruplarında da benzer şekilde uzayan kültür süresi ile ekspresyon seviyesinde düşüş gözlenmiştir. 21. günde 1.5 mM ve 3 mM metformin doz gruplarında genin ekspresyon seviyesinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.30. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin Stemness Genlerine Ait RT-qPCR Bulgularının Isı Haritası İle Sunumu.



Şekil 4.31. Metformin Uygulanmış İnsan MKH'lerin DNA Tamir Genlerine Ait RT-qPCR Bulgularının Isı Haritası İle Sunumu.

Stemness genlerinin ifadeleri incelendiğinde tüm genlerde kontrol grupları kıyaslandığında uzayan kültür süresi ile gen ekspresyon seviyesinin azaldığı gözlenmiştir. İncelenen genlerin tümünde 21. günde 3 mM doz grubunun genlerin ekspresyon seviyesini arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.30). Yapılan istatistiksel analizler sonucunda dozlar arasında istatistiksel olarak farklılıkların bulunmadığı gözlenmiştir. Ancak elde edilen verilerin deney günleri arasında istatistiksel olarak analizi sonucunda anlamlı farklılıklar bulunmuştur. 14. güne göre 21. ve 28. günlerde elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

DNA tamir yolağı ile ilişkili genlerin ifadeleri incelendiğinde hemen her gende kontrol gruplarında gen ekspresyon seviyesinin uzayan kültür süresi ile düştüğü gözlenmiştir. Metformin uygulamasının bu genlerin ekspresyon seviyesinde upregülasyonlar (gen ekspresyon seviyesinde artma) ve down regülasyonlara (gen ekspresyon seviyesinde azalma) sebep olduğu gözlenmiştir. 6 mM ve 9 mM metformin uygulamasının DNA tamir yolağı ile ilişkili bazı genlerin ekspresyon seviyesinde artış sağladığı gözlenmiştir (Şekil 4.31). Yapılan istatistiksel analizler sonucunda dozlar arasında istatistiksel olarak farklılıkların bulunmadığı gözlenmiştir. Ancak elde edilen verilerin deney günleri arasında istatistiksel olarak analizi sonucunda anlamlı farklılıklar bulunmuştur. 14. güne göre 21. ve 28. günlerde elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Tartışma

MKH'in, kendini yenileme potansiyeli ve immün-modülatör etkisi sayesinde çoğu organ ve dokunun homeostatik dengesini korudukları bilinmektedir. Bu hücreler ilk olarak kemik iliğinde tanımlanmış, daha sonra da diğer yetişkin ve fetal dokulardan izole edilmiştir. Özellikle adipoz doku kökenli MKH'lerin kemik iliği ve diğer kaynaklara oranla daha kolay ve daha fazla sayıda elde edilebildiği bilinmektedir (8). Adipoz doku kökenli MKH'lerin bu avantajı sebebi ile bu tez çalışmasında adipoz doku kökenli MKH'ler kullanılmıştır. MKH'ler kendini yenileme potansiyeli, immün modülatör etkisi ve kolay elde edilebilmesi özellikleri sebebi ile klinik hücre terapisi için önemli tedavi edici potansiyele sahiptirler. Klinik hücre terapisinde, izolasyondan sonra ve kültür sırasında kök hücre verimi ve elde edilen hücre popülasyonunun saflığı istenen terapötik etkiyi elde etmek için çok önemlidir. MKH'lerin tedavi amaçlı kullanılabilmesi için *in vitro* olarak çoğaltılmaları zorunluluğu bulunmaktadır. Uzayan kültür süresi kök hücre veriminde düşüşe yol açabilmektedir. MKH'lerin *in vitro* kültür ortamlarında çoğaltılmasını kısıtlayan temel mekanizma senesens adı verilen hücre yaşlanma sürecidir (2).

