

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK
FARKLILAŞMASINA FUNGAL BETA-GLUKANIN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Leyla KAYIŞ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ

2018

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK
FARKLILAŞMASINA FUNGAL BETA-GLUKANIN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Leyla KAYIŞ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gökhan DURUKSU

T.C.
Kocaeli Üniversitesi

Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi- Proje No: 2016/309

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Belge No: KÜ GOKAEK
2016/30.3

KOCAELİ

2018

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(Tez Onay Sayfası)

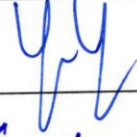
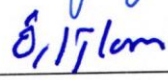

Tez Adı: Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasına Fungal Beta-Glukanın Etkilerinin İncelenmesi

Tez Yazarı: Leyla KAYIŞ

Tez savunma tarihi: 06.06.2018

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Gökhan DURUKSU

İş bu çalışmada jürimiz tarafından Kök Hücre Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Jüri Üyeleri		İmzası
Ünvanı Adı Soyadı		
Üye	Doç. Dr. Yusufhan YAZIR	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Özlem Sağlam UÇAR	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Gökhan DURUKSU	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.... / / 2018

Prof.Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Amaç: Mantarlar çok eski zamanlardan günümüze dek özellikle Orta Asya ülkelerinde çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır. Günümüzde mantarlardaki bu tedaviyi sağlayan bileşenlerin birçoğu tespit edilmiş olup pek çok ilacın yapımında aktif olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan biri olan β -glukanlar, günümüzde immün sistemi güçlendirmekten, kolesterolün düşürülmesine veya çeşitli tümörlerin azaltılmasını hedefleyen tedavi yöntemlerinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada *P.ostreatus*'dan izole edilen $\beta(1,3)$ -(1,6)-glukanların iKİ-MKH'lerin osteojenik farklılaşma üzerindeki etkilerinin ve bu süreçte MAPK sinyal yolağının rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada, ülkemiz florasında doğal olarak yetişen *P.ostreatus*'un hücre duvarı elemanlarından olan β -(1,3)-(1,6) zincir yapısına sahip olan glukanlar sıcak sodyum hidroksit yöntemi ile izole edilmiştir. iKİ-MKH'ler ile etkileşim kurabilmelerini sağlamak için izole edilen glukanlarla kültür kaplarının yüzeyleri kaplanmıştır. iKİ-MKH'ler bu yüzeyler üzerine ekilerek kültürü yapılmıştır. β -glukanların MKH'lerin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkisi 21 gün süren osteojenik farklılaştırma sonrasında gen ifadesi analizi, alkalen fosfataz aktivitesi ölçümü ve histolojik boyamalar ile ortaya konmuştur. β -glukanların iKİ-MKH'lerin osteojenik farklılaşmalarını MAPK sinyal yolağı üzerinden desteklediğini anlayabilmek için p38 α ve MKK/MEK proteinleri inhibe edilmiştir. Yapılan inhibisyonların sonucunda hücrelerde meydana gelen değişimler gen ifadesi analizi ve immün floresan boyamalar ile ortaya koyulmuştur.

Bulgular: β -glukan kaplı yüzeylere ekilerek farklılaştırmaya yönlendirilen hücrelerde osteojenik farklılaşma belirteçlerinden olan OPN'in 252,5 \pm 7,6 kat, cFos, Runx2 ve BMP2 gibi genlerin ise yaklaşık 500 kat artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Aynı hücrelerde MAPK sinyal yolağına ait proteinlerden olan MEK1'in 4255,2 \pm 170,2 kat, p38 α 'nın 528,2 \pm 19,5 kat, ERK1'in 63,6 \pm 2,7 kat ve Jnk'nın da 51,9 \pm 2,1 kat artmış olduğu gözlemlenmiştir. Bununla beraber β -glukan kaplı yüzeylere ekilen hücreler, p38 α inhibisyonu yapılarak osteojenik farklılaşmaya alındığında hem osteojenik farklılaşma belirteçlerinin gen ifadesinde hem de MAPK sinyal yolağı elemanlarının gen ifadesinde anlamlı ($p < 0,05$) bir düşüşün olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç: Gerçekleştirilen analizler doğrultusunda β -glukanın iKİ-MKH'lerin MAPK sinyal yolağını uyardığı ve osteojenik belirteçlerin ifadelerini kısıtlı da olsa artırdığı gösterilmiştir.

Ancak farklılaşma sürecinin gerçekleşebilmesi için yeterli bir uyarı sağlamayan β -glukanın diğer kimyasal uyarıcılarla birlikte kullanılmasıyla daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Birlikte kullanım ile sinerjik bir etki yaratılarak osteojenik farklılaşma yüksek oranda desteklenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda β -glukanın osteojenik farklılaşmayı destekleyen bir biyomalzeme olarak kullanılması önerilebilir.

Anahtar sözcükler: Mezenkimal Kök Hücre, *Pleurotus ostreatus*, beta-glukan, p38, MAPK, osteojenik farklılaşma



ABSTRACT

Objective: Fungi have been used from ancient times to recent time for the treatment of various diseases, especially in Central Asian countries. Nowadays many of these therapeutic ingredients in fungi have been identified and actively used in the production of many medicines. β -glucan, one of these ingredients, is currently used in supporting the immune system, in cholesterol level control, or in the treatment for various tumors. In this study, it was aimed to investigate the effects of β -(1,3)-(1,6)-glucans isolated from *P.ostreatus* on osteogenic differentiation of hBM-MSCs and the role of MAPK signaling pathway in this process.

Method: In this study, glucans with β -(1,3)-(1,6) chain structure were isolated by hot sodium hydroxide method from the cell wall of *P.ostreatus*, which grow naturally in Turkey. Surfaces of the culture vessels were coated with the isolated glucans, and cells were cultured on these surfaces to provide interaction with hBM-MSCs. The effect of β -glucans on the osteogenic differentiation of MSCs lasting 21 days was demonstrated by gene expression analyses, alkaline phosphatase activity and histological staining of samples. p38 α and MKK / MEK proteins were inhibited to understand that β -glucans promote the osteogenic differentiation of hBM-MSCs via the MAPK signaling pathway. As a result of the inhibitions, the alterations in the cells were revealed by gene expression analysis and immunofluorescence staining.

Result: In the cells induced by differentiating on the β -glucan-coated surfaces, the expression of osteogenic differentiation marker OPN was induced by 252.5 \pm 7.6 fold, and the expression level of cFos, Runx2 and BMP2 increased about 500 fold. In the same cells, MAPK signal pathway proteins MEK1, p38 α and ERK1 were induced by 4255,2 \pm 170.2 fold, 528.2 \pm 19.5 fold and 51,9 \pm 2,1 fold with respect to the control group, respectively. In addition, cells seeded on the β -glucan-coated surfaces showed significant decrease both in the expression of osteogenic differentiation markers and in the expression of MAPK signaling pathway proteins when p38 α inhibition during the osteogenic differentiation (p <0.05).

Conclusion: It has been shown that β -glucan stimulates the MAPK signaling pathway and induces limitedly the expression of osteogenic markers. However, better results were obtained by using other chemical stimulants together with β -glucan, which did not provide sufficient stimulation for the differentiation. Simultaneous use of β -glucan and chemical inducers highly supported the osteogenic differentiation by creating a synergistic effect. As conclusion, it might be suggested that β -glucan can be used as a biomaterial to support the osteogenic differentiation.

Key words: Mesenchymal Stem Cells, *Pleurotus ostreatus*, beta-glucan, p38, MAPK, osteogenic differentiation

TEŞEKKÜR

Öncelikle, KÖGEM ailesine katılmama ve hayalim olan kök hücre alanında çalışma yapmama olanak sağlayan değerli hocam **Doç. Dr. Yusufhan YAZIR**'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin her aşamasında bana her konuda destek olan, fikir ve önerileri ile bu çalışmayı daha da zenginleştiren, beni eğiten, yönlendiren ve pek çok konuda cesaretlendiren üzerimde maddi manevi çok emeği olan ve hayatım boyunca minnet duyacağım çok kıymetli danışmanım **Dr. Öğr. Üyesi Gökhan DURUKSU**'ya sonsuz teşekkürler.

Yüksek Lisans eğitimine bağladığım günden itibaren desteklerini, bilgilerini ve güler yüzlerini esirgemeyen sayın hocalarım **Dr. Öğr. Üyesi Gülçin GACAR**, **Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI** ve **Doç Dr. Özgür MEHTAP**'a teşekkürler.

Ayrıca **Ayşegül AÇIKSARI**, **Sema YUSUFOĞLU**, **Gizem KARAKURT**, **Gülay ERMAN** ve **Talhmina Hayrunnisa TATAR**'a ve tüm sevgili çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

En mutlu anlarımda da en stresli anlarımda da hep yanımda olan, hiçbir konuda yardımlarını, samimiyetlerini ve desteklerini esirgemeyen sevgili dostlarım, **Selen POLAT**, **Nur EKİMCİ GÜRCAN**, **Bulut YURTSEVER** ve **Gizem USLU**'ya hayatımda ve yanımda oldukları için sonsuz teşekkür ederim.

Kocaeli'nin hayatıma kattığı en güzel şeylerden biri olan, hayata gülümseyerek ve inançla bakmamı sağlayan müstakbel eşim **Ahmet Rasim TİREKİ**'ye teşekkür ederim.

Bu yaşıma dek bıkmadan usanmadan eğitim hayatım boyunca peşimde sürüklenen ve her türlü zorluğuma tahammül eden, hayatımdaki en değerli insan olan sevgili Annem **Hakime KAYIŞ**'e en derin şükranlarımı sunarım.

Benimle her zaman gurur duyan, maddi manevi desteklerini esirgemeyen canım kardeşlerim **Süleyman KAYIŞ**, **Kemal KAYIŞ**, **Emine SEVİNDİK**'e ve canım Halam **Selma SEVİNDİK**'e varlıkları ve üzerimdeki emekleri için sonsuz teşekkürler.

Son olarak bunların hiç birine şahit olamasa da benimle gurur duyduğuna emin olduğum sevgili rahmetli Babam **Niyazi KAYIŞ**'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

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

..... / / 2018

Leyla KAYIŞ

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	viii
TEŞEKKÜR.....	x
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ	xi
İÇİNDEKİLER	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
ÇİZİMLER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ	1
1.1.Kök Hücreler.....	1
1.1.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	2
<i>Totipotent kök hücreler:</i>	2
<i>Pluripotent kök hücreler:</i>	2
<i>Multipotent kök hücreler:</i>	2
<i>Oligopotent kök hücreler:</i>	2
<i>Unipotent kök hücreler:</i>	3
1.1.2. Mezenkimal Kök Hücreler ve Temel Özellikleri	4
1.1.2.1. <i>Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma özellikleri</i>	7
1.1.2.1.1. <i>Osteojenik farklılaştırma</i>	7
1.1.2.1.2. <i>Adipojenik farklılaştırma</i>	9
1.1.2.1.3. <i>Kondrojenik farklılaştırma</i>	9
1.1.3. Hücre Sinyal Yolakları.....	10
1.1.3.1. <i>Mitojenle Aktive-edilmiş Protein Kinazlar (MAPK)</i>	10
1.1.3.1.1. <i>Erk1/2 sinyal kaskatı(zinciri)</i>	12
1.1.3.1.2. <i>Erk5 sinyal kaskatı</i>	13
1.1.3.1.3. <i>JNK sinyal kaskatı</i>	13
1.1.3.1.4. <i>p38 sinyal kaskatı</i>	14
1.2.Mantarlar.....	15
1.2.1. <i>Pleurotus ostreatus</i>	15
1.2.1.1. <i>Fungal glukanlar</i>	18
1.2.1.1.1. <i>Alfa glukanlar</i>	18
1.2.1.1.2. <i>Beta glukanlar</i>	18

2. AMAÇ.....	21
3. YÖNTEM.....	22
3.1.Polisakkarit İzolasyonu	22
3.1.1. Karbonhidrat Miktarının Belirlenmesi	24
3.1.2. Glukan Miktarının Belirlenmesi.....	24
3.2.Kültür Kabı Yüzeyinin Kaplanması.....	25
3.3.Polisakkaritlerin Hücre Kültürüne Uygunluğunun Ölçülmesi	25
3.3.1. Toksikite Deneyi.....	25
3.3.2. Canlılık Deneyi (WST-1).....	26
3.4.iKİ-MKH'lerin Kültürü	26
3.4.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	27
3.5.iKİ-MKH'lerin <i>In-vitro</i> Osteojenik Farklılaştırılması	28
3.6.Hücrelerden RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	28
3.7.MAPK Sinyal Yolağı İnaktivasyonu	29
3.8.Gen Ekspresyon Analizi	29
3.9.İmmünohistokimyasal ve İmmünofloresan Boyama	31
3.10. İstatistiksel analiz.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1.Glukanların Miktar Tayini	33
4.2.Kaplama Materyali Olarak Kullanılan Glukanların Hücreler Üzerindeki Etkileri	36
4.3.Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmaya Yönlendirilmesi	39
4.4.β-glukanların iKİ-MKH'lerin Osteojenik Farklılaşması Üzerindeki Etkileri.....	40
4.5.MAPK Sinyal Yolağı ile Osteojenik Farklılaşma İlişkisi.....	45
5. TARTIŞMA	56
5.1.Sınırlılıklar	64
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	65
KAYNAKÇALAR DİZİNİ.....	66
ÖZGEÇMİŞ	70
EKLER.....	73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MKH (MSCs): Mezenkimal Kök Hücre

iKİ-MKH (hBM-MSCs): İnsan Kemik İliği Kaynaklı-Mezenkimal Kök Hücre

M1: Mantar 1 (x marka *Pleurotus ostreatus* türü mantar)

M2: Mantar 2 (y marka *Pleurotus ostreatus* türü mantar)

α -Glc: alfa-glukan

β -Glc: beta-glukan

β -Glc (Y): Maya kaynaklı beta-glukan

F+ : Osteojenik farklılaştırma yapılmış,

F- : osteojenik farklılaştırma yapılmamış,

İ+ : inhibisyon yapılmış,

İ- : inhibisyon yapılmamış,

OPN: Osteopontin,

BMP: Kemik Morfogenetik Protein (Bone Morphogenetic Protein)

MAPK/ERK: Mitojenle aktive edilmiş protein kinazlar/ hücre dışı sinyal düzenlenmiş kinazlar

MAPKK: Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz kinazlar

MAPKKK: Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz kinaz kinazlar

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin bazı fonksiyonları ve özellikleri.....	6
Çizim 1.2 MKH'lerin <i>in vitro</i> ortamda osteojenik farklılaşmasının evreleri.....	8
Çizim 4.1 Fenol-Sülfürik asit deneyi.....	34
Çizim 4.2 Kaplanma miktarının Fenol-Sülfürik Asit tekniği ile tespiti.....	36
Çizim 4.3 Kaplanan yüzey üzerine ekilen hücrelerin 24 saatlik sonraki tutunma miktarları.	37
Çizim 4.4 Kültür kabı yüzeyi kaplama materyali olarak kullanılan glukunların toksisite ölçümü. .	38
Çizim 4.5 Glukan kaplı kültür kabı üzerine ekilen hücrelerin proliferasyonu.....	39
Çizim 4.6 iKİ-MKH'lerin osteojenik farklılaştırılma sürecindeki morfolojik değişimler.....	40
Çizim 4.7 Osteojenik farklılaştırmanın 7. günlerindeki ALP aktivite ölçümü	41
Çizim 4.8 α -Glukan kaplı yüzeyler üzerin osteojenik farklılaşma ve Alizarin Red S boyaması....	42
Çizim 4.9 β -Glukan kaplı yüzeyler üzerin osteojenik farklılaşma ve Alizarin Red S boyaması....	43
Çizim 4.10 α - ve β - glukun kaplı yüzeylerde farklılaştırmaya alınan hücrelerin gen ifadeleri.....	44
Çizim 4.11 Osteojenik farklılaştırmaya yönlendirilmiş iKİ-MKH'lerin BMP2/4 antikoru boyaması görüntüsü.....	45
Çizim 4.12 p38 α inhibisyonu yapılan iKİ-MKH'lerde osteogenez ile ilgili genlerin analizi.....	46
Çizim 4.13 p38 α inhibisyonu yapılan iKİ-MKH'lerde MAPK sinyal yolağı genlerinin analizi.....	49
Çizim 4.14 Osteojenik farklılaştırmaya alınan iKİ-MKH'lerin İF boyama görüntüleri.....	51
Çizim 4.15 Osteojenik farklılaştırmaya alınan iKİ-MKH'lerin İF boyama görüntüleri.....	52
Çizim 4.16 Osteojenik farklılaştırmaya alınan iKİ-MKH'lerin İF boyama görüntüleri.....	54
Çizim 4.17 Osteojenik farklılaştırmaya alınan iKİ-MKH'lerin İF boyama görüntüleri.....	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 İnsan kök hücrelerinin sınıflandırılması	3
Çizelge 1.2 MAPK sinyal yolağı.	11
Çizelge 1.3 <i>P. ostreatus</i> 'un medikal etkileri ve etken maddeleri	17
Çizelge 1.4 Pleuranın terapötik bileşen olarak kullanıldığı bazı çalışmalar	20
Çizelge 3.1 <i>P. ostreatus</i> 'dan polisakkaritlerin izole edilmesi yöntemi ve basamakları	23
Çizelge 3.2 Deney grupları	27
Çizelge 3.3 Gen ekspresyonu analizi için kullanılan primerler ve baz dizilimleri.....	30
Çizelge 4.1 İzolasyon ile elde edilen kuru polisakkarit miktarları.....	34
Çizelge 4.2 Kaplama malzemesi olarak kullanılan çözünmüş glukanların kültür kabını kaplama miktarları	35
Çizelge 4.3 İzolasyon sonra elde edilen polisakkaritlerdeki total α - ve β -glukan miktarları.....	35



1. GİRİŞ

Hücre, etrafı bir zar ile çevrili olan canlının en küçük fonksiyonel yapı birimidir. Bir hücre bulunduğu ortamdaki besin maddelerini çeşitli yöntemler ile içine alıp bu maddeleri biyokimyasal bir takım işlemlere tabi tutarak enerji elde eder. Bu ise tek başına bir hücrenin canlılığını sürdürebilmesine kendisini bölünme ile çoğaltabilmesine olanak sağlar.

İlkel türlerde olduğu gibi canlı tek bir hücreden meydana gelebilir ya da daha fazla gelişmiş canlılarda olduğu gibi birden fazla hücrenin bir araya gelmesi sonucu koloni oluşturarak bir organizmayı meydana getirebilirler. Bunun ötesinde çok gelişmiş canlılarda olduğu gibi hücreler dokuları, dokular organları ve organlar da karmaşık bir organizmayı meydana getirebilir.

Genetik bilginin aktarılması, hücrelerin bölünmesi ile meydana gelmektedir. Tek hücreli canlılarda mitoz bölünme ile çoğalma ve dolayısı ile yeni bir bireyin meydana gelmesi söz konusudur. Buna karşın gelişmiş canlılarda, örneğin insanda ise mitoz bölünme sadece somatik hücrelerin çoğalmasını sağlar ve yeni bir bireyin meydana gelmesi için mayoz bölünmeyle haploid (n) sayıda kromozoma düşen dişi ve erkek eşey hücrelerinin çekirdeklerinin birleşmesi ve 2n kromozomlu zigotun oluşması gerekir. Döllenme sonrası oluşan zigot bir dizi bölünme geçirerek çoğalır ve ileride bir canlının tüm doku ve organlarını meydana getirebilecek 200 farklı hücre tipine dönüşme potansiyelindeki “kök hücreler”i meydana getirir. Oluşan bu özel hücreler ise embriyogenez boyunca plasenta da dâhil olmak üzere bir embriyoyu meydana getirecek bütün doku, organ ve sistemlerin oluşmasını sağlar.

1.1. Kök Hücreler

Kök hücreler genel olarak hücre bölünmesi yoluyla kendilerini yenileme, kendisi ile aynı özelliğe sahip hücreleri meydana getirebilme ve çok çeşitli özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen öncü hücreleri meydana getirebilme özelliğine sahip olan özel hücreler olarak tanımlanmışlardır (Avasthi ve diğ. 2008). Örneğin, insanlar tarafından en çok bilinen kök hücrelerden biri olan kemik iliği kaynaklı kök hücreler kırmızı ve beyaz

kan hücrelerine farklılaşabilirken dahası antikor üretimi ve enfeksiyona karşı mücadelede rol almak gibi özel fonksiyonlar gösterebilmektedirler (Bongso ve Lee 2010)

Bugüne kadar yapılan çalışmalar ışığında kök hücrelerin bulunduğu kaynağa, kaynağın yaşına ya da izolasyon yapılan doku ya da organa göre farklı özellikler sergileyebildikleri gözlemlenmiştir. Genel olarak kök hücreler bir başka hücreye farklılaşabilme potansiyellerine göre yani potensilerine göre ya da embriyonik ya da yetişkin bireyde bulunması durumlarına göre sınıflandırılabilirler.

1.1.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

İnsan vücudunda birçok hücre çeşidi bulunmaktadır. Bu hücrelerin tanımlanması, hücrelerin yüzeylerinde bulunan belirteçler ya da moleküler analizler aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Fakat genel olarak bilim insanları kök hücreleri *in vitro* veya *in vivo* ortamlarda farklılaşabilme yeteneklerine göre sınıflandırmaktadırlar. Genel olarak kök hücreler şu şekilde sınıflandırılmaktadır;

Totipotent kök hücreler: zigotun bölünmesi sonucu meydana gelen ilk bir kaç hücre bu özelliktedir. Bu hücreler ekstra-embriyonik hücreler de dahil olmak üzere o canlının bütün hücrelerini meydana getirebilme yeteneğine sahip olan hücrelerdir.

Pluripotent kök hücreler: embriyonik gelişim esnasında meydana gelen blastokistin iç hücre kitlesini oluşturan hücrelerdir. Bu hücreler endoderm, mezoderm ve ektoderm tabakasından köken alan tüm dokuların hücrelerini meydana getirebilecek potansiyelde olan hücrelerdir. Ayrıca günümüzde pluripotensiyi sağlayan genlerin özelleşmiş ya da olgunlaşmış olarak nitelendirilen hücrelere aktarılması sonucunda da “**İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre**” olarak isimlendirilen kök hücrelerin elde edilmesi mümkündür.