Senesens; telomer fonksiyon kaybı, reaktif oksijen türleri, DNA hasarı ve belirli onkojenlerin aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin reaktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli stres faktörlerinin neden olduğu özel bir hücre bölünmesi durması formudur (17). Hücrelerin bölünme sayısındaki artışa bağlı olarak telomer kısalması sebebi ile ortaya çıkan senesens tipi replikatif senesens olarak bilinmektedir. Replikatif senesens mekanizmasının kalıcı şekilde hücre bölünmesininin durmasına yol açması, hücrelerin bölünme kapasitelerini ve stemnes özelliklerini kısıtlamaktadır. Ayrıca senesens mekanizması aktive olmuş hücrelerin DNA tamir mekanizmalarında önemli değişiklikler meydana gelmektedir (2,49).

Bu tez çalışmasında 28 gün kültür edilerek replikatif senesens sürecine sokulan MKH'lere eş zamanlı olarak metformin uygulaması yapılmıştır. Senesensin temel belirteci olan senesens ilişkili β -galaktozidaz olarak bilinen histokimyasal yöntemin senesent hücrelerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılması sebebi ile bu çalışmada da bu yöntemden faydalanılmıştır. Metformin uygulamasının 14., 21. ve 28. günlerinde MKH'lere β -galaktozidaz boyama yapılmıştır. 14. gün kontrol grubunda %8 olan senesent hücre oranı paralel metformin doz gruplarında %4 olarak bulunmuştur. 21. gün kontrol grubunda %10 olan senesent hücre oranı gözlenmişken paralel doz gruplarında %6-8 civarında kalmıştır. 28. gün kontrol grubunda %35 olan senesent hücre oranı paralel metformin doz gruplarında %14-23 aralığında bulunmuştur. 14. gün ve 21.gün 1.5 mM doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması erken kültür süresi ve uygulanan doz oranının düşük olmasına bağlanmıştır. Diğer doz gruplarında özellikle 6 mM ve 9 mM'da uzayan kültür süresine rağmen metformin uygulamasının replikatif senesensi geciktirebileceği sonucuna varılmıştır. Chen ve arkadaşlarının nükleus pulposus hücreleri ile yaptıkları çalışmada metformin uygulamasının bu hücrelerde apoptoz ve senensi azalttığı ifade edilmektedir (50). Bu tez çalışmasında elde edilen senesens testi verileri Chen ve arkadaşlarının çalışması ile uyumluluk göstermektedir.

Senesent hücrenin diğer bir belirteci de hücre döngüsünün durmasıdır. Bu sebeple hücrenin DNA içeriği tipik olarak G1 fazındaki bir hücrenin DNA içeriği gibi kalır (18). Metformin uygulamasının senesent hücrelerde gözlenen hücre döngüsünün durdurulması üzerine etkisini incelemek amacı ile MKH'lere hücre döngüsü testi yapılmıştır. Kontrol gruplarında 14. günde G0/G1 fazındaki hücre oranı %70.7 iken 21. ve 28. günlerde bu oranlar sırası ile %75.4 ve %80.15 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunda 28. günde, 14. güne kıyasla G0/G1 fazındaki hücre oranında %10' luk artış gözlenmiştir. Literatürde senesent hücrelerin hücre döngüsünün G1 fazında tutuklandığı rapor edilmiştir (2, 18, 51). Kontrol gruplarında uzayan kültür süresi ile G1/S fazında bulunan hücrelerin oranının artması literatüdeki çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Metformin doz grupları kendi aralarında kıyaslandığında uzayan kültür süresi ile G0/G1 fazında tutulan hücrelerin oranının %4-6 arasında arttığı bu çalışmada gözlenmiştir. Ayrıca metformin doz grupları kendi kontrol grupları ile kıyaslandığında ise metformin uygulamasının G0/G1 fazında tutulan hücre oranını düşürdüğü gözlenmiştir. Özellikle 9 mM doz grubunda 14. günde kontrole kıyasla G0/G1 fazında tutulan hücrelerin %12

oranında azaldığı, 21. ve 28. günlerde de sırası ile %5 ve %8 oranında azaldığı gözlenmiştir. Bu veriler ışığında metformin uygulamasının 9 mM uygulamasında senesensin bir diğer dezavantajı olan hücre döngüsü durma etkisini azaltarak senesens sürecini geciktirebileceği sonucuna varılmıştır.

MKH'lerin kendini yenileme potansiyeli ve farklı hücre tiplerine farklılaşma kapasiteleri bu hücrelerin hücrel terapi için ilgi çekici olmasını sağlamaktadır. Kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma özelliklerinin altında yatan moleküler süreç stemness özelliği ile ifade edilir. Stemness özelliğini kontrol eden genler hücrenin kendini yenilemesini ve farklılaşmasını düzenlemede rol oynarlar (2). MKH'lerde stemness genlerinin ekspresyon seviyesinin devamlılığının sağlanması ile bu hücrelerin potansiyellerinin korunduğu bilinmektedir. Ancak kültürde geçen sürenin MKH'lerde stemness genlerinin ekspresyon seviyesinde azalmaya yol açtığı ve bazı stemness genlerinin yetişkin hücrelerde ifade edilmediği bilinmektedir (29). Kültürde geçen süre ile stemness genlerinin ekspresyon seviyesinin azalmasının dolaylı olarak senesens süreci ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

MKH'lerde stemnes genlerinin metformin uygulaması ile ifadelerinin nasıl değiştiğini incelemek amacı ile *OCT4*, *NANOG*, *KLf4*, *Eras*, *Gdf 3*, *Sox 15*, *Dppa 2*, *Sall 4*, *Tcl 1*, *Zfp 42*, *Utf 1* ve *Bmu 1* genlerinin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. Kontrol gruplarında kültürde geçen süre ile çalışılan tüm stemnes genlerinin ekspresyon seviyesinde düşüş olduğu gözlenmiştir. Galderisi ve arkadaşlarının rat MKH'leri (2) ile, Bernardo ve arkadaşlarının insan MKH'leri ile (54) yaptığı çalışmalarda stemnes genlerinin ifadelerinin uzayan kültür süresi ile düştüğü gözlenmiş ve kontrol gruplarının durumu bu çalışmalardaki bulgular ile uyumluluk göstermektedir. *OCT4*, *NANOG*, *SOX15*, *Eras*, *TCL1* ve *ZFP42* genlerinde literatürdeki çalışmalara benzer şekilde 28. günde metformin uygulanan gruplarda da gen ekspresyon seviyesinin düştüğü görülmüştür. Ancak bu genlerin ifadelerinde diğer doz gruplarında azalma olurken, özellikle 21. günde 3 mM metformin uygulaması yapılan grupta gen ekspresyon seviyesinin 14. güne kıyasla arttığı gözlenmiştir. Kültürün 14. ve 21. gününde metformin dozlarında *OCT4*, *NANOG*, *SOX15* genlerinin ekspresyon seviyesinin artması, uygulamanın kültürün erken safhalarında stemness özelliklerinin korunmasına katkı sağladığı ancak ilerleyen günlerde bu etkiyi kaybettiği anlamına gelebilir. Pluripotensi için gerekli olan *SALL4* geninin ekspresyon seviyesinde kontrol ve doz

gruplarında kültür süresi ile ifadenin azaldığı gözlenmiştir. Stemness genlerinden sadece *KLF4* geninde 28. günde 3 mM, 6mM ve 9 mM doz gruplarında gen ekspresyon seviyesinde artış gözlenmiştir. *KLF4* geninin kodladığı proteinin hücrelerin G0/G1 fazından S fazına geçmelerinde rol oynadığı bilinmektedir (55). Hücre döngüsü testinden elde edilen veriler de *KLF4* ifade artışı ile tutarlı olarak metformin uygulanan doz gruplarında G0/G1 fazında azalma ve S ile G2/M fazında artış olduğunu göstermektedir. Elde edilen veriler doğrultusunda metformin uygulamasının *KLF4* ekspresyon seviyesini kültürün ilerleyen aşamalarında kontrol grubuna göre arttırarak hücre döngüsünün devamını ve hücre proliferasyonunu sağladığı sonucuna varılmıştır.