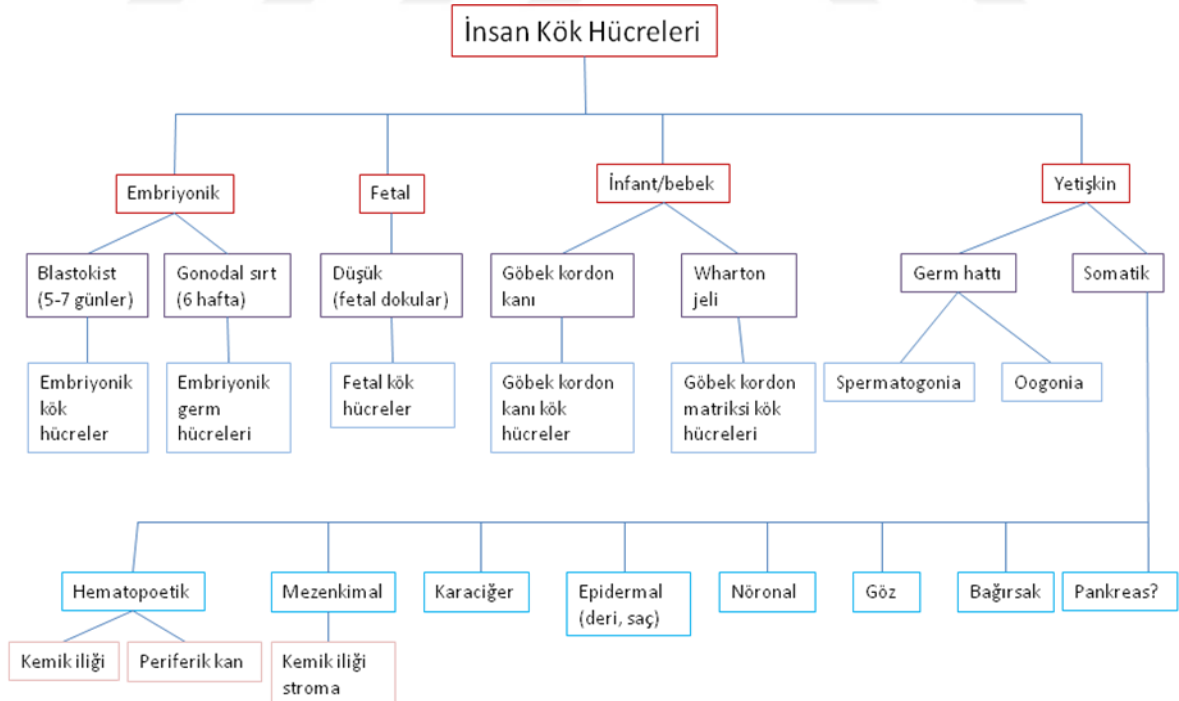
Multipotent kök hücreler: genel olarak yetişkin bireylerde, bulunduğu dokunun orijini olan tabakanın oluşturduğu hücre tiplerine farklılaşabilme özelliği olan hücrelerdir. Hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler en iyi bilinen örnekleridir.

Oligopotent kök hücreler: yetişkin bireylerde bulunan bu hücreler, örneğin nöronal kök hücrelerde olduğu gibi bulunduğu dokudaki bir ya da iki hücre tipine farklılaşabilme özelliğine sahiptir.

Unipotent kök hücreler: bu hücreler ise tek bir hücre tipini meydana getirebilme yeteneğine sahiptir. Bunlara ise, eşey hücresi olan spermatogonial hücreler örnek verilebilir (Steinhoff 2013).

Yukarıda bahsedilmiş olan sınıflandırmanın dışında kök hücreler kaynaklarına göre de sınıflandırılabilmektedir. Çizelge 1.1’de gösterildiği gibi embriyonik kök hücreler, fetal kök hücreler, erişkin kök hücreler ve göbek kordonu kök hücreleri olmak üzere dört temel gruptan bahsedilebilir. Her bir grubun içinde yer alan kök hücreler ise alt türlerine ayrılabilir. Bazı bilim insanları yetişkin ve fetal kök hücrelerin embriyonik kök hücrelerden köken aldığını düşünmektedirler. Yetişkin organlarda gözlemlenen az miktardaki kök hücrelerin embriyonik kök hücre kalıntıları olduğu, doku ya da organda meydana gelen kısmi hasarlar sonucunda buldukları nişlerinden ayrılıp hasar sonucu kaybedilen hücrelere farklılaşarak o bölgenin onarılmasına katkıda buldukları düşünülmektedir (Bongso ve Lee 2010).

Çizelge 1.1 İnsan kök hücrelerinin sınıflandırılması.



Kök hücrelerin hem birçok hücre hattını meydana getirebilme, hem de kendisini yenileyebilme özellikleri bilim insanlarının oldukça ilgisini çekmiştir. Yenileyici tıp yaklaşımı kapsamında hücre tabanlı tedaviler ya da ilaç geliştirme çalışmalarında kök hücrelerin oldukça iyi bir kaynak olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla birçok hastalığın tedavisi, hasarlı doku ya da organların iyileştirilmesi veya ilaç denemelerinin yapılması amacıyla *in vitro*, *in vivo* ve hatta klinik çalışmalar hızla artmıştır. Özellikle potensileri çok yüksek olan embriyonik kök hücreler başta olmak üzere, kök hücreler ile yapılan bu araştırmaların sonucunda dejenerasyon olmuş dokularda iyileşme süreci ve birtakım hastalıkların patolojisinde iyileşmelerin olduğu gözlemlenmiştir. Fakat her ne kadar potansiyelleri yüksek olsa da embriyonik kök hücrelerin kullanılması ülkemizde de olduğu gibi birçok ülkede hem etik, hem ahlaki kaygılar hem de insanların “canlı bir bireyin yaşamına son vermek sureti ile elde ediliyor” düşüncesini taşıyor olmaları dolayısıyla engellenmiştir.

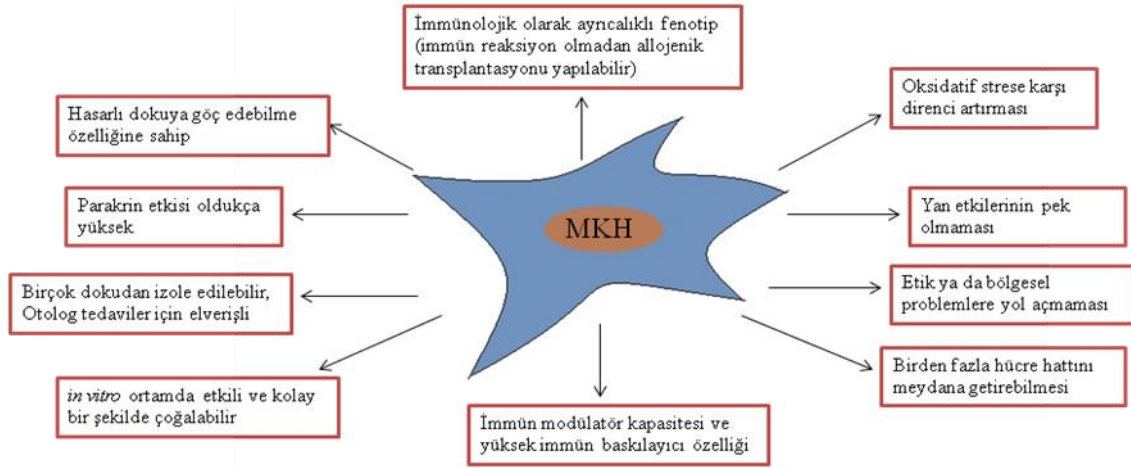
Takahashi ve Yamanaka (2006) pluripotensiyi sağlayan genleri tespit etmiş ve somatik bir hücre olan fibroblastta bu genleri aktararak moleküler bir indükleme ile hücrenin pluripotent özelliği kazanmasını sağlamışlardır. **İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (IPSC)** olarak isimlendirilen bu hücreleri embriyonik kök hücrelerin kullanımının yasak olduğu ülkelerde bilim insanları, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarını yürütmek amacıyla ya da klinik uygulama öncesi gerekli deneylerin yapılması aşamasında sıklıkla kullanmaya başlamışlardır. Fakat yine de yapılan çalışmalar incelendiğinde mezenkimal kök hücrelerle yapılan bilimsel araştırmaların embriyonik kök hücreler ile yapılan çalışmalardan sayıca çok daha fazla olduğu gözlemlenmektedir.

1.1.2. Mezenkimal Kök Hücreler ve Temel Özellikleri

Yetişkin kök hücrelerden biri olan mezenkimal kök hücrelerden ilk olarak Friedenstein ve arkadaşları (1970) kemik iliği stromasında bulunan, fibroblastlara benzeyen hücreler olarak bahsetmişlerdir. Daha sonrasında ise Caplan (1991) ilk olarak Mezenkimal Kök Hücre’leri kemik iliği stromasını destekleyen, *in vivo* ortamda ve hatta bir takım güdümlenmeler ile *in vitro* ortamlarda kondrositlere, osteoblastlara, adipositlere ve teorik olarak tendon, ligament, dermis, kas ve yağ doku hücrelerine farklılaşabilecek hücreler olarak tanımlanmışlardır. Bu tanımlamaların hücreleri sınıflandırmak için yetersiz kaldığı düşünülerek 2001 yılında Uluslararası Hücresel Terapi Topluluğu (ISCT)

Mezenkimal Kök Hücreleri tanımlamak için bir takım anahtar niteliği taşıyan kriterler belirlemişlerdir. Bunlardan ilki; *in vitro* ortamda kültür edildiği plastik yüzeye yapışması, ikincisi; CD90, CD105, CD106, CD44, CD166, CD73 ve CD29 yüzey belirteçlerini taşıırken CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19, CD31 ve HLA-DR belirteçlerini taşıyamaması; üçüncü özellik olarak da mezenkim dokusundan köken almış olan adiposit, kondrosit ve osteoblastlara farklılaşabilme özelliği bulunması şeklindedir. Ancak bu kriterleri taşıyan hücreler “**Mezenkimal Kök Hücreler**” olarak nitelendirilebilir (Gnecchi 2016)

MKH’ler, plasenta, göbek kordonu ve kordon kanı, amniyon sıvısı, kemik iliği, adipoz doku, karaciğer ve dental pulpa gibi insan vücudunda neredeyse tüm dokulardan çeşitli izolasyon yöntemleri kullanılarak izole edilmiş ve tanımlanmışlardır. Klinik araştırmalarda ya da klinik uygulamalarda günümüze kadar çoğunlukla kullanılan kök hücreler kemik iliğinden elde edilen MKH’lerdir. Bunun dışında adipoz doku kemik iliğine göre insan vücudunda daha fazla oranda bulunmaktadır. Fakat yapılan araştırmalar, kök hücrelerin bulunduğu nişe bağlı olarak özelliklerinin farklı olabileceğini göstermiştir. Bu kapsamda hücrelerin çoğalma ya da farklılaşma kapasiteleri farklı olabileceği gibi yüzey antijenlerindeki ekspresyon düzeyleri de farklılıklar gösterebilmektedir (Garcia-Gomez ve diğ. 2010). Örneğin, Lofty ve ark. (2014) yapmış oldukları çalışmada elde ettikleri bulgular sonucunda kemik iliğinden izole edilen MKH’ler, adipoz dokudan izole edilen MKH’ler ile kıyaslandığında osteositlere çok daha iyi bir şekilde farklılaşabildiğini gözlemlemişlerdir. Fakat kökeni ne olursa olsun şu bilinen bir gerçektir ki; MKH’lar mezenkim kaynaklı dokuların progenitörleri olan multipotent özellikteki hücrelerdir (Garcia-Gomez ve diğ. 2010).



Çizim 1.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin bazı fonksiyonları ve özellikleri (Dantuma E ve diğ. 2010)

MKH'lerin doku ve organların yenilenmesi, düzenli olarak çalışmalarının sağlanması, doku matriksinin yenilemesi, farklılaşarak farklı hücreleri oluşturması gibi birçok önemli özellikleri vardır (Çizim 1.1). Bu özelliklerinden dolayı tedavi yaklaşımlarında bu hücrelerin kullanımına yönelik araştırmalar ilgi çekmektedir. Örneğin, trofik (besleyici), parakrin ve immünmodülasyon özellikleri taşıması dolayısıyla *in vivo* ortamda da çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılması durumu da söz konusudur. Ayrıca MKH'ler eğer hasarlı bir doku varsa, dokuyu yeniden eski haline getirmek için hasarın bulunduğu dokuya göç edip hasarlı dokudan kalan ölmüş hücreleri ortadan kaldırmaları için çeşitli immün sistem hücrelerini etkileyecek olan sitokinleri salgılama, dokuyu oluşturacak hücreler için çeşitli büyüme hormonları salgılama gibi özellikleri de barındırmaktadır.

MKH'lerin özellikle son yirmi yılda nörodejeneratif hastalıklar, omurilik ve beyin hasarları, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve iskelet hastalıkları gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılması ile ilgili çalışmalar yapılmış ve bu çalışmaların çoğunda bu hücrelerin iyileştirici etkisinin olduğu kanıtlanmıştır. Bu iyileştirici özelliğinin yanı sıra immün sistem tarafından ret yanıt oluşturmaması da hem otolog hem de allojenik transplantasyonlar için oldukça avantaj sağlar niteliktedir. Bu sebepler dolayısıyla her geçen gün MKH'lerin bilimsel ve klinik araştırmalarda kullanımları artmaktadır (Gnecchi 2016).

MKH'lerin, mezenkim dokusundan köken alan hücre hatlarının birçoğuna farklılaşabilmeleri bu özel hücrelerin önemli bir diğer özellikleri olarak bilinmektedir. Fakat bu özelliklerini sergileyebilmelerinde buldukları nişin etkisi oldukça fazladır. Buldukları mikro çevre, bu hücrelerin farklılaşması ya da biyolojik herhangi bir aktivitesine yön vermesinde önemli rol oynar. Bunun için rejeneratif tıp alanında yapılan kök hücre uygulamalarında “**yapı iskelesi (scaffold)**” olarak isimlendirilen birçok farklı malzemeyle meydana getirilebilen materyaller mekanik olarak hem farklılaşmanın teşvik edilmesi hem de defekt olmuş dokunun bütünlüğünün sağlanması için günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır.

1.1.2.1. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma özellikleri

Rejeneratif tıp ya da doku mühendisliği çalışmalarında hücreler *in vivo* olarak uygulanmadan önce, o doku için gerekli hatları meydana getirebilecek olan hücrelerin *in vitro* ortamda farklılaştırılmaları istenebilir. Bu farklılaştırma işlemleri, hücrelerin besi ortamına çözünebilir bir takım faktörlerin ilave edilmesi, çeşitli mekanik yönlendiriciler, ekstraselüler matriksin fiziksel stimülasyonu ya da gen aktarımı gibi yöntemler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir.

Günümüzde genel olarak MKH'ler, laboratuvar koşullarında uygun bir takım çözünebilir faktörler ile 2-4 hafta boyunca muamele edilmesi vasıtasıyla osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmaya başarılı bir şekilde yönlendirilebilmektedir.

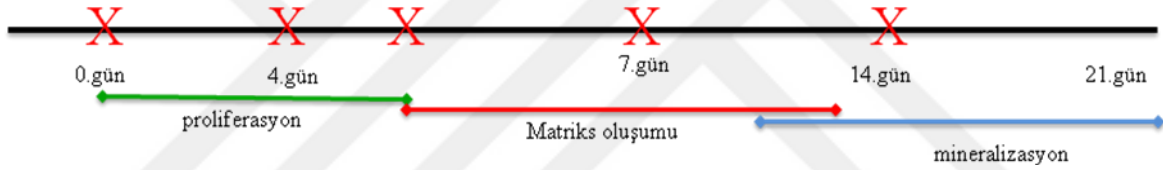
1.1.2.1.1. Osteojenik farklılaştırma

MKH'lerin osteojenik farklılaştırılmasında genel olarak, hücrelerin besi ortamı içerisinde 2 ila 3 hafta boyunca β -gliserofosfat, askorbik asit ve deksametazon ilave edilerek kimyasal indüklemenin yapıldığı yöntem kullanılmaktadır. Genel olarak, hücrenin proliferasyonu, matriks oluşumu ve mineralizasyon oluşumunun meydana geldiği birbirini izleyen ve keskin sınırlar ile ayrılması oldukça güç olan üç evre sonunda farklılaşma işlemi gerçekleşir (Çizim 1.2). Bu sürenin özellikle sonlarına doğru hücrelerde giderek artan osteoblastik fenotip ile ilgili olan genlerin ekspresyonu ve proteinlerin ifade edilmesi ile (osteopontin, katepsin K ve kemik siyaloprotein gibi) osteoblastlara benzer bir

morfoloji elde edilebilir. Bunun ardından kemik dokusuna özgü olan hidroksi-1-apetitin birikmesiyle ekstraselüler matriks zenginleşmeye başlar.

Bununla beraber BMP'ler MKH'lerde osteogenezi oldukça güçlü bir şekilde desteklerler. Bunlar, temel osteogenik genlerden olan Runx2'nin asetilasyonu indükler (Kolf ve diğ. 2007). Bununla beraber BMP'ler osteoblast farklılaşmasında ve proliferasyonunda hatta postnatal dönemde kemik oluşum ve yeniden modellenmesinde rol alan temel bileşenlerdendir.

Osteojenik farklılaşmaya yönlendirilmiş olan MKH'lerde, farklılaşmanın derecesi mineralize olmuş matriksi boyayan Von Kossa veya Alizarin Red S gibi histolojik boyalar kullanılarak ya da matriks oluşumu esnasında meydana gelen Alkalen fosfatın miktarını saptayan kolorimetrik çeşitli yöntemler kullanılarak belirlenebilmektedir.



Çizim 1.2 MKH'lerin *in vitro* ortamda osteojenik farklılaşmasının evreleri (Kulterer ve diğ. 2007)

iKİ-MKH'lerin osteojenik farklılaşmaya yönlendirilmesi işlemi genel olarak 21 gün sürdürülmektedir. Çizim 1.2'de gözlemlendiği üzere osteojenik farklılaşma süreci üç evrede meydana gelmektedir. Hücreler bu evrelerin her birinde farklı işlevleri yerine getirmektedir. Proliferasyon aşamasında sayısını arttıran hücreler, matriks oluşumu aşamasında ise kemik dokunun en önemli elemanlarından olan Alkalen Fosfaz ve Kollajen I sentezini arttırmaya başlarlar. Mineralizasyon aşamasında ise ALP aktivitesi düşerken osteokalsin protein sentezi artmaya başlar.

1.1.2.1.2. Adipojenik farklılaştırma

MKH'ler adipojenik farklılaşmaya yönlendirilirken, bu hücreleri beslemek için kullanılan bazal kültür ortamına deksametazon, insülin, isobutil metil ksantin ve indometazin eklentileri ilave edilerek yaklaşık olarak 3 hafta boyunca inkübe edilirler. Farklılaşma esnasında hücrelerde peroksizom proliferatör-aktivatör reseptör γ (PPAR- γ), glukoz taşıyıcı tip 4, adipoz farklılaşmaya-ilişkin protein ve gliserol-3-fosfat dehidrogenaz gibi genlerin ekspresyonu başlar ve ardından sitoplazmalarında lipid vakuolleri birikmeye başlar. Bu yönde bir farklılaşma ise Oil Red O boyası kullanılarak saptanabilir.

1.1.2.1.3. Kondrojenik farklılaştırma

MKH'ler hücre kültür koşullarında adipojenik ve osteojenik farklılaştırmada uygulanan yapışık kültür tekniği değil farklı olarak pelet haline getirilmiş hücre tekniği kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Kullanılan besi ortamında farklılaşmayı indüklemesi adına İnsülin-Transferin-Selenyum (ITS) eklentisi, deksametazon, askorbat-2-fosfat, sodum pruvat ve dönüştürücü büyüme hormonu- β (TGF- β) ile 2-3 hafta boyunca hücreleri muamele edecek şekilde kullanılmaktadır (Solchaga ve diğ. 2011).

MKH'ler kondrojenik farklılaşmaya yönlendirildiğinde, özellikle kollajen II, X ve proteoglikan agrekanlarından oluşan bir ekstraselüler matriks oluştururlar. Bu farklılaşmanın tespiti ise Alcian Blue boyamasıyla gerçekleştirilebilir. MKH'ların osteojenik, adipojenik ve de kondrojenik farklılaşmaları aynı zamanda osteosit, adiposit ve kondrositler tarafından eksprese edilen bazı özel genler esas alınarak bu genlerin ekspresyon seviyeleri tespit edilebilir (Gnecchi 2016).

Hücrelerin çevrelerinden aldıkları çeşitli mekanik, fiziksel ya da kimyasal uyarılar, sitoplazmadaki çeşitli proteinlerin fosforillenmesi ile bir takım hücre içi sinyal yollarının aktif hale gelmesini tetikleyebilmektedir. Ardından alınan sinyalin hücre çekirdeğine ulaştırılması sonucunda bazı genlerin ifadelerinin artması bazılarının ise azalması sonucunda farklılaşma meydana gelebilmektedir. Bu bağlamda hücre içi sinyal yollarının incelenmesi kök hücre farklılaşması çalışmalarının bir parçası haline gelmiştir.