Kök hücreler, uzun ömürleri nedeniyle birçok iç ve dış strese maruz kalabilir. Oksijenli yaşamın kaçınılmaz sonucu olarak serbest oksijen radikallerinin zamanla birikmesi sonucu ya da iyonize radyasyon ve kemoterapi ajanları gibi çevresel etmenler sonucu DNA hasarı oluşabilmektedir. Öte yandan, hücreler doku ve organ homeostazisini desteklemek için tüm işlevlerini korumalıdır. Bu nedenle, kök hücreler etkili bir DNA hasar kontrol mekanizması ve senesens veya apoptozu tetiklemek yerine hücrelerin iyileşmesini sağlayan DNA onarım mekanizmasına sahip olmalıdırlar (2,22). DNA tamir mekanizmasının hücrelerin DNA hasarını minimize etmek için kullandığı temel tamir mekanizması olduğu bilinmektedir (52). DNA tamir mekanizmasının bozulması veya etkin çalışmaması kök hücrelerde fonksiyon kaybı oluşmasına ve senesens mekanizmasının tetiklenmesine yol açabilmektedir. Bu nedenle DNA hasarı, replikatif senesens sürecinin diğer bir önemli belirtecidir (24,52,53).

Bu çalışmada MKH'lerde DNA tamir genlerinin metformin uygulaması ile ifadelerinin nasıl değiştiğini incelemek amacı ile çift zincir DNA kırık onarımı (DSB), baz eksizyon onarımı (BER), nükleotid eksizyon onarımı (NER) ve yanlış eşleşme onarımı (MMR) ile ilişkili DNA tamir genlerinin, gen ifadelerindeki değişimler analiz edilmiştir. Çift zincir kırıklarının onarımında rol alan *BRCA2*, *MRE11A* ve *XRCC4* genlerinin metformin uygulaması ile kontrol gruplarında ve doz gruplarında uzayan kültür süresi ile genlerin ekspresyon seviyesinin azaldığı gözlenmiştir. Yanlış eşleşme onarımında rol alan *MLH1*, *TREX1*, *MSH2*, *MSH5* ve *POLD3* genlerinin metformin uygulaması ile *MSH2* geni hariç diğer genlerin ekspresyon seviyesinin kontrol ve doz gruplarında uzayan kültür süresi ile azaldığı gözlenmiştir. *MSH2* gen ekspresyon seviyesinde ise 21. günde 14. güne kıyasla gen ekspresyon seviyesinin arttığı ancak 28.

günde tekrar ifadenin azaldığı gözlenmiştir. Bu durum kültürün 14. ve 21. gününde metformin dozlarında bazı stemnes genlerinin ekspresyon seviyesinin artmasına benzer şekilde, uygulamanın kültürün erken safhalarında DNA tamir özelliklerinin korunmasına katkı sağladığı ancak ilerleyen günlerde bu etkiyi kaybettiği anlamına gelebilir. Bazı eksizyon onarımında rol alan *MUTYH*, *MPG*, *NTHL1*, *FEN1*, *MBD4* genlerinin metformin uygulaması ile kontrol gruplarında uzayan kültür süresi ile gen ekspresyon seviyesinin azaldığı gözlenmiştir. *MUTYH* ve *MPG* geninin ekspresyon seviyesi tüm doz gruplarında azalma gösterirken 6 mM doz grubunda genin ekspresyon seviyesi 28. günde artmıştır. *NTHL1* geni ekspresyon seviyesi 21. günde 6 mM dozda ve 28. günde 9 mM dozda artış göstermiştir. *OGG1* geninin ekspresyon seviyesinin 6 mM doz grubunda 14. güne kıyasla 21. ve 28. günlerde arttığı gözlenmiştir. Nükleotid eksizyon onarımında rol alan *XPA*, *RAD23A*, *ERCC3*, *SLK* genlerinin metformin uygulaması ile genlerin ekspresyon seviyesinin kontrol gruplarında kültür süresi ile azaldığı gözlenmiştir. *RAD23A* ve *XPA* genlerinin ifadeleri 28. günde 6 mM doz grubunda artış göstermiştir. *ERCC3* ve *SLK* genlerinin ekspresyon seviyesi ise kontrol gruplarına benzer şekilde uzayan kültür süresi ile azalmıştır. Galderisi ve arkadaşlarının rat MKH'leri (2) ile, Bernardo ve arkadaşlarının insan MKH'leri ile (54) yaptığı çalışmalarda DNA tamir genlerinin ifadelerinin uzayan kültür süresi ile düştüğü gözlenmiş ve bu tez çalışmasındaki kontrol gruplarının durumu literatürdeki bu çalışmalardaki bulgular ile uyumluluk göstermektedir. Metformin uygulamasının DNA tamir yolağı ile ilişkili genlerin ifadelerinde up ve down regülasyonlara yol açtığı gözlenmiştir.