1.1.3. Hücre Sinyal Yolakları

Hücreler buldukları ortamdaki birçok faktörden etkilenir ve buna karşılık bir yanıt oluştururlar. Hücresel sinyal ya da sinyal transdüksiyonu olarak da nitelendirilen bu olay aslında sadece hücrenin değil, bir canlının meydana gelişinden o canlıdaki organizasyonlara dek birçok önemli hususta doğrudan ya da dolaylı olarak etki etmektedir. Hücrelerin belirli bir uyarıyı alması, hücre içine bu sinyallerin çekirdeğe iletilmesi ve bir cevap oluşturulması sürecindeki faktörler, günümüzde araştırılmaya devam etmektedir. Bu moleküller ve etkileşimlerinin tanımlanmasıyla tam olarak işlevleri anlaşılammış birçok yolak ortaya çıkartılmıştır. TGF- β /BMP, Wnt/Wg, Hedgehog (Hg), Notch, Mitojenle-aktif edilmiş protein kinazlar (MAPK) ve diğer hücre içi sinyal yolakları; embriyonik gelişim aşamalarından itibaren kök hücre havuzunun belirli bir miktarda muhafaza edilmesinde ve embriyonik tabakaların her üç soyunda orantılı bir şekilde büyümesine, vücudun şekillenmesi, hücrelerin geleceğinin tespiti, organogenez vb. gibi oldukça önemli işlevleri yerine getirmektedirler (Bhaskar ve diğ. 2014)

1.1.3.1. Mitojenle Aktive-edilmiş Protein Kinazlar (MAPK)

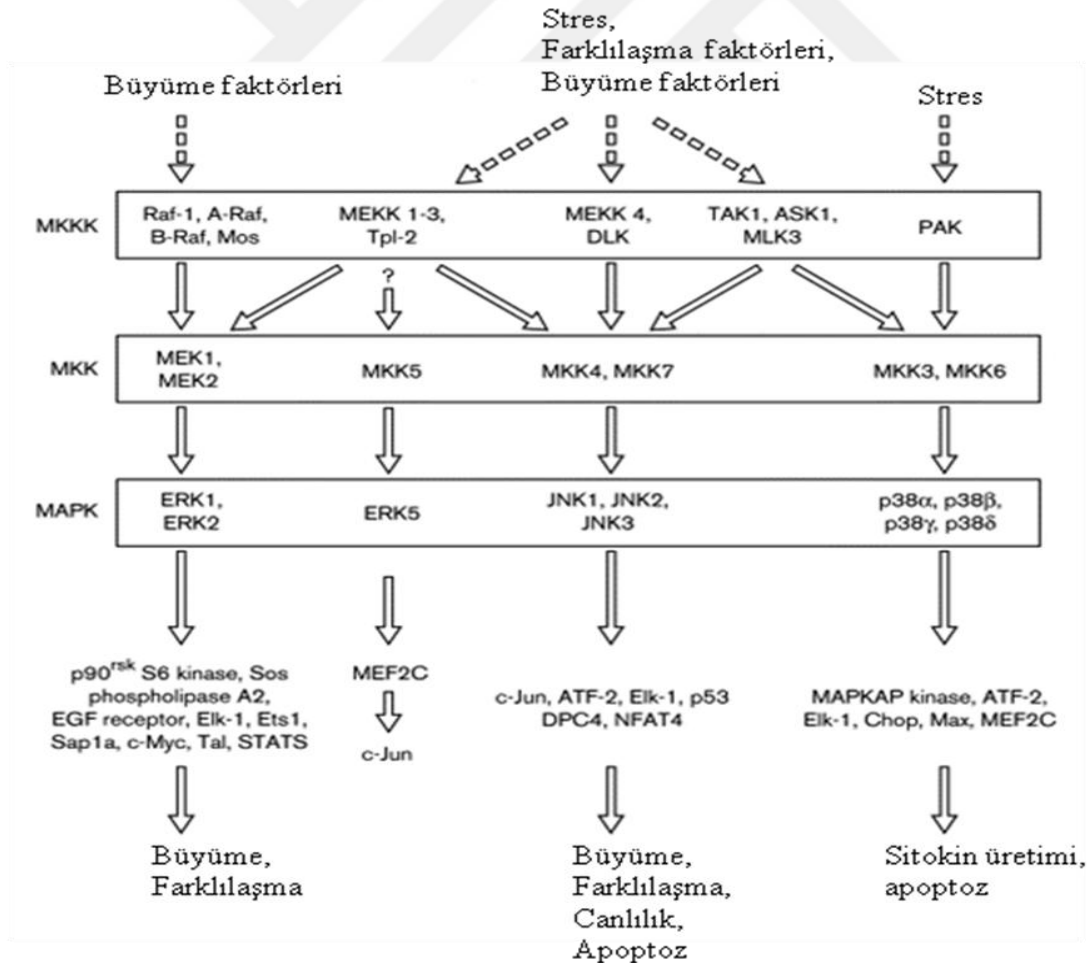
Kinazlar, memelilerdeki en büyük enzim ailesi olarak bilinmektedir (Rosenblum ve diğ. 2013). Bu enzimler, hücrelerin reseptörleri tarafından alınan çeşitli kimyasal, mekanik ya da strese bağımlı uyarıların ardışık bir dizi halinde hücre çekirdeğine aktarılmasının düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Protein kinazlar da bu büyük enzim ailesinin bir üyesidir (Shchemelinin ve diğ. 2006)

Serin-Treonin protein kinazlardan olan Mitojenle aktive-edilmiş protein kinazlar (MAPK), hücre dışı uyarılara karşı birçok farklı hücresel yanıtların verilmesini sağlayan proteinlerdir. Neredeyse bütün ökaryotlarda gen ifadesinin, mitozun, metabolizmanın, hareketlilik/migrasyonun, canlılığın, apoptozun ve farklılaşma gibi birçok fizyolojik olayların düzenlenmesinde çeşitli MAPK sinyal yolakları rol oynamaktadır. Memelilerde bilinen klasik on farklı MAPK proteini ve bunların ayrılmış oldukları dört farklı MAPK sinyal yolağı grubu bulunmaktadır (Plotnikov ve diğ. 2011). Bunların haricinde daha az bilinmeleriyle beraber ERK3/4, ERK7 ve Nemo-benzeri kinazlar (NLK) da diğer MAPK sinyal yolağı üyelerindedir.

MAPK sinyal yolağı Çizelge 1.2'de de gösterilmiş olduğu gibi, MAPK Kinaz Kinaz, MAPK Kinaz ve MAPK olmak üzere üç ana modülden oluşmaktadır. Hücre

zarındaki reseptörler vasıtasıyla stres, büyüme ya da farklılaşma faktörlerinden alınan sinyallerin Ras/Rho ailesi ile küçük GTP-bağımlı proteinin etkileşimleri sonucu meydana gelen fosforilasyon sayesinde bir Serin/Treonin kinaz olan MAPKKK'lar aktifleşirler. Aktive olan MAPKKK'lar, bir ya da birden fazla sayıdaki MAPKK'ı etkileyebilirler. Aktive olan MAPKK'lar ise Treonin ve Tirozinin her ikisinin birlikte fosforile olarak sadece bir MAPK'ın aktivasyon bölgesine lokalize olması ile MAPK'ı aktive ederler. Aktif hale gelen MAPK'lar ise transkripsiyon faktörleri, diğer kinazlar ya da çeşitli regülatör enzimlerini fosforile edebilirler. Hücre çekirdeğine gelen, bu dizi halindeki sinyal iletimi sonucunda büyüme, farklılaşma, apoptoz gibi hücresel cevapların meydana geldiği gösterilmiştir (Plotnikov ve diğ. 2011, Garrington ve Johnson 1999).

Çizelge 1.2 MAPK sinyal yolağı. Garrington ve Johnson (1999) 'den alınmıştır.



1.1.3.1.1. Erk1/2 sinyal kaskatı(zinciri)

1900'lü yılların ortalarında Serger ve Krebs tarafından ilk olarak tanımlanmış olan Erk1/2 kaskatı, MAPK sinyal yolağının temsilcisi olarak nitelendirilmiştir (Plotnikov ve diğ. 2011). Erk1 ve Erk2, Ras-Raf-MEK-ERK sinyal transdüksiyonu kaskatını meydana getiren Serin-Treonin kinazlardandır. Bu kaskat, hücre adezyonu, hücre döngüsü, hücrenin hayatta kalması, farklılaşması, proliferasyonu ve çeşitli genlerin transkripsiyonunu gibi birçok hücresel işlevlerin düzenlenmesini sağlamakta ve özellikle beyin, kalp, iskelet kası ve timusda yüksek seviyelerde olmak üzere, vücudun tüm dokularında ifade edilmektedir (Roskoski 2012, Plotnikov ve diğ. 2011).

Hücrenin reseptörleri vasıtasıyla çeşitli büyüme faktörleri, insülin, sitokinler ve ozmotik stres gibi birçok dış etken tarafından aktif hale gelebilmektedir. Bu uyarıları alan reseptörler tarafından öncelikle küçük GTPaz olarak da isimlendirilen Ras'ın aktivasyonunu sağlar. GTP ile aktif hale gelmiş olan Ras, homodimer ve heterodimer formları olan Raf'ların fosforilasyonunu indükler. Bu aşamadan sonra Ras'lara göre daha spesifik substratlara bağlanan Raf'lar MEK1 ve MEK2'nin fosforilasyonunu ve aktivasyonunu katalizler. Çift-özgüllüğü olan MEK1 ve MEK2 ise bilinen fizyolojik substratlarından Erk1 ve Erk2'nin Tirozin ve Treonin fosforilasyonuna aracılık eder. Son olarak iletilen bu sinyaller, sitoplazma içerisinde yer alan çeşitli substratlar ve MAPK-aktive protein kinaz elemanları tarafından çekirdeğe ya da hücresel organellere aktarılır. Böylece hücre, almış olduğu sinyale karşılık olarak çeşitli genlerin transkripsiyonu ile hücresel bir cevap meydana getirir. Bunun sonucunda hücrede çoğalma, farklılaşma, hücresel sağ kalım gibi fiziksel bir takım cevaplar meydana gelebilmektedir (Plotnikov ve diğ. 2011).

Yapılan pek çok araştırma Erk1 ve Erk2'nin gelişimsel dönemden itibaren morfolojinin belirlenmesinden nöronal gelişime kadar pek çok önemli hususta rol aldığını göstermiştir. Fakat bunların dışında, bir onkogen ailesi üyesi olan Ras'ın çok fazla fosforile olması yani normalden daha fazla aktif olması, çeşitli kanser oluşumlarına neden olabilmektedir. Buna ilaveten, Ras-Raf-MEK-ERK sinyal kaskatının düzensiz çalışması beyin hasarı, kalp hipertrofisi, diyabet gibi çeşitli hastalıkların meydana gelmesine de neden olmaktadır (Roskoski, 2012).

1.1.3.1.2. Erk5 sinyal kaskatı

Erk5, MAPK sinyal yolları arasında nispeten daha az çalışılmış ve anlaşılması olan sinyal kaskatıdır. Buna karşın English ve ark.(1995), Lee ve ark. (1995) ve de Zhou ve ark.(1995) oluşan birbirinden bağımsız üç farklı grup tarafından tanımlanmıştır.

Erk5 özellikle beyin, timus ve dalakta daha yüksek olmak üzere tüm dokularda farklı düzeylerde eksprese olmaktadır. Özellikle erken embriyonik gelişim ve vasküler sistemin normal gelişimi için ve bunun yanı sıra hücre sağ kalımı için başlıca rol oynayan bir yolak olduğu ifade edilmiştir (Yan ve diğ. 2003). Bu durum ise bilim insanlarının oldukça ilgisini çekmiş ve Erk5'ler üzerinde daha fazla çalışma yapmaya yönlendirmiştir.

Çeşitli büyüme faktörleri, serum, oksidatif stres ve mitojenlere yanıt olarak Erk5'in aktivasyonu meydana gelebilmektedir. Bu sinyal iletimi ise sırasıyla MEK2/3-MEK5-Erk5 şeklinde gerçekleşmektedir. Lad gibi adaptör proteinler vasıtasıyla birbirinin homologu olan MEK2/MEK3'ün aktivasyonu gerçekleşir. MEK5'in amin ucundaki Bem1p alanı ise MEK2/MEK3'ün bağlanmasını sağlar (Drew ve diğ. 2011). Aktif hale gelen MEK5 ise Erk5'in aktivasyon alanında yer alan Treonin-Glutamik asit-Tirozin motifi içindeki Treonin ve Tirozine bağlanarak fosforilasyonu gerçekleşir. Daha sonra hücre çekirdeğine sinyal aktarımı ve buna bağlı olarak gerekli hücresel cevabın meydana gelişini gerçekleştirir.

Erk5, yapısal olarak diğer MAPK üyelerinden farklılıklar göstermektedir. Erk5'in karboksil terminal ucu diğer kinazlara göre çok daha büyüktür. Bu sayede diğerlerinden farklı olarak oto-inhibisyon özelliği göstermektedir (Drew ve diğ. 2011).

1.1.3.1.3. JNK sinyal kaskatı

c-Jun N-terminal kinazlar ya da stresle-aktive olan protein kinazlar (JNK/SAPK) olarak da isimlendirilen sinyal yolağıdır. Üç farklı gen tarafından ifade edilen JNK'lardan JNK1 ve JNK2 neredeyse tüm dokularda eksprese edilirken, JNK3 beyin, kalp ve testis gibi sınırlı sayıda dokularda eksprese edilmektedir (Bradshaw ve Dennis, 2009)

Diğer MAPK sinyal yolağı elemanlarına benzer şekilde JNK'lar da birçok çevresel faktör karşısında aktivite gösterirler. Özellikle ışık-şok, radyasyon, oksidatif stres, DNA-hasar verici çeşitli ajanlar, sitokinler, UV ve çeşitli büyüme faktörleri gibi etkenler JNK'yi güçlü bir şekilde aktif hale getirir (Cargnello ve Roux, 2011). Bu stres ve diğer

stimulatörler, sinyalin CDC42 ve Rac1 gibi küçük GTPazlar tarafından MAP3K seviyesinde aktivasyonu meydana getirir veya MAP3K'lar ve MAP4K'lar adaptör proteinlerle etkileşim ile doğrudan aktive olabilmektedir. Meydana gelen bu aktivasyonla MAP3K tabakasındaki kinazların aktivasyon bölgelerindeki Treonin ve Serin gruplarının fosforilasyonu vasıtasıyla bir ileri aşama olan MAPKK (MKK4 ve MKK7) aşamasındaki aktivasyon gerçekleşmiş olur. Bu kinazlar ise MAPK tabakasinda yer alan JNK1, -2 ve -3'ün aktivasyon bölgelerindeki Treonin ve Tirozin amino asitlerinin direk fosforilasyonu ile uyarılması gerçekleşir. Aktif hale gelen JNK'lar ise sitoplazmada ve özellikle çoğunluğu çekirdekte olan birçok substratını fosforile ederek sinyal iletimini gerçekleştirir. Buna bağlı olarak JNK sinyal yolağının aktivasyonu, hücrede çeşitli genlerin transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi ve dahası apoptoz, immünolojik etkiler, nöronal aktivite, insülin sinyali ve bunun gibi birçok hücreyel işlevlerin gerçekleşmesine aracılık etmektedir (Plotnikov ve diğ. 2011). Bu yolda meydana gelen düzensizliklere Alzheimer, Pankinson ve ALS gibi nörodejeneratif hastalıklarda ya da diyabet, inflamasyon ve birçok kanser türünde rastlanmaktadır.

1.1.3.1.4. p38 sinyal kaskadı

İlk olarak 1900'lü yılların ortalarında eşzamanlı olarak üç farklı grup tarafından daha çok stres uyaranlarına, interlökin-1, UV ve ısı şoku gibi faktörler karşısında aktive olması ile tanımlanmış kinazlardır (Han ve diğ.1994, Lee ve diğ. 1994, Rouse ve diğ. 1994). Daha sonradan yapılan çalışmalar sonucunda p38'in α , β , δ ve γ olmak üzere dört farklı izoformunu tanımlanmıştır. Bunlardan p38 α neredeyse tüm dokularda yüksek ekspresyon olurken, diğer izoformları çok daha spesifik dokularda, örneğin; p38 β beyin, p38 γ iskelet kası ve p38 δ ise endokrin bezlerde ekspresyon edilmektedir (Cuadrado ve Nebreda, 2010).

Çeşitli çevresel koşullar ve stres faktörleri sonucunda hücrenin reseptöründe meydana gelen uyarı adaptör proteinler, küçük GTPaz'lar, MAP4K ve MAP3K'lar aracılığıyla aktarılır. Kaskadın MAP3K katmanındaki bir ya da birden fazla eleman MAP2K katmanındaki çoğunlukla MKK3 ve MKK6, bazı durumlarda ise MKK4'ün de içinde bulunduğu elemanların fosforilasyonunu ve böylece sinyalin iletilmesini indükler. Bu aşamada sinyal p38'in 4 izoformuna ulaşır ve kaskadın MAPK katmanındaki uygun izoform yapısıyla birleşerek birkaç fonksiyonel alternatif meydana getirirler. Bu yapılar ise aktivasyon bölgelerindeki Treonin-Glutamik asit-Tirozin alanı içindeki Treonin ve

Tirozinin fosforilasyonu sonucunda aktive olurlar. Bunun dışında p38'ler MAPKK'dan bağımsız bir şekilde otofosforilasyon ile aktive olabilirler.

p38 kinazlar strese karşı hücrel cevabın oluşturulması dışında, immünolojik etkilerin, hücrel yaşlanmanın, hücre siklusunun kontrol edilmesi ve hücre canlılığı dahil olmak üzere pek çok hücrel aktivitenin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. Özellikle p38'ler diğer MAPK'lardan farklı olarak apoptozu indükleyerek tümör baskılayıcı aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. İstisna vakalarda olsa da hücre siklusunun düzenlenmesi görevinden dolayı kanserin yayılmasını indüklediği de gözlemlenmiştir (Plotnikov ve diğ. 2011).

1.2.Mantarlar

Canlılar âleminde biri olan funguslar, oldukça farklı özelliklere sahip bir gruptur. Kendi içlerinde yaşam döngüleri, şekilleri ve etkileri bakımından oldukça çeşitlilik göstermektedirler. Alexopoulos ve Mims 1979'da mantarları; “ökaryotik, spor taşıyan, klorofilleri bulunmayan, eşeyli ve eşeysiz çoğalan, filamentli, dallanmış ya da somatik yapılarını oluşturan hücrelerinde kitin, selüloz ve diğer çeşitli kompleks karbonhidratları da içeren canlı grubudur.” şeklinde tanımlamışlardır (Mehrotra ve Aneja, 1990).

Mantarlar genel hatlarıyla makro ve mikrofunguslar olarak ayrılabilir. Makromantarlar çıplak göz ile görülebilen büyük yapılı mantarlarken, mikromantarlar ise genel olarak mikroskop ile gözlemlenebilen küçük mantarlardır. Makromantarlar yüzyıllar öncesinden beri bilim insanları tarafından şekilleri dikkate alınarak sınıflandırılmaya çalışılmıştır. Bilimin ve teknolojinin ilerlemesiyle beraber günümüzde spor yapıları, hücre/hif yapıları, şapka görüntüleri gibi çok daha kapsamlı bir özellik ayrımı yapılarak sınıflandırılmaktadır.

1.2.1. *Pleurotus ostreatus*

Çok eski zamanlardan günümüze dek mantarlar, rengi, görüntüsü, kokusu ve tadı ile insanların beslenmesinde önemli rol oynamıştır. Dünya üzerinde artan insan nüfusu ve kısıtlı kaynaklar, insanların tarım ve hayvancılıkta olduğu gibi mantar kültürü yapılmasına dair ilgilerini gün geçtikçe arttırmıştır. Bu kapsamda dünyada en çok kültürü yapılan mantar, *Agaricus bisporus* yani halk arasında bilinen yaygın ismi ile “kültür mantarı”dır.

Bu mantardan sonra en çok kültürü yapılan mantar ise ülkemizde istiridye, kavak ya da kayın mantarı olarak da bilinen *Pleurotus ostreatus* cinsi mantardır.

Pleurotus cinsi mantarlar en son verilere göre yaklaşık olarak 200 farklı türü tanımlanmış, dünyada doğal olarak tropikal ve subtropikal bölgelerde genel olarak çürümüş ağaç gövdelerinde yetişmektedir (Roskov ve diğ. 2018), (Doğan ve diğ. 2014). Yüzlerce türü arasında en çok bilineni ve insanlar tarafından en yaygın kültürü yapılanı *P. ostreatus*'tur (Pekşen 2013).

Doğu Asya ülkelerinde çok eski zamanlardan beri hastalıkların tedavisinde mantarların medikal özelliklerinden faydalanılmaktadır. Son dönemlerde bilim ve teknolojinin gelişmesi ile beraber ve insanların doğal tedavi yöntemlerine karşı eğilimleri artması ile beraber mantarların medikal özellikleri ile ilgili çalışmalar hızla artmaya başlamıştır. Bu kapsamda *P.ostreatus* ile ilgili hücre kültürü çalışmaları ve canlı hayvan üzerindeki çalışmalar oldukça önemli sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. *P. ostreatus* kanser önlemeden, kolesterol düşürmeye kadar birçok önemli hastalığın tedavisine etkin rol oynamaktadır (Çizelge 1.3) (Deepalakshmi ve Mirunalini 2014).

P.ostreatus, besleyici unsurlar açısından neredeyse et ve baklagillere yakın protein ihtiva etmektedir. Bu nedenle Avrupa'da ve birçok ülkede et yerine tüketilmektedir (Pekşen 2013). Dahası içeriğindeki aminoasitler, yetişkin bir bireyin ihtiyacı olan aminoasit miktarını karşılayabilecek düzeyde olduğu belirtilmiştir (Doğan ve diğ. 2014). Ayrıca *P.ostreatus* Kalsiyum, Fosfor, Demir ve hatta C, B₁, B₂, D₂ vitaminleri içermesi bakımından oldukça zengin bir besin kaynağıdır. Bununla beraber kitin, hemiselüloz, β - ve α - gluklanlar, mananlar, ksilanlar ve galaktanlardan oluşan zengin bir karbonhidrat yapısına sahiptir.

Çizelge 1.3 *P.ostreatus*'un medikal etkileri ve etken maddeleri

Farmakolojik Etki	Madde	Kaynaklar
Antikanser	Suda çözünür protein ya da polisakkaritler	Jedinak ve diğ. (2010) Wu ve diğ. (2011) De Silva ve diğ. (2012)
Antioksidan	β -D Glukan (Pleuran) Lektin	Bokek ve Galbavy (2001) Wang ve Ng (2000) Zhang ve diğ. (2012) Mitra ve diğ. (2012)
Antitümör	β -D Glukan (Pleuran) Glikopeptidler Proteoglikanlar	Bokek ve Galbavy (2001) Li ve diğ. (1994) Sarangi ve diğ. (2006) Silva ve diğ. (2012) Devi ve diğ. (2013)
Antiviral	Ubikuitin-benzeri proteinler	Wang ve Ng (2000) Ei-Fakharany ve diğ.(2010)
Antibakteriyel	β -D Glukan (Pleuran)	Karacsonyi ve Kuniak (1994) Mirunalini ve diğ. (2012) Vamanu ve diğ. (2012)
Antidiyabetik	Spesifik olmayan biyoaktifler	Krishna ve Usha (2009) Ghaly ve diğ. (2011) Bindhuravi ve diğ. (2013)
Anti-hiperkolesterolik	Lovastatin	Bobek ve ark. (1995) Weng ve diğ. (2010)
Göz sağlığı	Spesifik olmayan biyoaktifler	Isai ve diğ. (2009)
Antiartritik	β -(1,3/1,6)D-Glukan	Bauerova ve diğ. (2009)

1.2.1.1. Fungal glukanlar

Glukanlar, doğada en yaygın şekilde bulunan polisakkaritlerdir (Choromanska ve ark. 2017). Glukanlar, birden fazla glikoz monomerinin birbirlerine glikozidik bağlar ile bağlanması sonucu meydana gelmiş olan polisakkaritlerdir. Bulunduğu canlıya yani kaynağa göre moleküler ağırlıklarından biçimlerine ya da uzunluklarına dek birçok farklılıklar sergilerler. Dahası glikoz birimlerinin anomerik yapısına göre lineer ya da dallanmış bir görüntüye sahip olabilirler.

1.2.1.1.1. Alfa glukanlar

Alfa glukanlar, çoğu topuzlu mantarlarının (basidiomycetes) ve askılı mantarlarının (ascomycetous) hücre duvarı elemanlarından biridir. Bir polisakkarit olan alfa glukan, hücre duvar matrisinin en dışındaki ilk tabakayı düzensiz mikrofibrilli ve kalın yapısı ile oluşturur. Bir transmembran proteini olan alfa-glukan sentazın aktivitesiyle beraber glikoz monomerlerinin α -glikozidik bağlar ile bağlanmasını katalizler. Alfa-glukanların bağ yapısı 1,3; 1,4; 1,6 gibi değişiklikler gösterebilmektedir. Ayrıca hücre duvarındaki miktarı beta-glukanlara kıyasla oldukça düşüktür (Takagi ve Kitagaki 2015).

İmmünmodulasyon, anti-inflamatuvar ya da anti-tümör etkiler ile ilgili yapılan çalışmalarda genel olarak β -glukanlar üzerinde yoğunlaşmış olsa da α -glukanlar ile de benzer çalışmalar yapılmış ve miktarları az olsa da şitake ve *P.ostreatus*'dan izole edilen çözünebilir alfa glukanların da benzer biyolojik etkilere sahip oldukları çeşitli çalışmalarda gözlemlenebilmiştir (Avni ve diğ. 2017). Çeşitli kimyasal yöntemler kullanılarak suda çözünür ya da suda çözünebilir formları elde edilecek şekilde izolasyonu gerçekleştirilebilir.

1.2.1.1.2. Beta glukanlar

β -Glukanlar, birçok mantarın hücre duvarı iskeletinde bulunan önemli elemanlardan biridir. Glikoz monomerlerinin β -glikozidik bağlar ile bağlanması sonucu oluşurlar. 1,3/1,6 β - glukanlar ise, glukoz monomerlerinin β -1,3 bağlar ile zincir oluşturması ve bu zincirlere glukoz monomerlerinin β -1,6 bağlantılar ile bağlanarak dallanmalar oluşturması sonucu meydana gelmektedir (Takagi ve Kitagaki 2015).

Beta-glukanlar bakterilerden, ağaçlara, tohumlardan mantarlara dek birçok canlıda bulunabilmektedir. Dahası bulunduğu canlıya göre zincir uzunluğu, dallanma sayısı oldukça çeşitlilik göstermektedir. Bulduğu canlıya göre fonksiyonları da değişen bu polisakkaritlerden özellikle β -1,3 ve -1,6 glukanlar hücre duvarının mekanik olarak sertlik ve bütünlük kazanmasına yardımcı olurlar (Takagi ve Kitagaki 2015).

Canlılar gibi canlıyı oluşturan hücreler de sürekli çevreleriyle bir iletişim halindedirler ve dış ortamdaki birçok faktörü algılayıp genetik bilgisi dahilinde buna karşı bir cevap oluştururlar. Yapılan araştırmalar hücrelerin β -glukanlar ile de etkileşim halinde olduğunu göstermiştir (Dalonso ve diğ. 2015). Yaklaşık 25 yıl önce bir β -glukan reseptörü olarak komplement reseptör 3 (CR3) tanımlanmıştır. Daha sonra ise dektin-1, langerin, laktozilseramid, çöpçü reseptörler (scavenger), CD5, CD36 gibi diğer β -glukan reseptörleri tespit edilmiştir. Bu reseptörler vasıtasıyla hücrede oldukça önemli hücresel aktiviteler meydana gelmektedir. Örneğin, β -glukanların laktozil seramidlere bağlanması sonucunda hücrede birçok aktivitenin düzenlenmesinde etkin bir rol oynayan MAPK sinyal yolağında fosforilasyon meydana geldiği belirtilmektedir (Vetvicka ve Novak 2011)

β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4), (1 \rightarrow 6) glukanların çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanıldığında faydalı olduğu gözlemlenmesi sonucunda, günümüzde ilaç olarak ya da bazı gıdalarda ilave besin maddesi olarak kullanılması söz konusu olmuştur.

P.ostreatus'un meyve kısmındaki misellerin duvarında yer alan β -glukanlar bilimsel literatürde “pleuran” ismi ile bilinmektedir. Pleuran yapı olarak topuzlu mantarlarının (basidiomycetes) ve askılı mantarlarının (ascomycetous) yapısında bulunan β -glukanlar ile benzerlik gösterir. Ancak yine depleuranın çözünebilirlik özelliği su ve alkali ortamda çözünen β -glukanlardan açık bir şekilde farklılık göstermektedir. Zira pleuranın alkali ortamda çözünmediği Karacsonyi ve Kuniak (1994) tarafından belirlenmiştir.

Pleuranın terapötik aktiviteleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, Yoshioka ve diğ. (1985) oldukça yüksek antitümör özelliklere sahip olduğunu; Bobek ve diğ. (2001) enflamatuvar ataklara karşı kolon duvarının antioksidan savunmasını artırdığını; Paulik ve ark. Farelerde gecikmiş-tip aşırı duyarlılığa yanıtı ve kan lökositlerinin fagositik aktivitelerini uyardığını gözlemlemişlerdir (Majtán ve diğ. 2009). Dahası, hidrojel, toz ya da destekleyici madde olarak birçok çalışmada kullanılmıştır. Çizelge 1.4'de terapötik olarak pleuranın kullanıldığı farklı çalışmalar gösterilmektedir (Andres ve Baumann 2014).

Çizelge 1.4 Pleuranın terapötik bileşen olarak kullanıldığı bazı çalışmalar

Uygulama	Hücre tipi / hastalık	<i>In vivo/ In vitro</i>	Sonuç	Referans
Anti Tümör	Sarkoma 180 kanser hücresi	Dişi fare	0.2 mg/kg dozda %95±3, 0.1 mg/kg dozda %74±10 inhibisyon oranı	Yoshioka ve diğ. (1985)
İmmünomodülasyon	Kolitler	Erkek sıçan	Kolonik hasar skoru ve kolonik ıslak ağırlıkta düşüş	Nosalova ve diğ. (2001)
Antioksidant savunma	Kolitler	Sıçanlar	Kolonik hasar skorunda düşüş	Bobek ve diğ. (2001)
Antioksidant	Kolondaki prekanseröz anormal kript odak (ACF) lezyonları	Erkek sıçanlar	ACF lezyonlarında >%50 küçülme	Bobek ve Galbavy (2001)
Prebiyotik	Lactobacillus ssp. Bifidobacterium sp. Enterococcus faecium	<i>in vitro</i>	Lactobacillus ssp.'nin probiyotik gelişimini destekler	Synytsya ve diğ. (2009)
Yoğun egzersiz sonrası immünomodülasyon	Kan hücreleri	İnsan	İmmün hücrelerinin baskılanmasını modüle etmer	Bobovcak ve diğ. (2010)
Keratinosit stimülasyonu	İnsan keratinosit primer kültürü	<i>in vitro</i>	Promatriks metalloproteinaz-9'da 2 ila 200 µg/ml oranında artış	Bobek ve diğ. (2001)

2. AMAÇ

Her geçen gün, artan bilimsel araştırmalar ve teknolojik gelişmeler insanların daha iyi şartlarda yaşamalarını sağlayabilmelerine olanak sağlamaktadır. Fakat buna rağmen doğuştan ya da bir takım çevresel etkiler sonucunda meydana gelen doku ya da organ kusurları insanların yaşam kalitelerini etkilemektedir. Kemik defektleri, kırıkları ya da rejeksiyonları sonucunda meydana gelen doku kaybı sonucunda kişiler bir takım işlevleri yerine getirme problemleri yaşayabilmektedirler. Dolayısıyla bunun için çeşitli tedaviler hala geliştirilmeye devam etmektedir.

Günümüzde özellikle doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında yapılan çalışmalar giderek artmaktadır. Bunun yanı sıra bu alanlarda kullanılacak olan hücreler hakkındaki bilgilerimizde gün geçtikçe artmaktadır. Yapılan bu çalışmada aslında eskiden beri bilinen ve farklı amaçlar için kullanılmış doğal bir polisakkarit olan β -glukanın biyomalzeme olarak kullanımı üzerinde durulmaktadır. Yapılan literatür taramalarında ilk olarak β -glukanların kemik iliği oluşumunu desteklediği (Lin ve diğ. 2004) ve kemik yapımını hızlandırdığı bilgilerine ulaşılmıştır (Martin ve diğ. 2006). Farklı bir kaynakta ise β -glukanın laktosil seramidlere bağlanmasıyla MAPK sinyal yolağının aktivasyonunu gerçekleştirdiği bulunmuştur (Vaclac ve Miroslav 2011) Ancak yapılan taramalarda, β -glukanlar ile MKH'lerin arasında olabilecek etkileşimler hakkında herhangi bir çalışmanın yapılmadığı görölmüştür.

Bu gerekçeler doğrultusunda yapılan bu çalışmada, β -glukanların iKI-MKH'lerin osteojenik farklılaşması üzerine olan etkileri ve bu etkinin MAPK sinyal yolağı üzerinden olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

3. YÖNTEM

3.1. Polisakkarit İzolasyonu

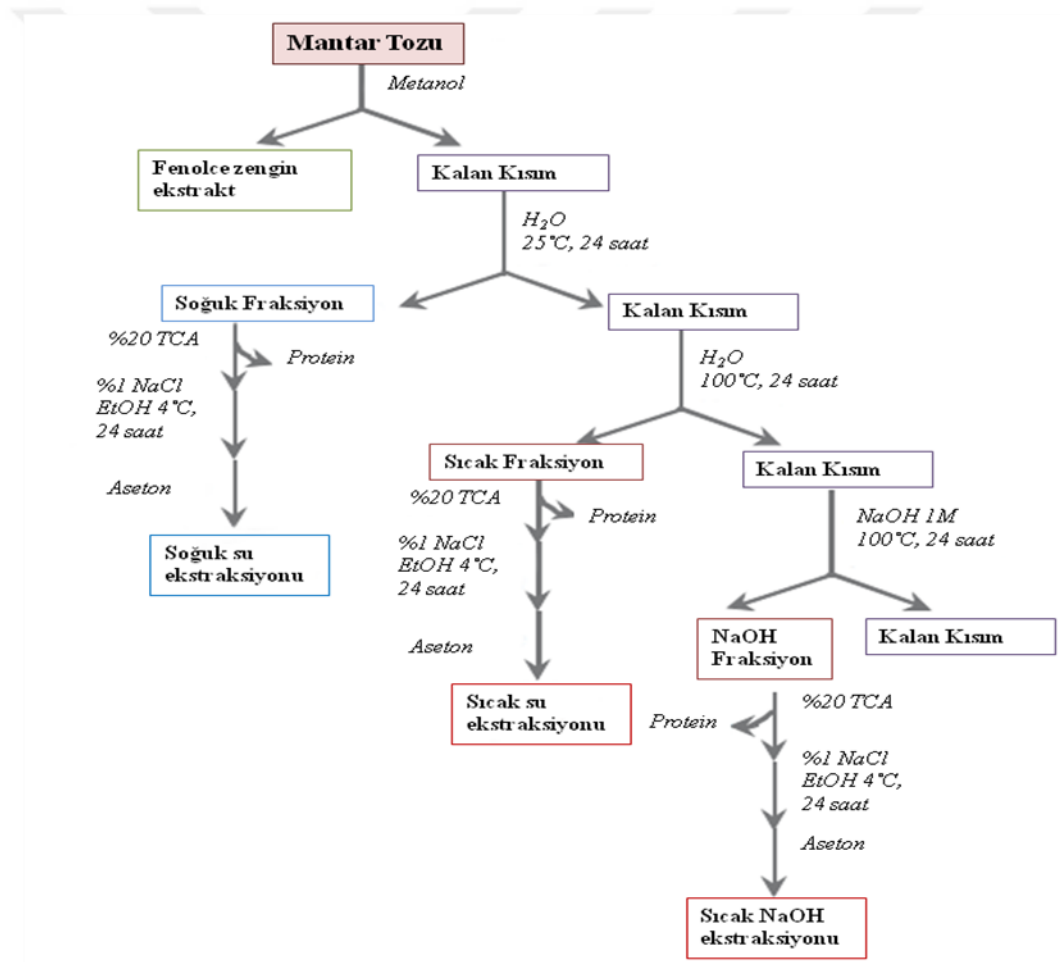
Yerel marketten 200 g'lık paketlerde satılan iki farklı markaya ait *Pleurotus ostreatus* türü mantar alınmış ve bu mantarlar laboratuvar ortamında distile su ile yıkayıp küçük parçalara ayrılarak +4°C'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra bu mantarlar bir öğütücü vasıtası ile çok daha küçük parçalara ayrılmış, öğütülmüş ve -20°C'de izolasyon işlemine dek muhafaza edilmiştir.

Bu aşamada Palacios ve diğ. (2012)'nin tanımlamış olduğu izolasyon yöntemi temel alınmıştır. Bu metoda göre öncelikli olarak öğütülmüş olan 200 g'lık mantarlar cam şişelere alınmış ve üzerine 400 ml saf metanol eklenmiştir. Metanol işlemiyle mantarların sterilizasyonu ve özsuynun uzaklaştırılması hedeflenmiştir. Ardından inkübatörde (FINEPCR combi-SV120) 100 rpm çevirme hızında, 60°C'de gece boyu bırakılmıştır. Ertesi gün şişeler çeker ocağa alınarak oda ısısına gelmesi beklenmiş ve sonra naylon meş (ağ) yardımı ile mantar parçacıkları süzülmüştür.

Bu aşama sonrasında 3 basamaklı ekstraksiyon işlemine başlanmıştır. İlk basamak soğuk fraksiyon, ikinci basamak sıcak fraksiyon ve son basamak NaOH fraksiyonu olarak adlandırılmıştır. Birinci basamaktan elde edilmiş mantar parçacıkları ayrı cam şişelere konularak üzerlerine 100ml soğuk distile eklendi. Bu şekilde 25°C'de gece boyu inkübe edilerek ertesi gün mantar fraksiyonları satrijüf (Eppendorf R5801, Mannheim, Almanya) için 50ml'lik falcon tüplere aktarıldı. Oda sıcaklığında 3800g devirde 20 dakika süresince çözünmeyen fraksiyon çöktürüldü. Santrifüj sonrası meydana gelen sıvı kısım soğuk fraksiyon sonucu elde etmiş olduğumuz α -galaktan'ı barındıran kısım olarak ayrıldı ve bu kısım +4°C'de muhafaza edildi. Geriye kalan katı kısım ile ekstraksiyon işlemine devam edildi. Ekstraksiyonun ikinci basamağı olan bu aşamada tekrar katı kısım cam şişelere koyuldu ve üzerlerine distile su ilave edildi. Ardından 100°C'lik fırında gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrası şişeler oda sıcaklığına gelmesi için beklendi ve şişe içerisinde bulunan mantar fraksiyonları santrifüj için 50 ml'lik falcon tüplere aktarıldı. Bu aşamada çöktürme işlemi 20 dk boyunca 3800g devirde tüpler çevrilerek tekrarlandı. Sıvı kısım başka tüplere naylon meş ile süzülerek aktarıldı. 6000g'de 5 dk boyunca santrifüj edildi ve sıvı kısım ayrıldı. α -glukan ihtiva etmesi hedeflenen bu sıvı kısım +4°C'de muhafaza

edildi. Kalan katı kısım üçüncü ve son basamakta cam şişelere aktarıldı ve üzerlerine 100 mL 2M NaOH ilave edildi. Ardından 100°C'lık fırında gece boyu inkübe edildi. Soğuyan şişelerden mantar fraksiyonları yine 50 ml'lik falcon tüplere aktarıldı ve yine 20 dk boyunca 3800g devirde tüpler çevrildi. Ardından sıvı kısım toplandı ve 40 µm'lik naylon meş ile süzülerek yeni bir falcon tüpe aktarıldı. Daha sonra tekrar 6000 g'de 5 dk çevirdi. Katı maddelerden tamamen uzaklaştırılmış β-glukan içeren sıvı kısım isimlendirilerek +4°C'da muhafaza edildi.

Çizelge 3.1 *P.ostreatus*'dan polisakkaritlerin izole edilmesi yöntemi ve basamakları.



Polisakkaritlerin izolasyonu işlemi için +4°C'de saklanan her bir ekstraksiyon sıvısı 2:1 oranında etanol ile karıştırıldı ve polisakkaritlerin çökmesi için ekstraksiyon sıvıları +4°C'da gece boyu bekletildi. Çökelme sağlandıktan sonra polisakkaritlerin dibine çökmesi için 8,000 g'de 30 dk santrifüj edildi. Ardından mantardan gelen kontaminantları içeren

sıvı kısım atılarak, dibe çökmüş olan katı kısım 10 mL distile su içinde çözündü. Proteinlerin uzaklaştırılması için üzerine %40'lık trikarboksilik asit (TCA) eklendi. Böylece son konsantrasyonu %20'lik 20 mL TCA içeren ekstraksiyon elde edilmiş oldu. Mantar ekstraktları gece boyu oda sıcaklığında bekletildi. Bu sırada ekstrakt içindeki proteinler TCA ile bağlanıp suda çözünmeyen tuzları oluşturarak dibe çökmesi sağlandı. Süre sonunda tüpler 8000g'de 30 dk santrifüj edildi ve sıvı kısım ile işlemlere devam edildi. Alınan ekstraksiyon sıvılarının üzerine %1 oranında NaCl, ardından ise 2:1 oranında etanol ilave edilerek +4°C'da gece boyu bekletildi. Polisakkaritlerin çöktürme işlemi sonrasında izole edebilmesi için 8000g'de 30 dk santrifüj işlemi yapıldı. Sıvı kısım atılarak polisakkaritlerin olduğu katı kısım üzerlerine 5mL saf aseton ilave edildi. Asetonun uçması ile kuru bir ekstrakt elde edildi. Bu katı ekstrakt bir metal çubuk vasıtası ile toz haline getirilerek aseton işlemi iki kez daha tekrar edildi. Son olarak katı mantar ekstraktları elde edilerek tartım işleminden (Aux120, Shimadzu, Tokyo, Japonya) sonra -20°C'da deney yapılana dek saklandı.

3.1.1. Karbonhidrat Miktarının Belirlenmesi

Fenol-Sülfürik asit metodu, bir örnekteki toplam karbonhidrat miktarının belirlenmesi için sıkça kullanılan ve en bilinen yöntemlerden biridir (Nielsen 2009). Bu çalışmada toz halindeki ekstraktların polisakkarit miktarı DuBois ve diğ. (1956) tanımlamış oldukları prosedür kullanılarak tespit edilmiştir. Bu yöntemde göre her bir örneğe ait polisakkarit solüsyonundan 2mL cam test tüplerine aktarıldı. Üzerlerine 0,05 mL %80'lik fenol ilave edildi. Ardından 5mL sülfürik asit hızlıca bu karışımın üzerine eklenerek karıştırıldı. Bu reaksiyon ekzotermik olduğu için oda ısısına gelmesi için yaklaşık 10 dk oda sıcaklığına bekletildi. Ardından tüpler 25-30°C'da 10-20 dk boyunca su banyosunda bekletildi. Süre bitiminde her bir örnekten 200 µL ve beş tekrarlı olacak şekilde örnekler 96 kuyucuklu kültür kaplarına aktarıldı. Spektrofotometrede 480 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçümü yapıldı. Bu deneyde kontrol olarak 2mL'de 0,01-0,02-0,03-0,001-0,002-0,003 g glikoz kullanılmıştır.

3.1.2. Glukan Miktarının Belirlenmesi

Yapılan çalışmada hem alfa glukanların, hem de 1,3:1,6 zincir yapısındaki beta glukanların miktarını tayin edebilmek için β-Glucan (Yeast & Mushroom) Assay Kit

(Megazyme, Belfast, İrlanda) kullanılmıştır. Test üretici firmanın belirtmiş olduğu protokol uygulanarak gerçekleştirilmiş, çıkan sonuçlar ise yine üretici firmanın belirtmiş olduğu formülasyon kullanılarak hesaplanmıştır. Temel olarak kit sıvı örneklerde çözümlenür glukan ve β -glukan miktarlarını ayrı basamaklarda miktarlarını belirlemektedir. Her basamakta kit içerisinde çıkan ve polisakkaride özgün enzimlerin reaksiyonu sonucunda renk değişimi gerçekleşmektedir. Spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçülerek standartta karşı glukan ve β -glukan miktarları belirlenmiştir. Fark alınarak α -glukan miktarı belirlenmiştir.

3.2. Kültür Kabı Yüzeyinin Kaplanması

İzole edilip -20°C 'da muhafaza edilen ekstrakt tozları hücre kültürü kabını kaplamak için sıcak su yöntemi ile elde edilen mantar ekstraktları 1:1 oranında %3'lük asetik asit içinde, sıcak NaOH yöntemi ile elde edilen mantar ekstraktı ise yine 1:1 oranında %3'lük asetik asit ve 20:1 oranında DMSO içinde çözdürülerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalayıcı üzerinde gece boyu bekletildi. Homojen bir karışım elde edildiğinde hücre kültürü yapılacak kabın (6, 12, 24, 96 well plate gibi) yüzeyini kaplayacak miktarda solüsyon kaplara eklendi. Laboratuvarında gerçekleştirilen önceki çalışmalar göz önüne alındığında 37°C 'da gece boyu inkübasyonun kaplama işlemi için uygun olduğu bilinmektedir. Kaplama miktarının ölçülmesi için de yine "Fenol-Sülfürik asit" deneyi yapılmıştır.