Elde edilen veriler stemnes genleri açısından bazı genlerde 3 mM metformin uygulamasının genlerin ekspresyon seviyesinde artış sağlarken, DNA tamir yolağı ile ilişkili bazı genler açısından 6 mM ve 9 mM metformin uygulamasının genlerin ekspresyon seviyesinde artış sağladığı gözlenmiştir.

5.2. Sonuç ve Öneriler

Bu tez çalışmasında 28 gün kültür edilerek replikatif senesens sürecine sokulan MKH'lere eş zamanlı olarak metformin uygulaması yapılmıştır. Metformin uygulamasının senesens sürecini geciktirdiği senesens ilişkili β -galaktozidaz testi ve hücre döngüsü testi sonuçları ile gözlenmiştir. Özellikle 6 mM ve 9 mM doz

gruplarında metforminin kültürün geç safhalarında senesent hücre oranını azalttığı, hücre döngüsü testinde ise hücreleri G0/G1 fazından S fazına geçişini artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca stemnes genlerinden hücre döngüsünün G1- S faz geçişini sağlayan *KLF4* geninin ekspresyon seviyesinin kültürün geç safhasında 9 mM dozda artması da hücre döngüsü testi bulgusu ile örtüşmektedir.

RT-qPCR çalışma sonuçları metformin uygulamasının, stemnes genleri ve DNA tamir genlerinin ifadeleri üzerinde up ve down regülasyonlara yol açtığını göstermiştir.

Gen ifadelerinde meydana gelen değişikliklerin protein düzeyinde nasıl bir yol izlediğini anlamak amacıyla western blot çalışmalarının yapılması ve ilgili genlerin kodladığı proteinlerin proteomiks profillerinin analizi meydana gelen regülasyonların altında yatan süreçlerin daha net anlaşılmasını sağlayacaktır. Ayrıca hücre döngüsünün durması ve senesens ile yakından ilişkili Retinoblastoma (Rb1,Rb2..) gen ailesinin üyelerinin de gen ifadelerinin araştırılmasının bu süreçlerin altında yatan moleküler yolların daha iyi analizini sağlayacağı düşünülmektedir. MKH'lerin *in vitro* davranışı, hücre homeostazında anahtar bir fonksiyon oynayan p53 geninden de etkilenmektedir. Tümör baskılayıcı p53 geni, çeşitli biyolojik sistemlerde hücre döngüsü regülasyonu, apoptoz, yaşlanma ve farklılaşma ile ilgilidir ve bu genin hem gen ekspresyon seviyesi hem de protein düzeyinde analizi elde edilen sonuçlara katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Maggio N, Piccinini E, Jaworski M, Trumpp A, Wendt DJ, Martin I. Toward Modeling the Bone Marrow Niche Using Scaffold-Based 3D Culture Systems. *Biomaterials* 2011;32:321-9
2. Galderisi U, Helmbold H, Squillaro T, Alessio N, Komm N, Khadang B, Cipollaro M, Bohn W, Giordano A. In vitro senescence of rat mesenchymal stem cells is accompanied by downregulation of stemness-related and DNA damage repair genes. *Stem Cells Dev.* 2009 Sep;18(7):1033-42.
3. Harami MF, Duwayri Y, Martin JA, Buckwalter JA. Oxygen effects on senescence in chondrocytes and mesenchymal stem cells: consequences for tissue engineering. *Iowa Orthop J* 2004;24:15-20
4. Anisimov VN, Berstein LM, Popovich GI, Zabezhinski MA, Egormin PA, Piskunova TS, Semenchenko AV, Tyndyk ML, Yurova MN, Kovalenko IG, Poroshina TE. If started early in life, metformin treatment increases life span and postpones tumors in female SHR mice. *Aging* 2011;3:148-157
5. Stem Cell Information. <https://stemcells.nih.gov/tips.htm>. (2016). (25.04.2018).
6. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006;24:1294-301
7. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233:901-13.
8. Strem BM, Hicok KC, Zhu M. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005;54:132–141

9. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue Nastaran Mahmoudifar and Pauline M. Doran / Pauline M. Doran (ed.), *Cartilage Tissue Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1340, Springer Science+Business Media New York 2015
10. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7:211–228
11. Netter FH., 1987. *Musculoskeletal system: anatomy, physiology and metabolic disorders*. Ciba-Geigy Corporation, New Jersey. 134 pp.
12. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7
13. Can A. Kök Hücre, Biyolojisi Türleri ve Tedavide Kullanımları. Ankara: Akademisyen Kitabevi; 2014. s. 327-426.
14. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–147.
15. Tekeli S, Arısu Naghavi E, Gökçe B, Sır G, Yiğittürk G, Çavuşoğlu T, Uyanıkgil Y,. Stem cells; mesenchymal stem cells and current clinical applications. *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi* 2016;1(2):72-83.
16. Gazit Z, Pelled G, Sheyn D, Kimelman N, Gazit D. Mesenchymal stem cells, pp 513-524. *In: Handbook of Stem Cell Volume 1 Pluripotent Stem Cell*. (Eds. A. Ayala, R. Lanza) Elsevier Inc, San Diego, 2013: 524 pp.
17. Sharpless NE and RA DePinho. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:703–7
18. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Smith OP. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl Acad.* 1992; 93:63–9367.
19. Young ARJ, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JFJ, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, Narita M. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 2009; 23, 798–803.

20. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med*. 2015 Dec;21(12):1424-35.
21. Marfella R, Di Filippo C, Laieta MT, Vestini R, Barbieri M, Sangiulo P, Crescenzi B, Ferraraccio F, Rossi F, D'Amico M, Paolisso G. Effects of ubiquitin-proteasome system deregulation on the vascular senescence and atherosclerosis process in elderly patients. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008 Feb;63(2):200-3.
22. Ahmed ASI, Sheng MH, Wasnik S, Baylink DJ, Lau K-HW. Effect of aging on stem cells. *World Journal of Experimental Medicine* 2017;7(1):1-10.
23. Khanna KK and SP Jackson. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001; 27:247–254
24. Alessio N, Squillaro T, Özcan S, Bernardo G, Venditti M, Melone M, Peluso G, Galderisi U. Stress and stem cells: adult Muse cells tolerate extensive genotoxic stimuli better than mesenchymal stromal cells. *Oncotarget* 2018 Apr 10; 9(27): 19328–19341.
25. Peltomaki P. DNA mismatch repair and cancer. *Rev; Mutat Res* 2001; 488: 77-85.
26. (2016). National Center of Biotechnology. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term> (28.05.2017)
27. Hoeijmakers JH,. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):366-74.
28. Jansen J, Olsen AK, Wiger R, Naegeli H, Boer P, Hoeven F, Holme JA, Brunborg G, Mullenders L. Nucleotide excision repair in rat male germ cells: low level of repair in intact cells contrasts with high dual incision activity in vitro. *Nucleic Acids. Res* 2001 Apr 15; 29(8): 1791–18
29. Shi W, Wang H, Pan G, Geng Y, Guo Y, Pei D. Regulation of the Pluripotency Marker Rex-1 by *NANOG* and Sox2. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281(33): 23319–23325.
30. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005; 310: 1642-1646

31. Sui X, Xu Y, Wang X, Han W, Pan H, et al. Metformin: a novel but controversial drug in cancer prevention and treatment. *Mol. Pharm* 2015; 12: 3783-3791
32. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J* 2000; 348: 607-614
33. Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F, Viollet B. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J. Clin. Invest* 2010; 120: 2355-2369
34. Pittenger FM. Mesenchymal Stem Cells from Adult Bone Marrow. *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols*. In: Prockop D.J., Bunnell B.A., Phinney D.G (eds). Humana Press 2008. p27-44.
35. (2016). *Fundamental Techniques In Cell Culture Labrotory Handbook* 3rd edition. <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/101902/fundamental-techniques-in-cell-culture-3rd-edition.pdf> (24.05.2018)
36. Freshney RI, *Culture of Animal Cells Sixth Edition*. Wiley-Blackwell, NewJersey, 796 pp.
37. Huang HL, Hsing HW, Lai TC, Chen YW, Lee TR, et al. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *Journal of Biomedical Science* 2010; 17(1): 36.
38. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science* 2000;113, 3613-3622
39. 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. *Nature Protocols*. 2009; 4 (12):1798-1806.
40. McCarthy DA, Marcey MG. *Cytometric Analysis of Cell Phenotype and Function*, Chapter 10 - Cell Cycle, DNA and DNA Analysis Paul D. Allen and Adrian C. Newland 2001:186-188.

41. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; 36:131–149.
42. Darzynkiewicz Z, Gloria Juan G, Bedner E. Determining Cell Cycle Stages by Flow Cytometry. *Curr Protoc Cell Biol* 2001;8.4.1–8.4.18.
43. Garibyan L, Avashia N. Polym *Erase* Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* 2013; 133, e6.
44. Stahlberg A, Thomsen C, Ruff D. Quantitative PCR analysis of DNA, RNAs, and proteins in the same single cell. *Clin Chem* 2012; 58:1682– 91
45. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 2008; 44:619– 26
46. Matthews JA, Kricka LJ. Analytical strategies for the use of DNA probes *Anal. Biochem* 1988; 169, 1–25.
47. Navarro E, Serrano-H *Eras* G, Castaño, J. Solera MJ. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* 439 2015; 231–250
48. Sacco F, Silvestri A, Posca D, Pirrò S, Gherardini PF, Castagnoli L, Mann M, Cesareni G. Deep Proteomics of Breast Cancer Cells Reveals that Metformin Rewires Signaling Networks Away from a Pro-growth State. *Cell Syst* 2016 Mar 23;2(3):159-71.
49. Ronen A and BW Glickman. Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen* 2001; 37:241–283.
50. Chen D, Xia D, Pan Z, Xu D, Zhou Y, et al. Metformin protects against apoptosis and senescence in nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration *in vivo*. *Cell Death & Disease* 2016; 7, e2441.
51. Valentijn FA, Falke LL, Nguyen TQ, Goldschmeding R. Cellular senescence in the aging and diseased kidney. *J Cell Commun Signal* 2018 Mar;12(1):69-82.
52. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411:366–374.
53. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000;287:1433–1438.

54. Di Bernardo G, Squillaro T, Dell'aversana C, Miceli M, Cipollaro M, Cascino A, Altucci L, Galderisi U. Histone Deacetylase inhibitors promote apoptosis and senescence in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2008; 18(4):573-81.
55. Liu Y, Chen S, Wang S, Soares F, Fischer F, et al. Transcriptional landscape of the human cell cycle. *Proc Natl Acad* 2017 Mar 28; 114(13): 3473–3478.