3.3. Polisakkaritlerin Hücre Kültürüne Uygunluğunun Ölçülmesi

3.3.1. Toksikite Deneyi

Mantardan izole edilen doğal polisakkaritlerin hücre kültüründe kullanımının uygunluğunun, hücrelerin canlılığı üzerine olumsuz etkilerinin olup olmadığının belirlenmesi için laktat dehidrogenaz (LDH) testi (Roche, Mannheim, Almanya) yapılmıştır. Bunun için yüzeyleri kaplanan 96 kuyucuklu kültür kapları üzerine MKH'ler normal besi ortamı kullanılarak ekilmiş ve 48 saat sonra ölçümler yapılmıştır. Kültür edilen hücrelerin her bir örneği için $50\mu\text{L}$ olacak şekilde besi ortamı çekildi ve deneyin yürütüleceği bir başka 96 kuyucuklu kültür kabına aktarıldı. Daha sonra her bir kuyucuğun üzerine hazırlanan reaksiyon çözeltisinden $50\mu\text{L}$ eklendi ve 37°C %5 CO_2 inkübatörde

20dk inkübe edildi. Süre sonunda 50µL “stop” çözültüsü eklenerek reaksiyon durduruldu. Sprektrofotometrede 490nm’de ölçüm yapılarak toksisite pozitif ve negatif kontrollere göre belirlendi.

3.3.2. Canlılık Deneyi (WST-1)

Aynı türe ait iki mantardan izole edilen alfa-glukan ve beta-glukan kaplanan 96 kuyucuklu kültür kapları üzerine MKH’ler DMEM-F12 %10 FBS %1 Pen-Strep’den oluşan normal besi ortamına ekildi. Hücrelerin canlılıkları 2. 4. 5. ve 6. günlerde WST-1 testi ile ölçüldü. Test üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Kısaca; ölçüm yapılacağı zaman kültür kapları içindeki besi ortamı uzaklaştırıldı ve ardından PBS (Phosphate-Buffered Saline) ile kültür kabı yıkandı. Ardından her bir kuyucuğa %10’luk (10µL WST-1 reaktif, 90µL DMEM-F12/bazal medium) 100 µL WST-1 solüsyonu eklendi. 37°C %5 CO₂ inkübatörde 1 saat inkübasyona bıraktı. Süre sonunda sprektrofotometrede 480nm’de ölçüm yapılarak canlı hücrelerin yol açtığı renk değişimi belirlendi.

Hücre tutunma deneyi için aynı yöntem kullanılmıştır. Kültür kabına 30.000 hücre ekildikten sonra 24 saat boyunca aynı besi ortamında kültür edildi. Süreç sonunda kültür kapları PBS ile üç kez yıkandı. Daha sonra Wst-1 ile hücre sayıları belirlendi. Kaplanmamış kültür yüzeyi üzerinde büyüyen hücreler, kontrol olarak hesaplamada kullanılmıştır. Sonuçlar kontrole göre % olarak ifade edilmiştir.

3.4. İKİ-MKH’lerin Kültürü

Araştırmada daha önceden karakterizasyonu yapılmış olan insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır. Bu hücreler Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) sıvı besiyerine, %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 Penicillin-Streptomycin (10.000 U/mL) eklentilerinin ilavesi ile hazırlanmış olan besi-ortamında çoğaltıldı (tüm malzemeler Thermo Fisher Scientific’den alınmıştır). Hücrelerin her iki ya da üç günde bir besi ortamları yenilendi, buldukları kültür kabının yaklaşık olarak %70-80’ini kapladıkları zaman ise %0,25 Tripsin-EDTA ile kaldırılarak pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

3.4.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

İki farklı markaya ait *Pleurotus ostreatus* türü mantarlar satın alınarak daha önce de bahsedildiği gibi üç basamakta üç farklı temel polisakkarit elde edilecek şekilde izolasyon işlemleri gerçekleştirildi. Bu ekstraksiyonlardan, soğuk su ile α -galaktan; sıcak su ile α -glukan ve sıcak sodyum hidroksit (kostik) ile yapılan izolasyon aşamasında ise β -glukanlar izole edildi. Deney grupları izole edilen α -glukan ve β -glukanların MKH'ların osteojenik farklılaştırması üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla Çizelge 3.2'de gösterilmiş olduğu şekilde tasarlanmıştır.

Çizelge 3.2 Deney grupları

		Kültür Besi Ortamı	
		Osteojenik Farklılaştırma	İnhibisyon (p38 / MKK)
α -Glc	M1	+	+
		+	-
		-	-
	M2	+	+
		+	-
		-	-
β -Glc	M1	+	+
		+	-
		-	-
	M2	+	+
		+	-
		-	-
Kontrol (yüzey)		+	+
		+	-
		-	-

3.5. iKİ-MKH'lerin *In-vitro* Osteojenik Farklılaştırılması

Kültür kabının 1 cm²'sinde yaklaşık olarak 3x10³ adet hücre olacak şekilde iKİ-MKH'lar öncelikli olarak deney gruplarının gerektirdiği koşullar sağlandıktan sonra (yüzeylerin polisakkarit ile kaplanması ya da kaplanmaması) uygun kültür kaplarına ekildi. Yaklaşık olarak 1-3 gün boyunca hücreler kültür kabına yapışmaları ve hücrel stresin daha normal düzeye gelmesini beklemek adına daha önce bahsedilen normal kültür koşullarına kültür edildi. Ardından hücreler üç hafta boyunca, 100 nM dexamethasone, 0,05 µM ascorbate-2-phosphate, 10 mM β-glycerophosphate, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren DMEM-F12 ile hazırlanmış farklılaştırmayı indükleyici besi ortamı ile kültür edildi. 21 gün sonunda hücrelerin farklılaşmasını kontrol etmek için histolojik boyama ve gen ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir (Kulterer ve diğ. 2007)

3.6. Hücrelerden RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Her bir deney grubuna ait olan hücreler, üç hafta süren osteojenik farklılaştırma işleminden sonra PBS ile yıkandıktan sonra buldukları kültür kabından kaldırılmış ve santrifüj edilip sıvı kısım uzaklaştırılarak izolasyon işlemi yapılana dek -80°'de muhafaza edilmiştir. RNA izolasyonu yapılacağı zaman hücreler erimesi için oda sıcaklığında bir süre bekletilmiş ve ardından "High Pure RNA Isolation Kit"(Roche) ile üreticinin önerdiği izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kısaca; hücreler 200 µl PBS ilave edilerek yeniden süspansiyon haline getirildi. Ardından üzerine 400 µl Lysis/Binding Buffer ilave edildi ve vortex yardımıyla iyi bir karışımın oluşması ve hücrelerin sindirilmesi sağlandı. Bu aşamadan sonra örnekler bir toplama tüpünün içine geçirilmiş olan filtre tüpü üzerine pipet vasıtasıyla aktarıldı ve 8000g'de 15 s santrifüj edildi. Daha sonra her bir örneğin üzerine 90µl DNaseI Incubation Buffer ve 10µl DNaseI enzimi ilave edilerek 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu aşamadan sonra parçalanmış hücreden çıkmış olan DNA'lar da parçalanarak geriye nükleik asit olarak RNA kalmıştır. Daha sonra ortamdaki istenmeyen organik ya da inorganik kalıntılardan kurtulmak için yıkama solüsyonu 1 ile bir kez ve yıkama solüsyonu 2 ile iki kez yıkandı. İşlemler sonunda fitreli tüplerin filtresine takılmış olan RNA'ları elde edebilmek amacıyla, toplama tüpleri atılarak eppendorf tüplerin içine fitreli tüpler geçirilir ve ardından 30 µl Elution Buffer filtre kısmının üzerine gelecek şekilde ilave edilerek 2 dk 8000g'de santrifüj edildi. İşlem sonucunda hücrelerden toplam RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen örnekler cDNA sentezi işlemi yapılana dek -80°C'da muhafaza edilir.

İzole edilen RNA'lerden cDNA sentezini yapabilmek için "Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit" (Roche) ürünü kullanılmıştır. İşlemler, üretici firmanın tarif ettiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Her gruba ait RNA örnekleri oda sıcaklığında eridikten sonra buz üzerinde tutuldu ve her birinden 10,4µl alınarak PCR tüplerine aktarılıp üzerlerine 1µl oligo-dT eklendi. Tüpler 65°C'da 10 dk olacak şekilde PCR cihazına (Takara, Tokyo, Japonya) yerleştirildi. Bu aşamada RNA'nın ikincil yapısının denatürasyonu yapılarak örnekler hemen tekrar buz üzerine alındı. Ardından ters transkriptaz reaksiyon için gereken diğer reaktifler tarif edildiği ölçülerde karıştırılarak her bir örneğin üzerine 8,6 µl olacak şekilde ilave edildi ve PCR cihazına yeniden yerleştirildi. Bundan sonra örnekler 55°C'de 30 dk uzama aşaması, hemen ardından 85°C'de 5 dk enzimin inaktivasyonu sağlandı. Son olarak tüm örnekler buz üzerine alındı ve gen ekspresyonu analizi yapılana dek -20°C'da muhafaza edildi.

3.7. MAPK Sinyal Yolağı İnaktivasyonu

Hücrelerde MAPK sinyal yolağını inhibe etmek için hem p38 inhibitörü (SB 202190) hem de MKK / MEK inhibitörü (PD 98059) kullanılmıştır (Tocris Cat. No. 1879/1). Bu işlem için kültür kabına ekilmiş olan MKH'ların bulunduğu her bir kuyucuğa SB 202190 inhibitörünün 5µM ve PD98059 inhibitörünün ise 10µM yoğunluklarında olacak şekilde besi ortamına eklenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Kültür ortamı her değiştirildiğinde eklenen yani besiyerlerinde aynı miktarda inhibitör eklenerek inaktivasyonun devamlılığı sağlandı.

3.8. Gen Ekspresyon Analizi

Mantarlardan izole edilen polisakkaritlerin MKH'ların osteojenik farklılaşmaları üzerindeki etkilerinin gen düzeyinde incelenebilmesi için Real Time PCR (LightCycler-II 480, Roche, Mannheim, Almanya) yapılmıştır. Bu yöntem ile osteojenik farklılaşmanın farklı aşamalarında sentezlenen proteinlerin gen ekspresyon miktarı kantitatif olarak tespit edilmiştir.

Real Time PCR yapılırken SYBR Green master karışımı (Jena Biotechnology, Jena, Almanya) ve aşağıdaki listede yer alan osteojenik farklılaşmaya ve MAPK sinyal yolağına ait bazı genlerin primerleri (Çizelge 3.3) ile daha önceden elde ettiğimiz

cDNA'lar karıştırılarak reaksiyon kurulmuştur. 96 well plate'lere kurulan reaksiyonlar 480 nm dalga boyunda okutularak ilgili genlerin çoğalmaları takip edilmiş ve sonrasında çıkan Cp sonuçları doğrultusunda analizleri yapılmıştır.

Çizelge 3.3 Gen ekspresyonu analizi için kullanılan primerler ve baz dizilimleri

Primerler	Açık İsmi	Baz Dizilimleri (5'→3')
OPN	Secreted Phosphoprotein 1(SPP1) / Osteopontin	f-ttgcagtgatttgcttttgc
		r- gtcacggcttctgctggact
cFos	Cellular Oncogene C-Fos	f-agaatccgaagggaaggaa
		r- cttctcttcagcaggttg
BMP2	Bone Morphogenetic Protein 2	f-ggatccatgtagccgggac
		r-ggatcctagcgacaccacaacc
MEK1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1	f-cccatggcaattttgagtt
		r- ccaacctgcaaaatccactt
MEK2	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2	f-cgtacctccgagagaagcac
		r- gtccgactgcaccgagtaat
Erk1	Extracellular Signal-Regulated Kinase 1	f-atgaaggcccgaactacct
		r- ctcatccgtcgggtcatagt
Erk2	Extracellular Signal-Regulated Kinase 2	f-gttggtacagggctccagaa
		r- tgtgatgggatccaagaat
JNK1	C-Jun N-Terminal Kinase 1/ Stress-Activated Protein Kinase	f-gctctcaacaccgtacat
		r- cattgatcactgctgcacct
p38alpha	Mitogen-Activated Protein Kinase P38 Alpha	f-ggggcagatctgaacaacat
		r- gagccagtccaaaatccaga
Runx2	Osteoblast-Specific Transcription Factor	f-ggacgaggaagagttcac
		r-gagcggtcagagaacaac
ActB	Actin beta (housekeeping gene)	f-ttctacaatgagctgcgtgtg
		r-ggggtgttgaaggtctcaaa

3.9. İmmüsitokimyasal ve İmmünfloresan Boyama

Polisakkaritlerin MKH'ların osteojenik farklılaşması üzerine etkilerinin ve MAPK sinyal yolağının bu farklılaşmada oynadığı rolü saptayabilmek için immüsitokimyasal olarak Alizarin Red S boyaması ve immün floresan olarak da p38 α (R&D Systems, Minneapolis, MN, ABD), fosfo ERK (R&D Systems), ve BMP2 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Almanya) antikoları, ile boyama yapılmıştır. Bunun için 6 kuyucuklu kültür kablarının içlerine cam lameller yerleştirilmiş ve her biri farklı polisakkaritlerle kaplanmıştır. Gece boyu polisakkaritler ile kaplanma işlemine tabi tutulan yüzeyler akabinde PBS ile yıkanmış ve daha sonra her birine 50.000 hücre ekilerek her bir grup kendi besi ortamı ilave edilerek 21 günlük osteojenik farklılaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda cam lameller alınarak üçer defa PBS ile yıkanmış ardından %4'lük paraformaldehit ile oda sıcaklığında 15 dakika fiske edilmiştir. Ardından fiksatif deiyonize su ile yıkanmak suretiyle uzaklaştırılmış ve lameller Alizarin Red S boyası damlatılarak 30 dk çalkalayıcı içinde inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda boya deiyonize su ile yıkanarak uzaklaştırılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Ardından entellan ile kapatılan lameller ışık mikroskopunda (Olympus IX2-ILL100, Tokyo, Japonya) incelenmiştir.

İmmün floresan boyama için ise cam lameller yine PBS ile yıkandı, ardından %4'lük paraformaldehid ile 15-20 dk oda sıcaklığında fiske edildi. Daha sonra fiksatif deiyonize su ile uzaklaştırıldı ve yaklaşık 7-10 dk TritonX uygulaması yapılarak hücrelerin geçirgenliği artırıldı. Tekrar PBS ile TritonX uzaklaştırıldıktan sonra uygun orandaki blok serum ile hücreler yaklaşık olarak 30 dk üzerleri parafilm ile kapatılarak bekletildi. Sonrasında fazla serum alınarak osteojenik farklılaştırma ve MAPK sinyal yolağı için belirlenmiş olan belirteçlerin primer antikoları [p38 alpha antibody(af8691), phospo erk1/2 antibody(af1018) (R&D Systems), BMP2/4 antibody(sc-137087)] cam lameller üzerine damlatıldı ve üzerleri parafilm ile kapatılarak +4°C'de gece boyu bekletildi. Daha sonra primerlere uygun olarak seçilmiş olan sekonder antikolar üretici firmanın talimatları doğrultusunda sulandırıldı ve cam lameller üzerine damlatılarak oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda bir saat inkübe edildi. Son olarak ise lameller DAPI ihtiva eden kapatma solüsyonu ile kapatılarak floresan mikroskopta görüntülendi ve fotoğrafları çekildi (DMI 4000 Microsystems, Leica, Weltzler, İsviçre).

3.10. İstatiksel analiz

Sonuçların istatistiksel analizleri SPSS10.0 (SPSS, Chicago, ABD) programı ile yapılmıştır. Veriler eşli t-testi ve çoklu analizler için Newman–Keuls metodu ile test edilmiştir. Her deney en az üç kez tekrar edilmiştir. Deney ve kontrol grupları arasındaki fark $p<0,05$ olduğunda anlamlı ve $p<0,01$ olduğunda ileri derece anlamlı olarak ifade edilmiştir.



4. BULGULAR

Bu çalışma çeşitli kemik defektleri, rejeksiyonları ya da doğuştan olabilen anomaliler ve kendiliğinden iyileşmenin çok zor ya da çok yavaş olduğu kemik hasarlarının tedavisinde doku iskelesi olarak kullanılabilir, kemik yapım sürecinin kısılmasını sağlayacak nitelikte biyouyumlu doğal bir polisakkarit arayışı sonucunda ortaya çıkmıştır. Bu bağlamda çalışmamızda yurdumuzda hem doğal olarak yetişen hem de yaygın bir biçimde kültürü yapılan, insan sağlığı üzerine olumlu birçok etkisinin olduğu bilimsel çalışmalarla kanıtlanmış olan *P. ostreatus* türü mantar, polisakkarit kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu mantardan izole edilen beta-glukanın iKİ-MKH'lerde MAPK sinyal yolağının fosforilasyonunu sağlayarak osteojenik farklılaşmayı destekleyecek bir materyal olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada, β -glukanların osteojenik farklılaşmaya yönlendirilen insan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler üzerindeki etkilerinin incelenmesi ve bu etkinin MAPK sinyal yolağı üzerinden olup olmadığının anlaşılması hedeflenmektedir.

Proje boyunca kullanılan hücreler, KÖGEM hücre arşivinde mevcut olan ve daha önceden etik kurul onayı alınmış, insan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerdir. Bu çalışmada kullanılmak üzere alınmış olan etik kurul onayına dair karar numarası: KÜ GOKAEK 2016/20.3'dür.

4.1. Glukanların Miktar Tayini

Araştırmamızda yerel marketten satın almış olduğumuz *P. ostreatus* türü mantardan Palacios ve diğ. (2012) kullanmış oldukları yöntem ile alfa-glukan ve beta-glukan izolasyonu gerçekleştirilmiştir. 200 gr üründen Metanol ile Fenol bakımından zengin olan içerik uzaklaştırıldıktan sonra, birinci mantarın (M1) kuru ağırlığı 34 g ve ikinci mantarın (M2) kuru ağırlığı ise 31 g gelmiştir. Bu aşamadan sonra gerçekleştirilen bir dizi izolasyon sonrası elde edilen toz polisakkaritlerin kuru ağırlıkları hassas terazide ölçülmüştür. Bu ölçüm sonucunda çıkan miktarlar Çizelge 4.1'de gösterildiği gibidir. Yapılan izolasyon sonucunda sıcak su izolasyonu ile α -glukanlar, sıcak NaOH izolasyonu ile ise β -glukanlar izole edilmiştir.

Çizelge 4.1 İzolasyon ile elde edilen kuru polisakkarit miktarları

İzolasyon Yöntemi		Ürün miktarı
- Sıcak Su	(M1)	0,3742 g
	(M2)	0,4510 g
- Sıcak NaOH	(M1)	0,4537 g
	(M2)	0,3590 g

İzolasyon sonucunda elde edilen ekstraktların kuru ağırlıklarından ziyade bu malzemelerdeki polisakkaritlerin miktarı önem arz etmektedir. Deneylerimizde kullanmış olduğumuz glukanlar, glikozidik bağlar ile bir araya gelmiş glikoz monomerlerinden oluşan polisakkaritlerdir. Sonuçta eğer glikoz miktarı tayin edilebilirse bir bakıma buradaki polisakkarit miktarı tayin edilebilecektir. Bu ölçümü yapabilmek için Fenol-Sülfürik asit deneyi yapılmıştır. Bu yöntem ile glikozidik bağlar kırılmış ve sonuçta ortaya çıkan glikozların miktarı renk yoğunluğuna göre spektrofotometre ölçümü ile kontrol olarak glikoz kullanılmak suretiyle saptanmıştır (Çizim 4.1).



Çizim 4.1 Fenol-Sülfürik asit deneyi

Yapılan deneylerin tamamında kullanılan polisakkaritler 10 mL’de 1mg olacak şekilde çözünür hale getirilmiş ve tarif edildiği şekilde Fenol-Sülfürik asit testi yapılmıştır. Bu kapsamda hazırlanan çözeltinin 200µL’sindeki polisakkarit miktarı ve 6 kuyucuklu bir kültür kabına uygulanıp gece boyu inkübasyona bırakıldıktan sonra kültür kabın yüzeyinde bulunan polisakkarit miktarları ölçülmüştür (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Kaplama malzemesi olarak kullanılan çözünmüş glukanların kültür kabını kaplama miktarları

		200 µl’deki polisakkarit miktarı	Kültür kabı yüzey kaplama oranı (60 µl)
α-glukan (sıcak su izolasyonu)	M1	0,037 µg	0,020 µg
	M2	0,071 µg	0,041 µg
β-glukan (sıcak NaOH) izolasyonu	M1	0,099 µg	0,027 µg
	M2	0,059 µg	0,022 µg

Yapılan bu çalışmada β-glukanların üzerinde durulmuştur. Bu nedenle kullandığımız yöntemle sıcak su ile α-glukanlar, sıcak NaOH ile de β-glukanlar izole edilmiştir. Saflığın belirlenebilmesi için β-glukan kiti kullanılmıştır. Bu doğrultuda yapılan test sonucunda izole edilen ekstraktlardaki toplam glukan, α-glukan ve β-glukan miktarları Çizelge 4.3.’de belirtilmiş olduğu gibi bulunmuştur.

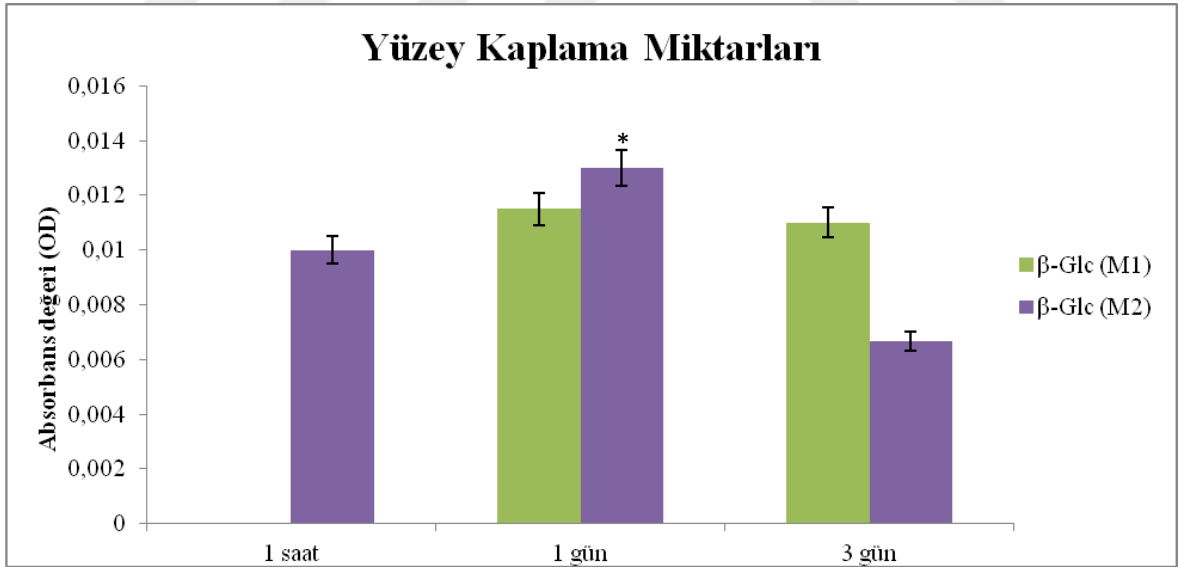
Çizelge 4.3 İzolasyon sonra elde edilen polisakkaritlerdeki total α- ve β-glukan miktarları.