EKLER



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı


Sayı : 90681248/
Konu :

12.01.2017

Sayın Doç. Dr. Servet 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	Metformin uygulamasının replikatif senesent insan mezenkimal kök hücrelere etkisinin gen ifadesi düzeyinde incelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLEN DİRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarih	Versiyon Numarası	Dili		
	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 : 2017/87	Tarih : 17.02.2017
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın yapılmasını gerektirir, ancak, yaklaşımları ve yöntemleri dikkate alınarak bilimsel ve uygun bilimsel olup olmadığını araştırmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel etkileri bilimsel değeri toplandıktan sonra etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmelidir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

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

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma ile İlişkisi	Kablim (*)	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"/>	
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"/>	
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"/>	
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"/>	
Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ	Çocuk Sağ. ve Hast.l	E.Ü. Tıp Fak.	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"/>	
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"/>	
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"/>	
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"/>	
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Aba, Dig ve Çene Radyolojisi	E.Ü. Dig 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"/>	
Doç. Dr. Cihangir BİÇER	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"/>	
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"/>	
Yard. Doç. Dr. Görmen 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"/>	
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 checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
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"/>	
Sevtap 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"/>	

* Toplamda Bekleme

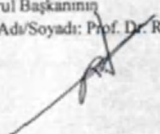
Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:

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

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011-2013)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Metformin uygulamasının replikatif senesent insan mezenkimal kök hücrelere etkisinin gen ifadesi düzeyinde incelenmesi				
VARSA ARAŞTIRMANIN 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	byanca@erciyes.edu.tr				
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATOR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Doç Dr. Servet Özcan				
	KOORDİNATOR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Biyoloji, Kök Hücre, Proteom				
	KOORDİNATOR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri				
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ ADI SOYADI					
	DESTEKLEYİCİ					
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TUBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)					
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMCİLCİSİ					
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>			
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>			
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>			
FAZ 4		<input type="checkbox"/>				
Gözetimsel 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:



ASLI GİRİDİR

T.C.
Funda BASÇIZMECİ
Etik Kurul Sekreteri

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


Sayı: 68742022- 604.01.02-188
Konu: Değerlendirme ve Onay

29/11/2016

Sayın Doç.Dr. Servet ÖZCAN ;

“ Metfotmin Uygulamasının Replikatif Seneset İnsan Mezenkimal Kök Hücrelere Etkisinin Gen İfade Düzeyinde İncelenmesi” başlıklı projenizi Merkezimiz Kök Hücre Birimi, Genom Birimi, Görüntüleme Birimlerinde (Muse Cell Analyzer, RT PCR cihazları) gerçekleştirilmesi tarafımızca uygun bulunmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.


Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Müdür V.

METFORMİN UYGULAMASININ REPLİKATİF SENESENT
İNSAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERE ETKİSİNİN GEN
İFADESİ DÜZEYİNDE İNCELENMESİ

ORIGINALITY REPORT

3%	2%	2%	2%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	Submitted to Erciyes Üniversitesi Student Paper	1%
2	www.toraks.org.tr Internet Source	1%
3	Mariarosa A.B. Melone. "Genes involved in regulation of stem cell properties: studies on their expression in a small cohort of neuroblastoma patients", Cancer Biology & Therapy, 07/01/2009 Publication	<1%
4	www.bindetechnik-24.de Internet Source	<1%
5	biosignaling.biomedcentral.com Internet Source	<1%
6	P H Nguyen, J Giraud, C Staedel, L Chambonnier et al. "All-trans retinoic acid targets gastric cancer stem cells and inhibits	<1%

Prof. Dr. Serap Tokdemir
Eda MENT GÖKDURAN
Stil

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Eda MERT GÖKDUMAN
Uyruğu : Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri : 13.05.1990, Kayseri
Medeni Durumu : Evli
e-posta : mertt.eda@gmail.com
Yazışma Adresi : Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Anabilim Dalı	2018
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2013
Lise	Kayseri Kocasınan Lisesi	2007

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.