		Polisakkarit miktarı (µg/10µL)
α-Glc	M1	1,16
	M2	3,51
β-Glc	M1	58,97
	M2	44,62

4.2. Kaplama Materyali Olarak Kullanılan Glukanların Hücreler Üzerindeki Etkileri

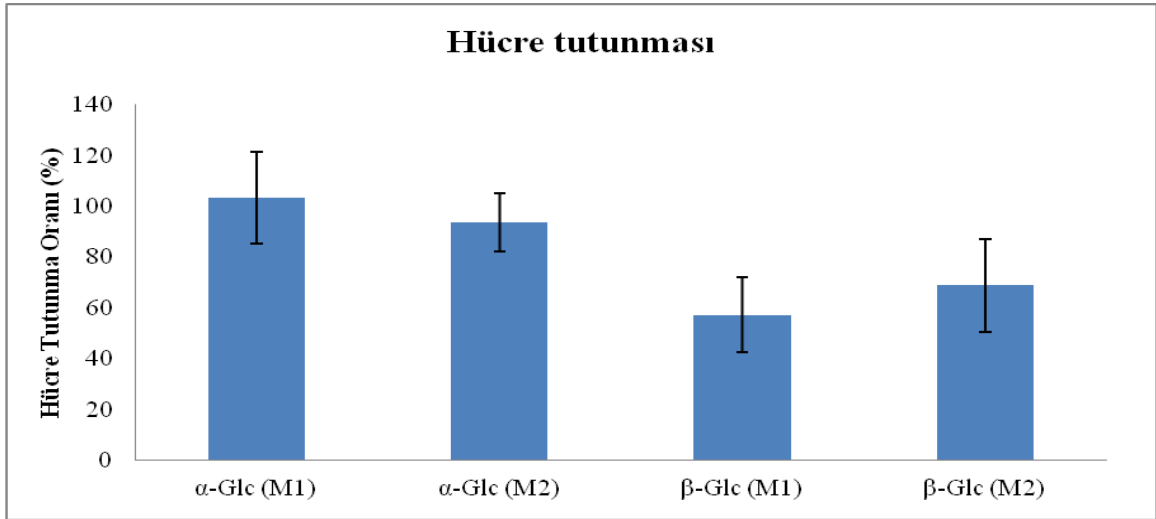
Glukanların hücreler üzerindeki etkilerinin incelenmesi için, materyal ve metod kısmında bahsedildiği şekilde hücrelerin ekileceği kültür kaplarının yüzeyleri kaplanmıştır. Böylece hücreler ile glukanların birbirleri ile etkileşim kurabilmeleri sağlanmıştır.

Kaplama materyali olarak kullanılacak olan polisakkaritlerin kaplanabilmesi için gerekli kaplama süresi optimize edilmiştir. Bu aşamada polisakkaritler 1 saat, 1 gün ve 3 gün inkübe edilerek kültür kapları *P.ostreatus*'dan izole edilen glukanlarla kaplanmıştır. Bu inkübasyon sonunda yöntemlerde bahsedildiği şekilde Fenol-Sülfürik Asit testi gerçekleştirilmiş ve çıkan kolorimetrik ölçüm sonuçları Çizim 4.2'de gösterildiği gibi grafiğe aktarılmıştır. 1 saat sonrasında birinci mantardan izole edilmiş olan β -glukanın kaplamasının gerçekleşmediği görülmüştür. M1 ve M2 kaynaklı β -Glukanların kültür kabı yüzeyine tutunmaları için en uygun inkübasyon süresinin 1 gün olduğu görülmektedir. Dolayısıyla bu çalışmanın geri kalan tüm deneylerinde yapılan kaplamalar 1 gün inkübasyona tabi tutmak koşuluyla gerçekleştirilmiştir.



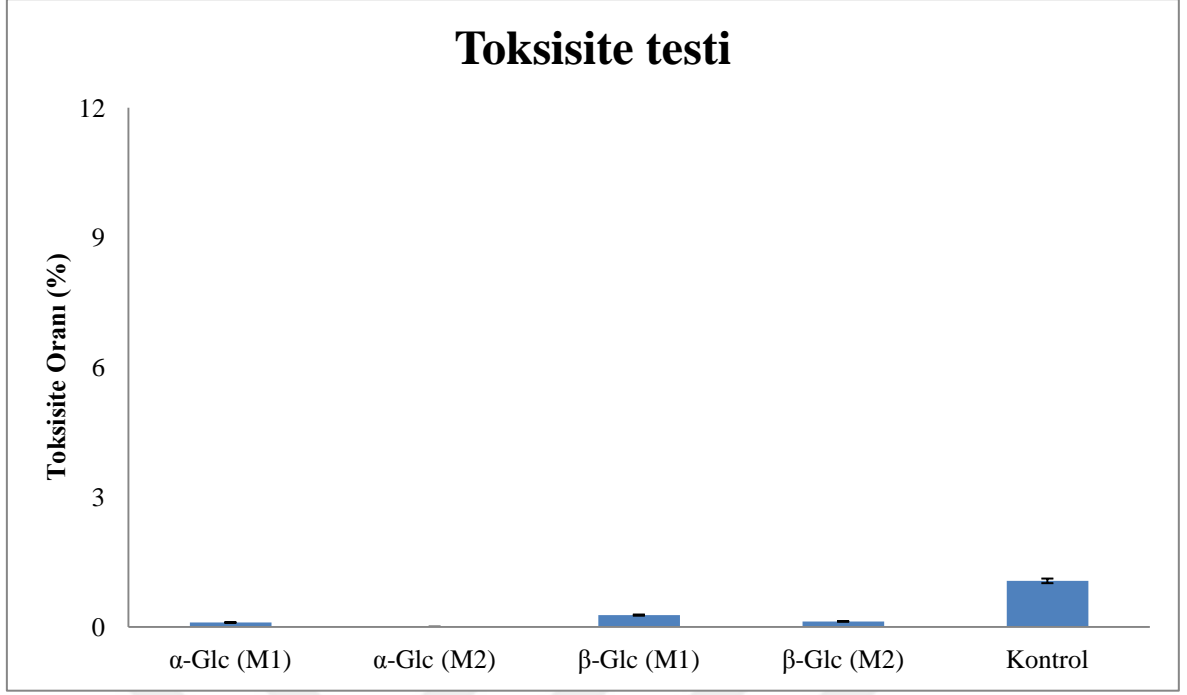
Çizim 4.2 *P.ostreatus*'dan izole edilen glukanlar ile kaplanan kültür kabı yüzeyinin farklı sürelerdeki kaplanma miktarının Fenol-Sülfürik Asit tekniği ile tespiti.

MKH'lerin temel özelliklerinden bir tanesi, plastik kültür kabına yapışabilmeleridir. Kültür kabı yüzeyinin glukanlarla kaplanması sonrasında MKH'lerin yine bu yüzeye de yapışıp yapışmayacaklarını saptayabilmek için tutunma testi yapılmıştır. Bunun için, yüzeyi glukanlarla kaplanmış kültür kapları ile normal polistren kaplı kültür kaplarına 5×10^5 hücre ekilmiş ve 37°C 'da %5 CO_2 içeren ortamda 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücrelerin tutunmaları Wst-1 testi yapılarak değerlendirilmiş ve sonuçta normal polistren kaplı yüzeylere ekilmiş olan hücreler kontrol olarak hesaplanmıştır. Çizim 4.3'de görülmekte olduğu gibi hücrelerin kaplama yapılan yüzeylere tutunabildiği gözlemlenmektedir.



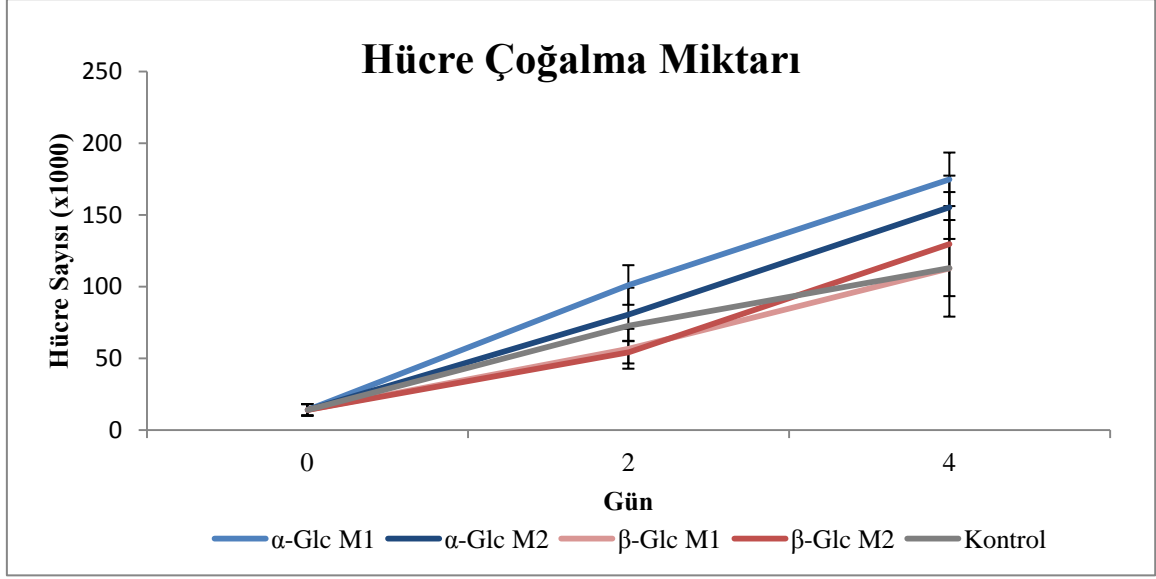
Çizim 4.3 Kaplanan yüzey üzerine ekilen hücrelerin 24 saatlik sonraki tutunma miktarları.

Kaplama materyali olarak kullanılan glukanların hücreler üzerinde toksik etkilerinin incelenebilmesi için hücreler 48 saat sonra LDH testi yapılmıştır. Bunun için polisakkarit ile kaplanmış ve de kontrol olarak PBS ile yıkanmış kuyucukların her birine 10.000 hücre ekilip normal kültür koşulları altında 48 saat inkübe edilmiştir. Çizim 4.4.'de görüldüğü üzere kültür sonunda yapılan ölçümde anlamlı bir toksisite değeri bulunamamıştır.



Çizim 4.4 Kültür kabı yüzeyi kaplama materyali olarak kullanılan glukanların, hücreler ekildikten 48 saat sonraki toksisite ölçümü.

Mantardan izole edilen polisakkaritlerin hücrelerin canlılığı üzerinde negatif etkilerinin olmadığı, hücrelerin tutunabildikleri bir yüzey oldukları yapılan testler ile tespit edilmişti. Bu gözlemler sonucunda kaplama materyali olarak kullanılacak olan nu glukanların hücre çoğalması üzerindeki etkileri bir hafta boyunca takip edilmiştir. Yüzeyleri kaplanmış kültür kaplarının her birine 10.000 hücre ekilmiş ardından ilk altı gün hücre sayıları Wst-1 testi yapılarak ölçülmüştür. Kaplanmış yüzeylere ekilmiş olan hücrelerde 4. güne dek çoğalma gözlemlenirken 4. günden sonra düşüş gözlemlenmiştir (Çizim 4.5.). Bunun nedeninin ise çoğalmanın artması ile beraber kültür kabının yüzey alanının çok azalması ve kültür kabı yüzeyinde hücrelerin tutunabilecek yerinin kalmaması sonucu hücrelerin kültür kabı yüzeyinden kalkmaya başladığı gözlemlenmiştir. β-glukanlar ile kaplanmış olan yüzeyde özellikle ikinci mantardan izole edilmiş olan β-glukan ile kaplanmış olan yüzeyde hücre çoğalmalarının anlamlı derecede yüksek oldukları grafikte gözlemlenebilmektedir.

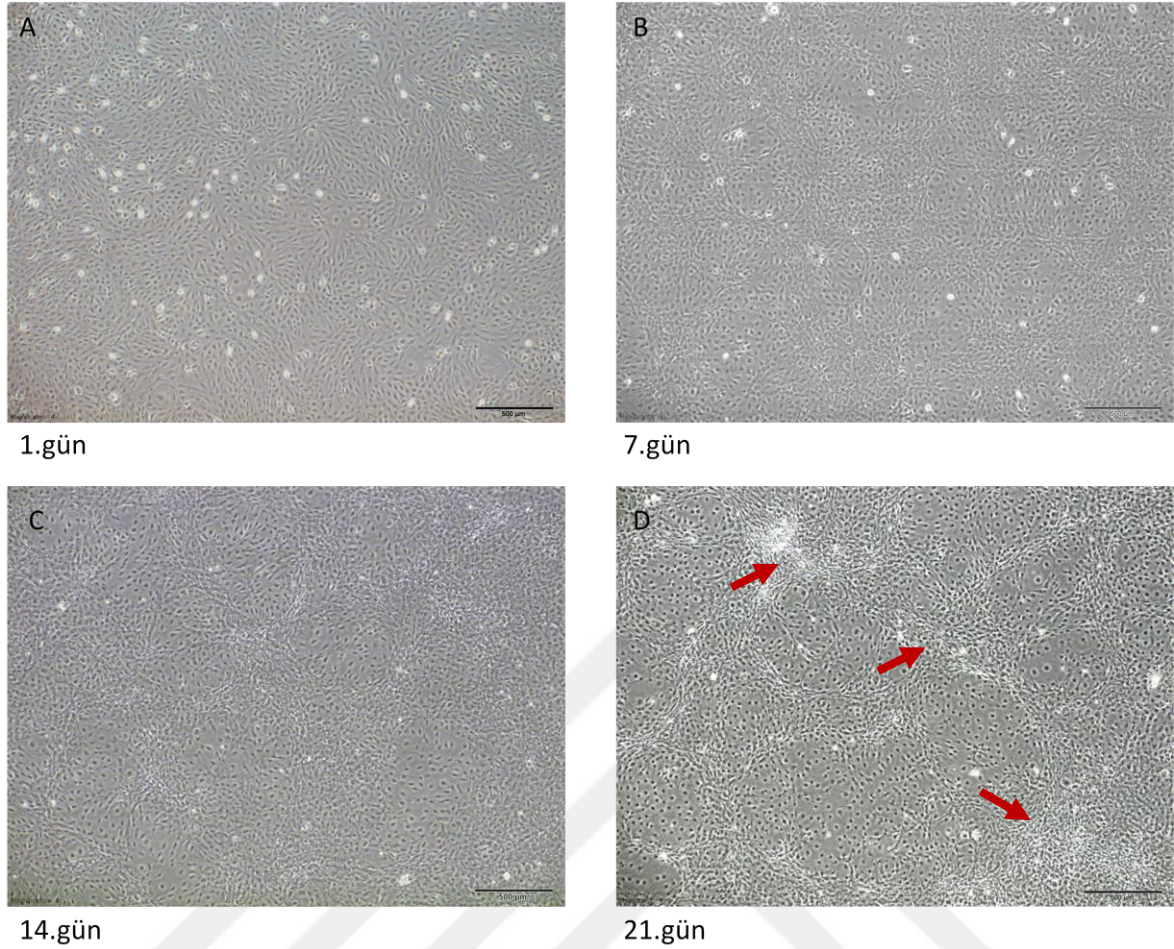


Çizim 4.5 Glukan kaplı kültür kabı üzerine ekilen hücrelerin proliferasyonu.

4.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmaya Yönlendirilmesi

Yapılan çalışmada kullanılan iKİ-MKH'lerin osteojenik farklılaşma potansiyellerinin ölçülmesi amacıyla, hücreler normal kültür kaplarına ekilerek osteojenik farklılaştırma eklentisi ilave edilmiş besi ortamında 21 gün boyunca kültür edilmiştir. Farklılaştırma sürecinin başından sonuna kadar düzenli aralıklarla hücrelerin görüntüleri ışık mikroskobu ile alınmıştır

Çizim 4.6'da görülmekte olduğu gibi osteojenik farklılaşma süreci boyunca hücrelerin morfolojilerinde de çeşitli değişiklikler meydana gelmiştir. Henüz farklılaştırma ortamına yeni alınmış hücrelerin morfolojilerinin (A), normal besi ortamında kültür edilen hücrelerin morfolojisi gibi yani iğsi yapıda olduğu gözlemlenmektedir. Sürecin 4.gününde ise morfolojik değişimlerin başladığı, iğsi yapıdaki hücre formunun giderek azaldığı gözlemlenmektedir (B). 14.günde hücrelerin kübik bir morfoloji sergiledikleri görülmektedir (C). 21.günde ise hücre dışı matris birikimlerinin oluşmaya başladıkları gözlemlenmektedir (D).

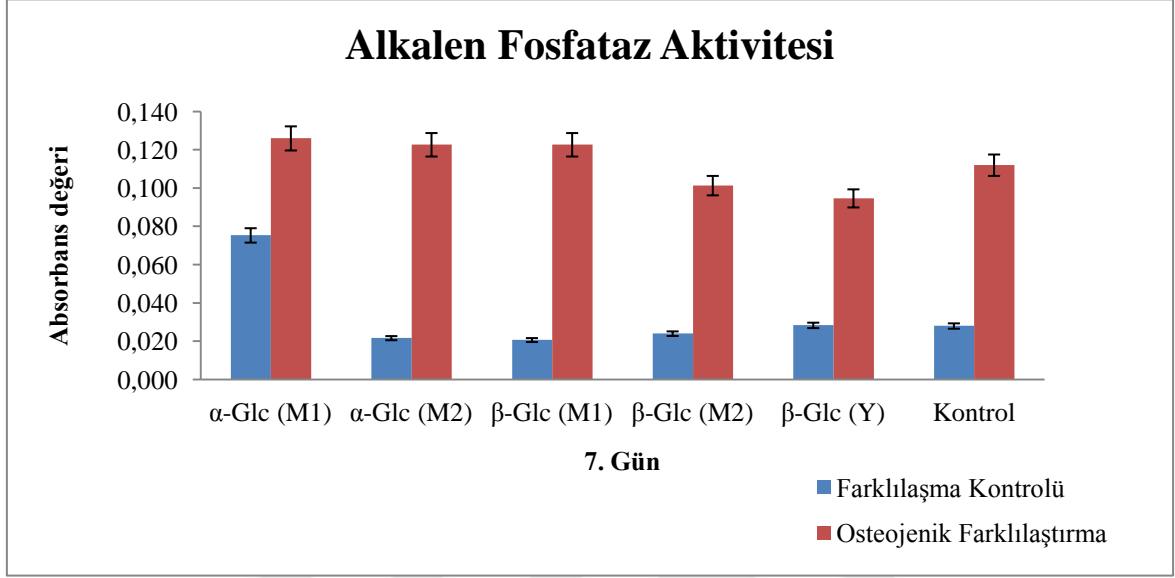


Çizim 4.6. iKI-MKH'lerin osteojenik farklılaştırılma sürecindeki morfolojik değişimler. Kimyasal uyarıyla 21 gün boyunca osteojenik farklılaşmaya yönlendirilen iKI-MKH'lerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500µm

4.4.β-glukanların iKI-MKH'lerin Osteojenik Farklılaşması Üzerindeki Etkileri

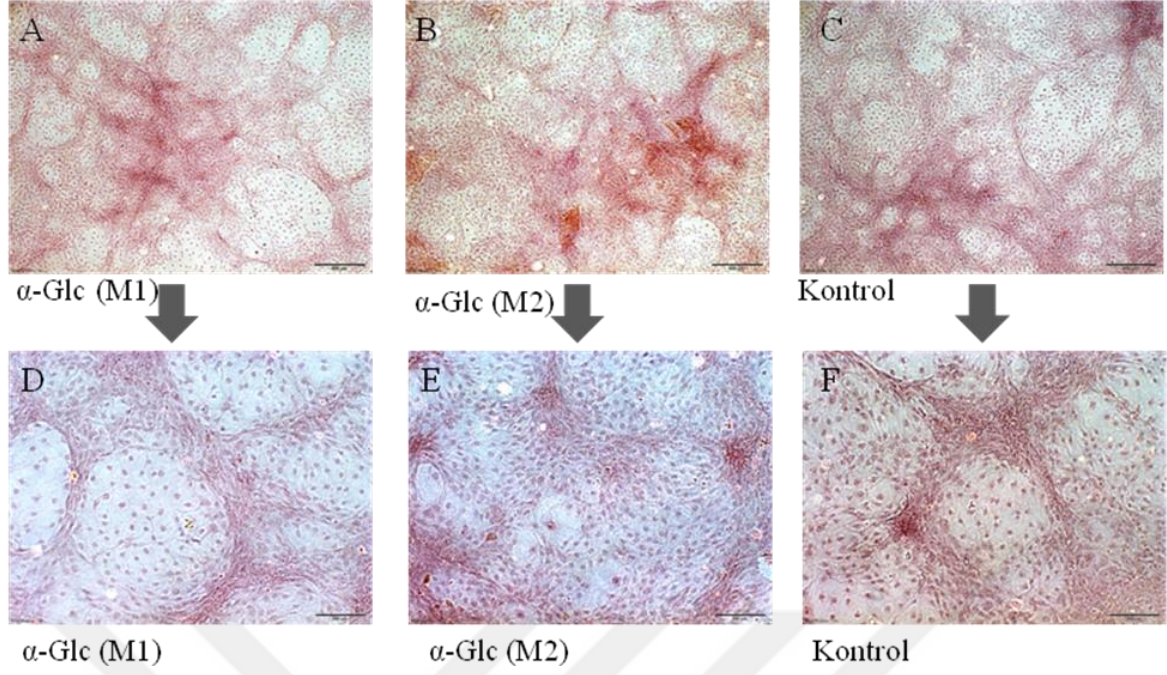
iKI-MKH'lerin osteojenik farklılaşması üzerine *Pleurotus ostreatus* kaynaklı β-glukanların etkilerinin incelenmesi için, hem yine bu mantardan izole edilen α-glukanlar ile hem de β-glukanlar ile kültür kabının yüzeyi kaplanmıştır. Bu aşamada *P. ostreatus*'dan izole edilmiş olan β-glukanla karşılaştırılması için pozitif kontrol olarak *Saccharomyces cerevisiae*'dan izole edilmiş β-glukan ile yine kültür kabının yüzeyi kaplanmıştır. Bunların dışında negatif kontrol olarak kaplanmamış normal kültür kabı kullanılmıştır. Bu yüzeyler üzerine ekilen hücreler belirli bir konfluensiye ulaşıncaya dek normal mezenkimal kök hücreler için kullanılmakta olan besi ortamı kullanılmıştır. Hücreler yeterince tutunup çoğaldığı gözlemlendikten sonra ise osteojenik farklılaştırma için kimyasal eklentiler besi ortamına eklenmiştir. Çizim 4.7'de farklılaştırmanın

7.günüdeki ALP aktivite ölçümleri gösterilmiştir. Farklılaşmanın indüklendiği gruplarda ALP aktivitesi belirgin bir şekilde artmışken ($p<0,05$) farklılaşmanın uyarıldığı farklı gruplar arasında belirgin bir farkın olmadığı görülmektedir.



Çizim 4.7 Osteojenik farklılaştırmanın 7. günlerindeki ALP aktivite ölçümü

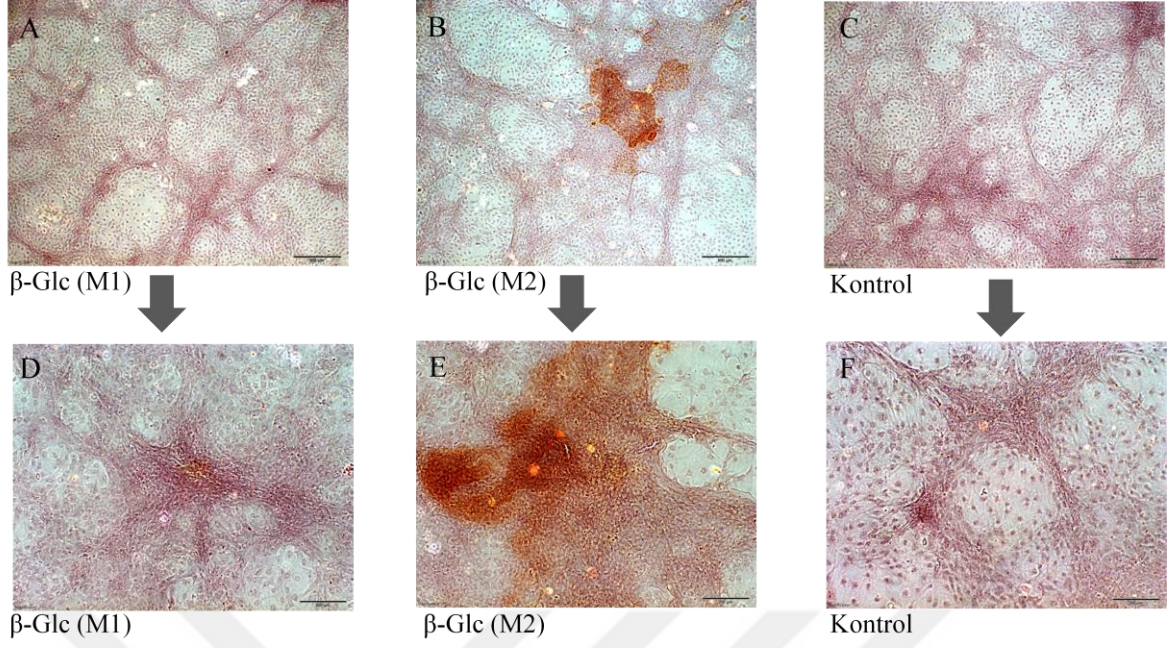
ALP ölçümünden yola çıkılarak glukanların osteojenik farklılaştırma üzerindeki etkileri farklı deneylerle kontrol edilmiştir. Bunlardan biri olan histolojik boyama için, 6 kuyucuklu kültür kabına uygun büyüklükteki cam lamellerin yüzeyleri mantardan izole edilmiş olan α -glukan, β -glukan ve kontrol olarak kullanılan maya kaynaklı β -glukan ile kaplanmıştır. Kaplanan bu yüzeylerin üzerine iKİ-MKH'lar ekilip 21 süren osteojenik farklılaştırma işlemine gerçekleştirilmiştir. Bu sürecin sonunda, lameller fiske edilmiş ve osteojenik farklılaşma sürecinde meydana gelen mineralizasyon, kalsiyum mikrokristallerini boyayan ve kolorimetrik bir sonuç veren Alizarin Red S boyası ile ışık mikroskobu altında gözlemlenmiştir (Çizim 4.8 ve 4.9).



Çizim 4.8 α -Glukan kaplı yüzeyler üzerin osteojenik farklılaşma ve Alizarin Red S boyaması. 21 gün boyunca, *P.osteotatus*'dan izole edilmiş olan α -Glukanların kaplanmış olduğu yüzey üzerine ekilerek osteojenik farklılaştırma işlemi uygulanan MKH'lerin Alizarin Red S boyaması sonrasındaki ışık mikroskopu ile alınmış görüntüleri. Ölçek çubuğu A, B, C için 500 μ m; D, E ve F için 200 μ m.

Osteojenik farklılaşmanın belirtisi olan kalsiyum kristalleri, çizim 4.8'de görülmekte olduğu gibi Alizarin Red S ile pozitif olarak boyanmıştır. iKİ-MKH'ler başarılı bir şekilde osteojenik farklılaşmaya yönelmişlerdir. Kontrol olarak kaplanmamış, normal kültür kapları üzerine ekilerek farklılaştırmaya alınan hücreler ile *P.ostreatatus*'dan izole edilen α -glukanlar ile kaplanmış yüzeye ekilen hücreler benzer oranlarda farklılaşmış ve dolayısıyla benzer boyanma sergilemişlerdir. Gruplar arasında, histolojik boyama bakımından açık bir fark gözlemlenmemektedir.

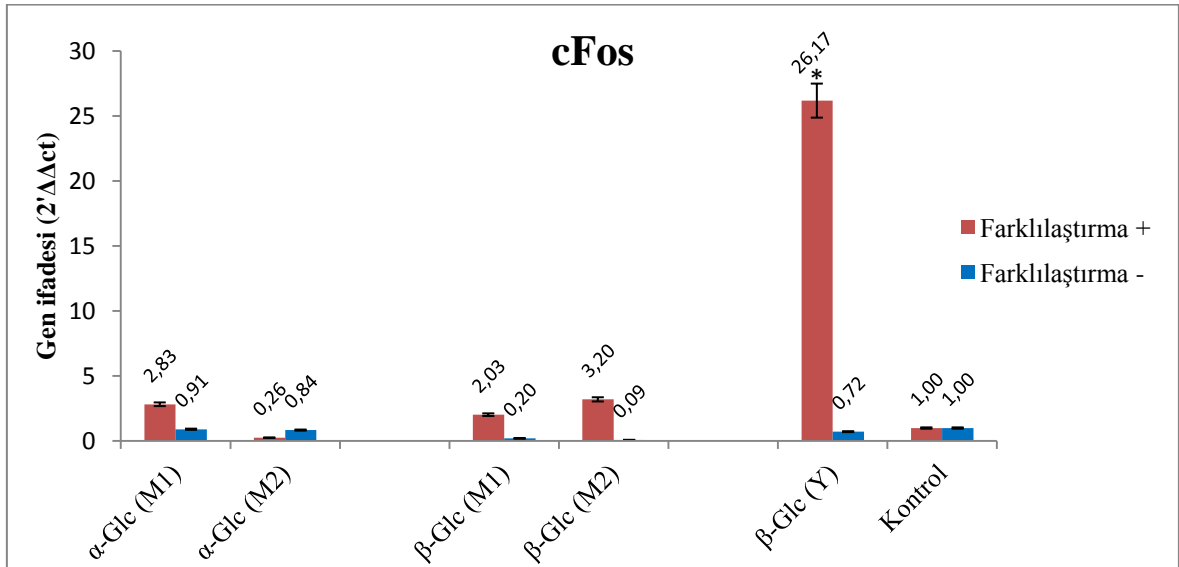
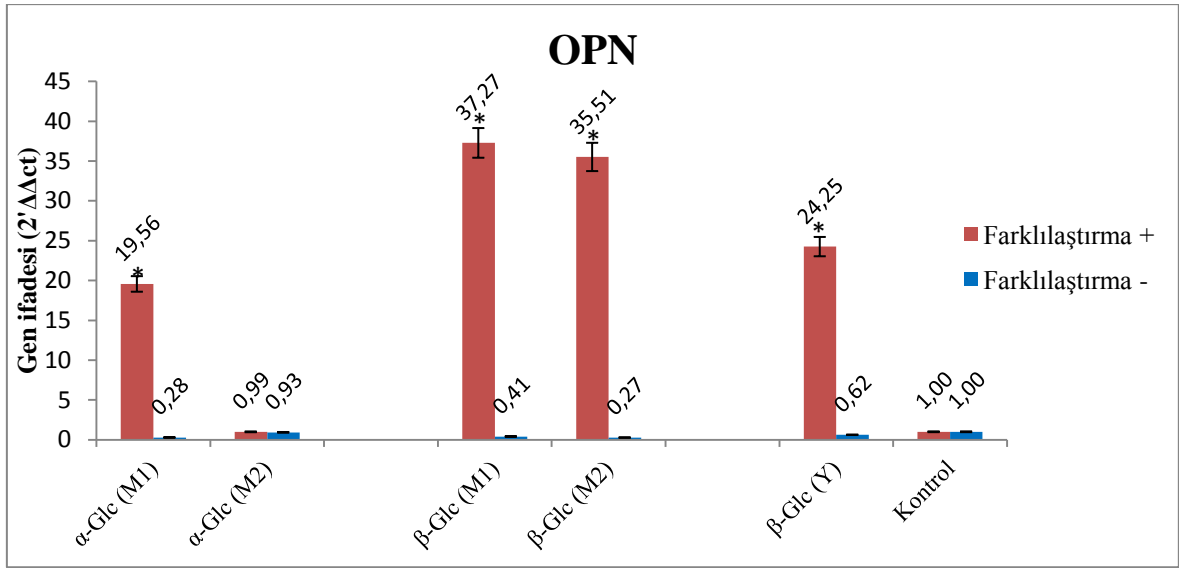
P.ostreatatus'dan izole edilmiş olan β -glukanlar ile kaplanmış yüzeye ekilen iKİ-MKH'lerde aynı şekilde Alizarin Red S ile boyanmıştır. Sonuçta Çizim 4.9'da görüldüğü gibi ikinci mantardan izole edilen β -glukanın birinci mantardan izole edilen β -glukana ve kontrole göre daha fazla oranda pozitif boyandığı gözlemlenmektedir.



Çizim 4.9 β -Glukan kaplı yüzeyler üzerin osteojenik farklılaşma ve Alizarin Red S boyaması. 21 gün boyunca, *P.osteotatus*'dan izole edilmiş olan β -Glukanların kaplanmış olduğu yüzey üzerine ekilerek osteojenik farklılaştırma işlemi uygulanan iK1-MKH'lerin Alizarin Red S boyaması sonrasındaki ışık mikroskopu ile alınmış görüntüleri. Ölçek çubuğu A, B, C için 500 μ m; D, E ve F için 200 μ m.

Histolojik boyamalarda osteojenik farklılaşmayı desteleyecek bir boyama mevcut olsa da, grupların birbirleri arasındaki fark açık bir şekilde gözlemlenmemektedir. MKH'lerin osteojenik farklılaşmaları üzerinde β -glukanların etkisinin olup olmadığını anlayabilmek için histolojik boyama dışında osteojenik farklılaşma belirteç genlerinin ifadeleri incelenmiştir. Bu doğrultuda, osteojenik farklılaşma ile bağlantılı olan OPN ve cFos genlerinin ifadeleri ölçülüp kontrole göre hesaplanarak kantitatif bir sonuç elde edilmiştir (Çizim 4.10).

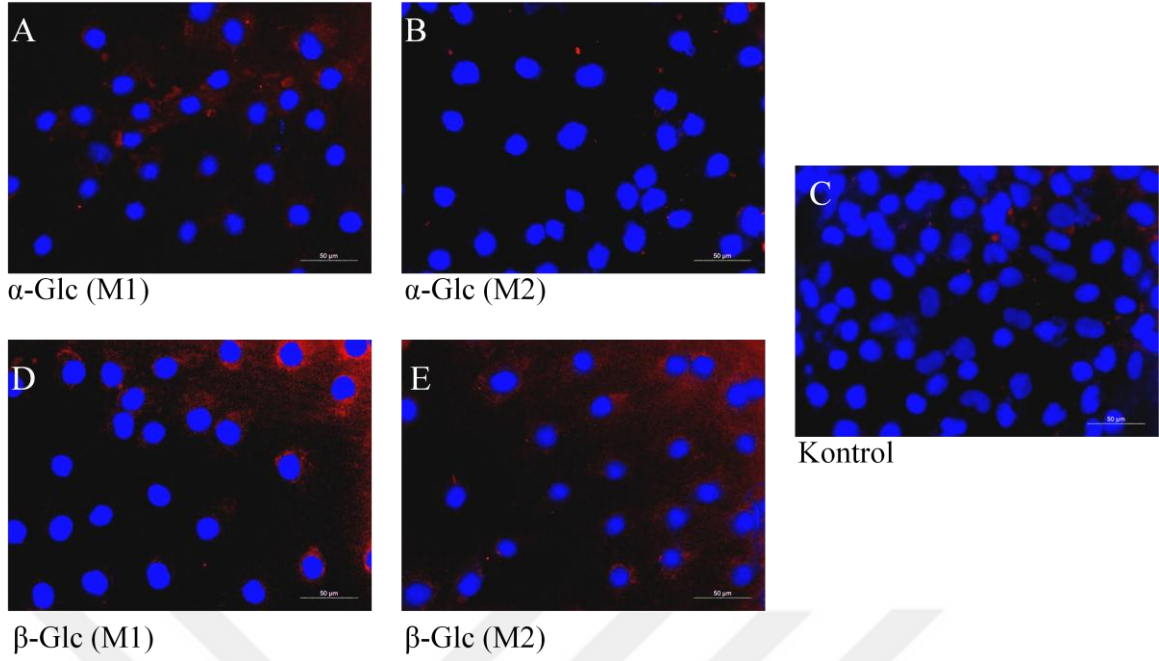
Osteojenik farklılaştırma yapılan grupta, birinci ve ikinci mantardan izole edilen β -glukanlarla kaplanmış yüzeylerde OPN gen ifadesinin kontrole göre yaklaşık olarak 35 kat artmış olduğu gözlemlenmektedir. Birinci mantardan izole edilen α -glukan ile kaplı yüzeyde yaklaşık 20 kat artış gözlemlenirken, ikinci mantardan izole edilen α -glukan kaplı yüzeye ekilerek farklılaştırmaya alınan hücrelerde anlamlı derecede OPN ifadesi olmadığı görülmektedir. Buna karşın maya kaynaklı β -glukan kaplı yüzeye ekilerek farklılaştırmaya alınan hücrelerde yaklaşık 25 kat artış olduğu görülmektedir.



Çizim 4.10 α- ve β- glukon kaplı yüzeylerde farklılaştırmaya alınan hücrelerin osteogenez ile ilgili bir takım genlerin ifadesi (p<0,05).

Ancak cFos gen ifadesi mantardan izole edilen β-glukanlar ile kaplı yüzeylere ekilen hücrelerde kontrolden 2-3 kat fazla olmasına rağmen, mayadan izole edilen β-glukan ile kaplı yüzeye ekilen hücrelerde yaklaşık 25 kat daha fazla olduğu gözlemlenmektedir.

Gen ifadesi analizi dışında, kaplama materyali olarak kullanılmış olan glukonların üzerine ekilen iKİ-MKH'lerin osteojenik farklılaşması üzerine etkisinin tespit edilmesi için BMP2/4 antikoru kullanılarak immün floresan boyaması yapılmış ve floresan mikroskop altında görüntülenmiştir.



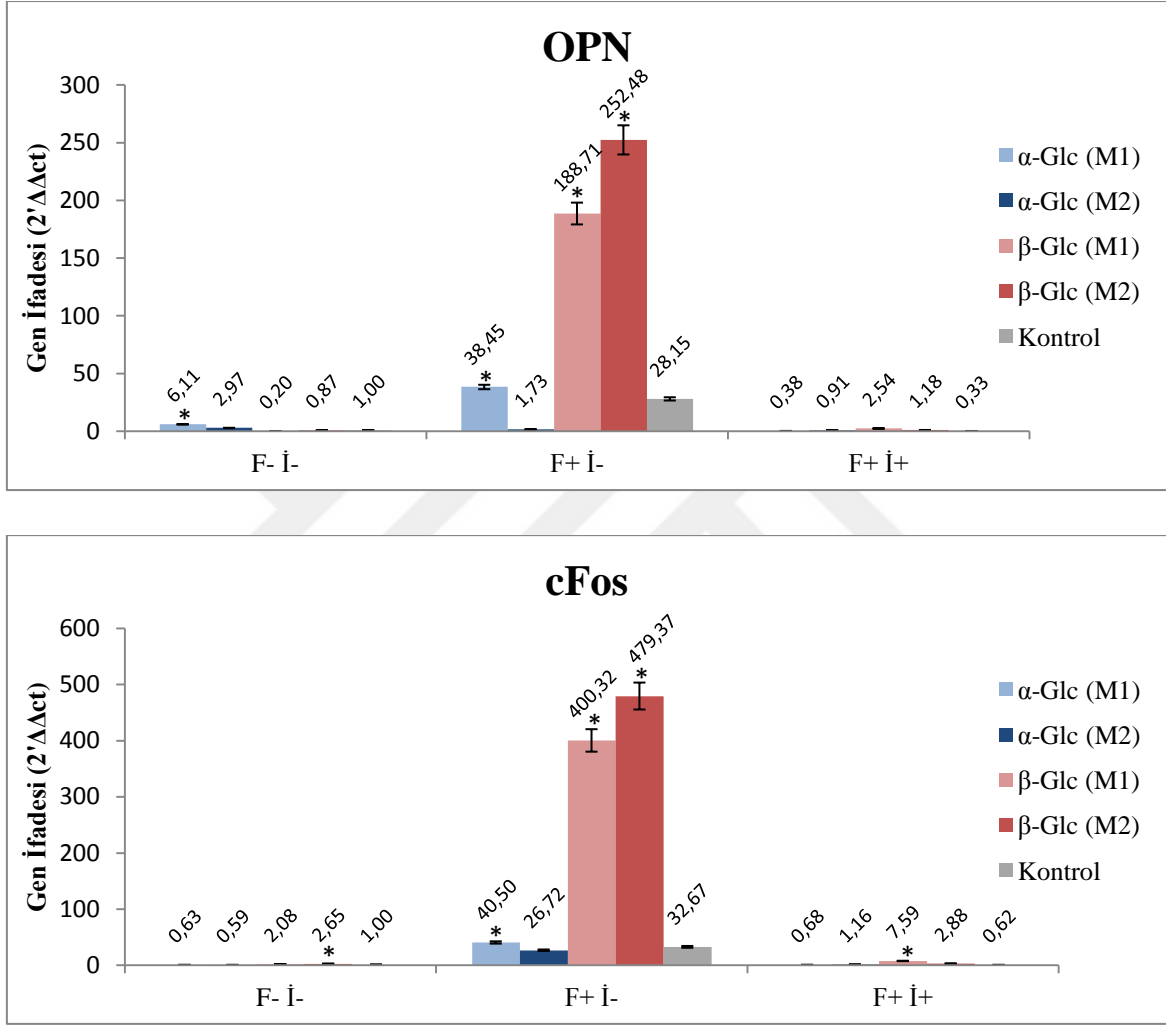
Çizim 4.11 Osteojenik farklılaştırmaya yönlendirilmiş iKİ-MKH'lerin BMP2/4 antikoru boyaması görüntüsü. Mavi: DAPI, kırmızı: BMP2/4 (TR). Ölçüm çubuğu: 50μm

Yapılan immün floresan boyama sonucu incelendiğinde (Çizim 4.11) birinci ve ikinci mantardan izole edilmiş olan α-glukanlarla kaplanmış yüzeye ekilerek osteojenik farklılaşmaya yönlendirilen iKİ-MKH'lerde BMP2 boyamasının kontrole göre daha fazla olduğu gözlemlenmektedir. Ancak hem birinci hem de ikinci mantardan izole edilmiş olan β-glukanlar ile kaplanmış yüzeylere ekilerek osteojenik farklılaşmaya yönlendirilen iKİ-MKH'lerde BMP2 boyamasının hem kontrole hem de α-glukan grubundaki hücelere göre daha yüksek oranda boyanma sergilediği gözlemlenmektedir.

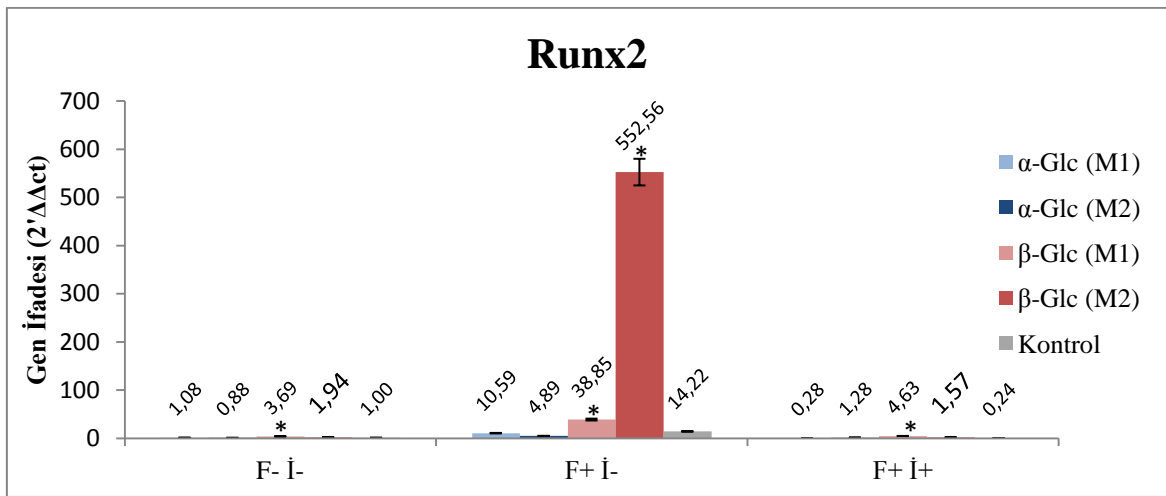
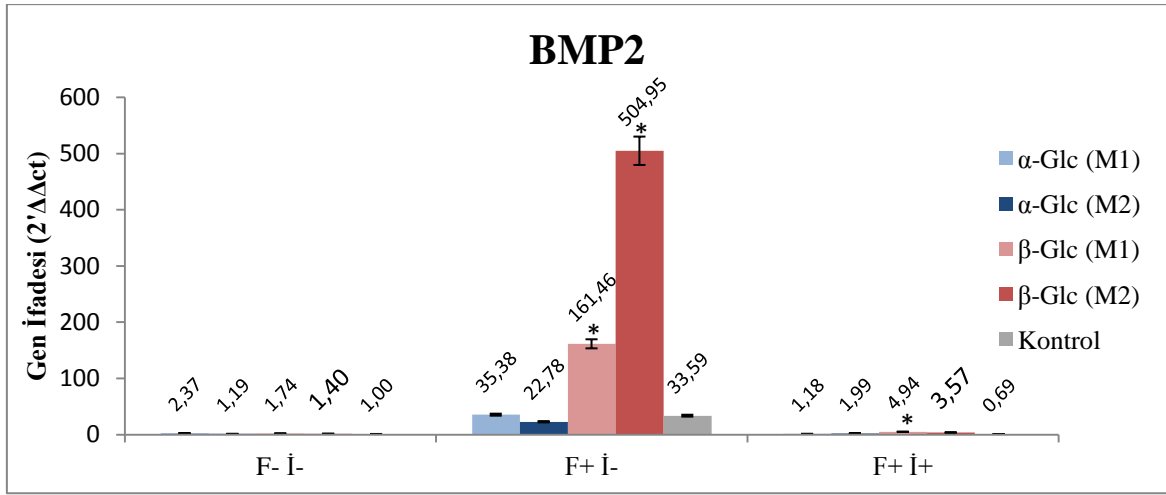
4.5.MAPK Sinyal Yolağı ile Osteojenik Farklılaşma İlişkisi

β-glukanların, hücredeki reseptörü olan laktozilseramidlere bağlanması sonucunda MAPK sinyal yolağında fosforilasyon yani dolayısıyla aktivasyon olduğu belirtilmiştir. MAPK sinyal yolağı ise bilindiği üzere, hücrede farklılaşmadan çoğalmaya, hücre canlılığında apoptozuna kadar pek çok hücrel aktivasyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada β-glukanların osteojenik farklılaşma üzerine etkilerinin MAPK sinyal yolağı üzerinden olup olmadığını tespit etmek amaçlanmıştır. Bu kapsamda yüzeyleri polisakkarit ile kaplı kültür kabına ekilen hücreler

21 günlük osteojenik farklılaşmaya alınarak besi ortamına MAPK sinyal yolağındaki p38 α 'yı hedef alan inhibitörü (SB 202190) kullanılmıştır. Bu süreç sonrasında yöntemler kısmında ifade edildiği şekilde gerçekleştirilmek üzere hücrelerin gen ifadelerinin seviyeleri kantitatif olarak tespit edilmiştir.



Çizim 4.12 Glukan kaplı yüzeylerde 21 gün boyunca osteojenik farklılaştırmaya alınan ve aynı zamanda p38 α inhibisyonu yapılan iKİ-MKH'lerde osteojenik farklılaşma ile ilgili olan genlerin ifadesinin analizi (p<0,05).



Çizim 4.12 (devamı) Glukan kaplı yüzlerde 21 gün boyunca osteojenik farklılaştırmaya alınan ve aynı zamanda p38α inhibisyonu yapılan iKİ-MKH'lerde osteojenik farklılaşma ile ilgili olan genlerin ifadesinin analizi (p<0,05).

Real Time PCR analizi sonucunda ortaya çıkan grafiğe bakıldığında (Çizim 4.12) osteojenik farklılaşma ile ilgili olan OPN, cFos, BMP2 ve Runx genlerindeki ifadenin artmış olduğu görülmektedir.

Yüzeyleri glukanlarla kaplanan kültür kabı üzerine ekilen hücrelerden sadece farklılaştırmaya alınmış olan grupta (F+ İ-), özellikle ikinci mantardan izole edilmiş olan β-glukan kaplı yüzeylere ekilen hücrelerde OPN gen ifadesinin kontrole göre yaklaşık 250 kat artmış olduğu gözlemlenmektedir. Buna kıyasla birinci mantardan izole edilen β-glukan kaplı yüzeye ekilmiş hücrelerde OPN gen ifadesinin ise kontrole göre yaklaşık 200 kat artmış olduğu gözlemlenmektedir (Çizim 4.12). Aynı deney grubunda ikinci mantardan izole edilmiş olan β-glukan kaplı yüzeylere ekilen hücrelerde cFos gen ifadesinin kontrole

göre yaklaşık 500 kat arttığı, birinci mantardan izole edilen β -glukan kaplı yüzeye ekilmiş hücrelerde ise yaklaşık 400 kat arttığı gözlemlenmektedir. Runx2 gen ifadesinin özellikle ikinci mantardan izole edilen β -glukan kaplı yüzeye ekilmiş hücrelerde diğer yüzeylere ekilmiş hücrelere göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve kontrole göre yaklaşık 550 kat artmış olduğu gözlemlenmektedir. BMP2 gen ifadesi ise ikinci mantardan izole edilen β -glukan kaplı yüzeye ekilmiş hücrelerde diğer yüzeylere ekilmiş hücrelere göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve yaklaşık 550 kat artmış olduğu, buna karşın birinci mantardan izole edilen β -glukan kaplı yüzeylerde kontrole göre yaklaşık 150 kat artmış olduğu gözlemlenmektedir (Çizim 4.12 devamı).

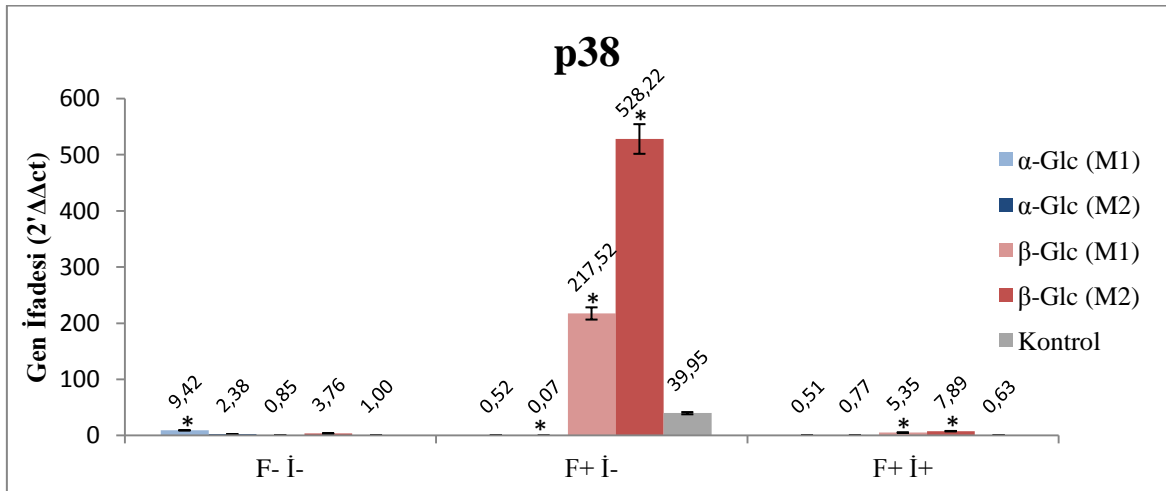
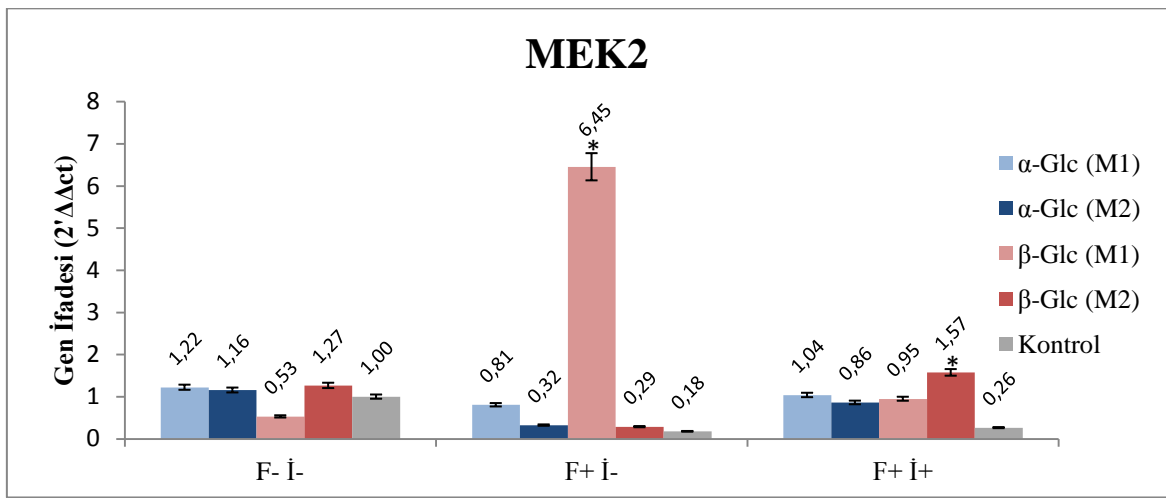
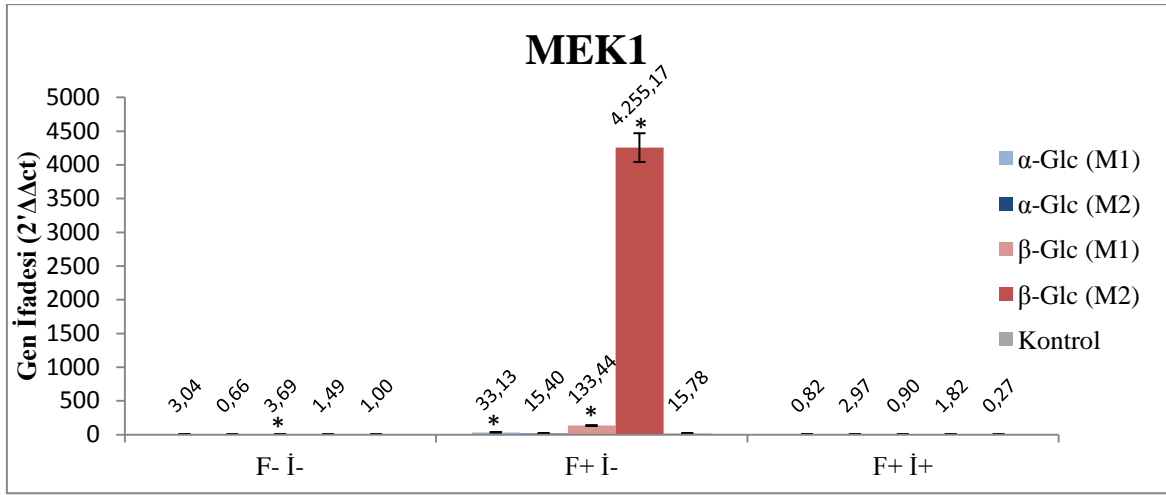
Diğer yandan, hem osteojenik farklılaştırmanın hem de p38 α inhibisyonunun yapıldığı(F+ İ+) grupta yüzeyleri β -Glukan ile kaplı kültür kaplarına ekilen hücrelerde gen ifadelerinin düşük olduğu görülmektedir.

Bir diğer grup olan, inhibitörün ilave edilmediği normal besi ortamında (F- İ-) β -glukan kaplı yüzeylerde kültür edilen hücrelerde de gen ifadelerinin düşük olduğu gözlemlenmektedir.

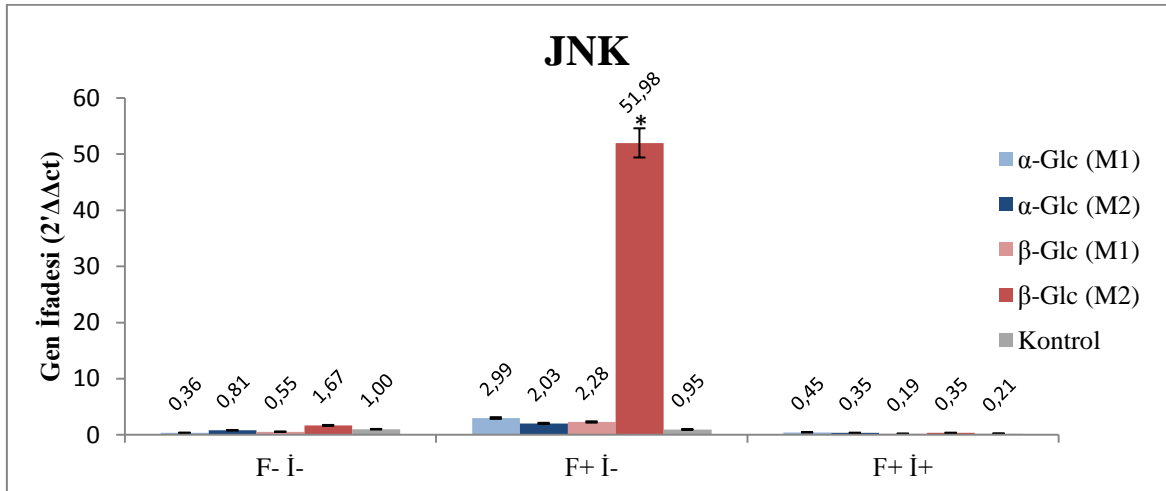
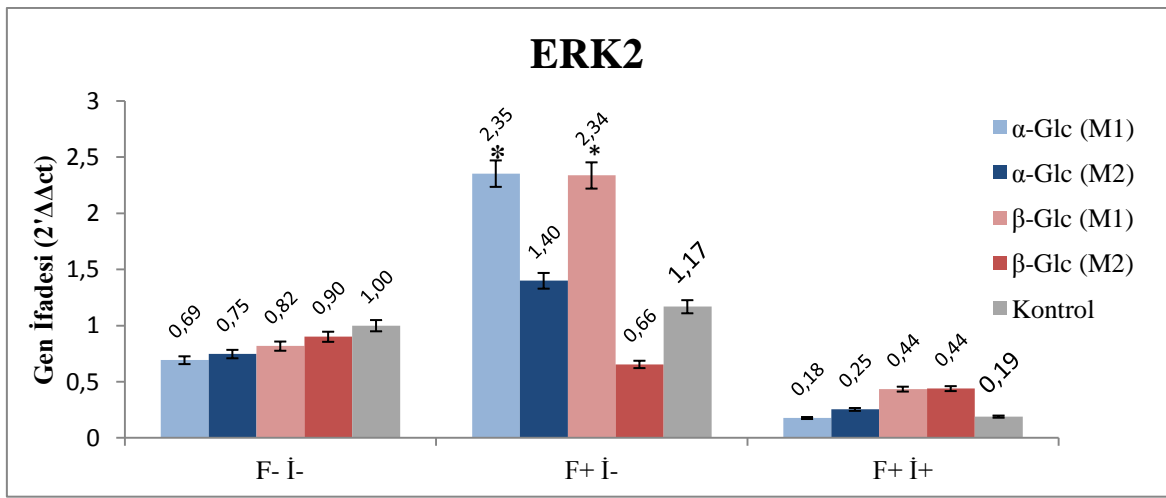
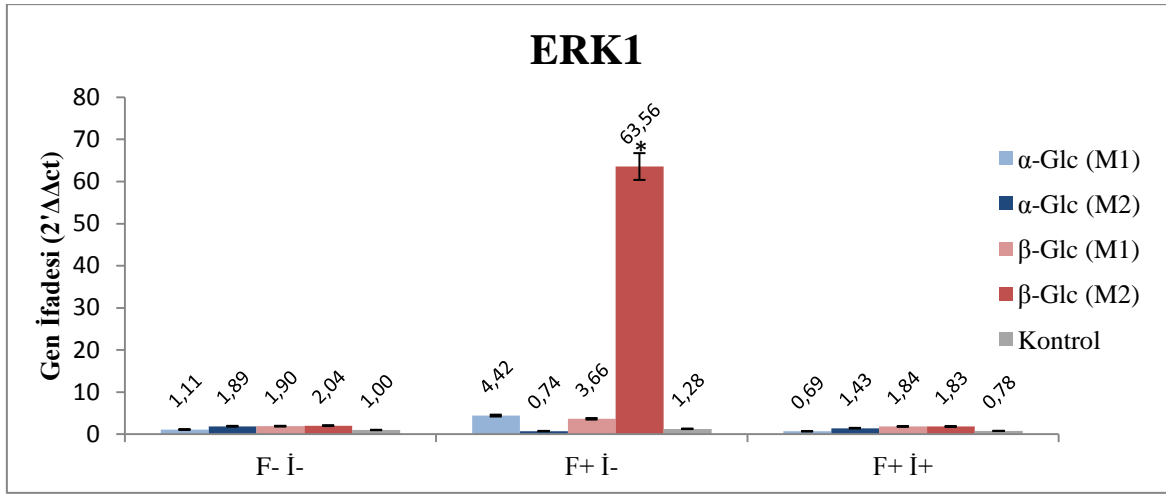
Yapılan bu gen ifadesi analizi, p38 inhibisyonunun osteojenik farklılaşmada önem arz eden bazı genlerin ifadelerinin azalmasına neden olduğunu göz önüne sermektedir. Bunun yanı sıra, Çizim 4.13'deki gen ifadesi analiz sonuçları incelendiğinde, özellikle inhibitörün kullanıldığı deney grubunda (F+ İ+) hem α -glukan hem β -glukan hem de kontrol yüzeyindeki hücrelerde MEK1, p38, ERK1 ve JNK gen ifadesinin düşük olduğu gözlemlenmektedir. Buna karşın aynı grupta α -glukan, β -glukan ve kontrol yüzeyindeki hücrelerde, birbirleri ile koordineli çalışan MEK2 ifadesinin yaklaşık 1 kat ve ERK2 gen ifadesinin yaklaşık 0,5 kat artmış olduğu gözlemlenmektedir.

Osteojenik farklılaştırmanın ve inhibisyonun yapılmadığı grupta (F- İ-), hem α -glukan hem β -glukan hem de kontrol yüzeyindeki hücrelerde MEK2 ve ERK2 gen ifadesi gözlemlenirken diğer gen ifadelerinin düşük olduğu görülmektedir.

Sadece osteojenik farklılaştırmanın yapıldığı grupta (F+ İ-) ikinci mantardan izole edilen β -glukan kaplı yüzeye ekilmiş hücrelerde MEK1, p38 α , ERK1 ve JNK gen ifadelerinin diğer yüzeylere ekilmiş hücrelere göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlenmektedir.

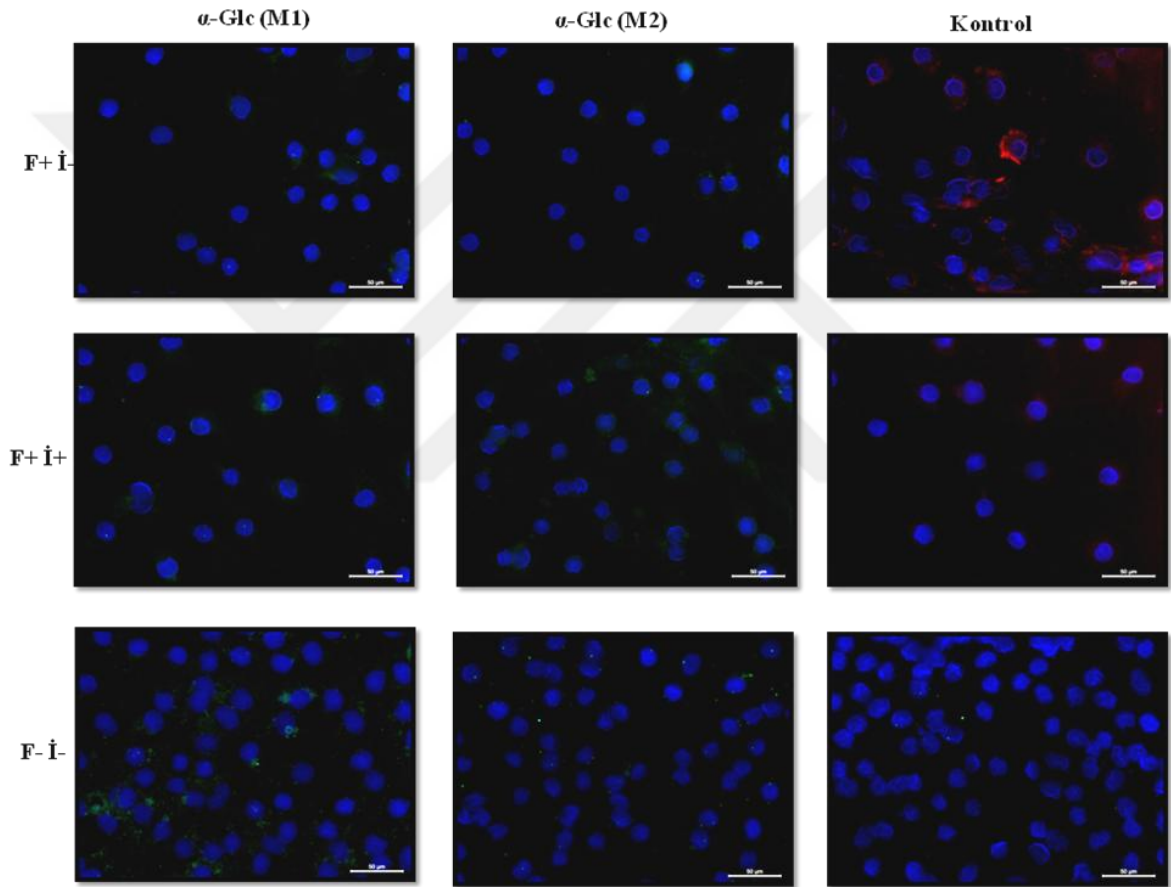


Çizim 4.13 Glukan kaplı yüzlerde 21 gün boyunca osteojenik farklılaştırmaya alınan ve aynı zamanda p38α inhibisyonu yapılan İKİ-MKH'lerde MAPK sinyal yolağında rol alan bazı proteinlerin gen ifadesinin analizi (p<0,05).



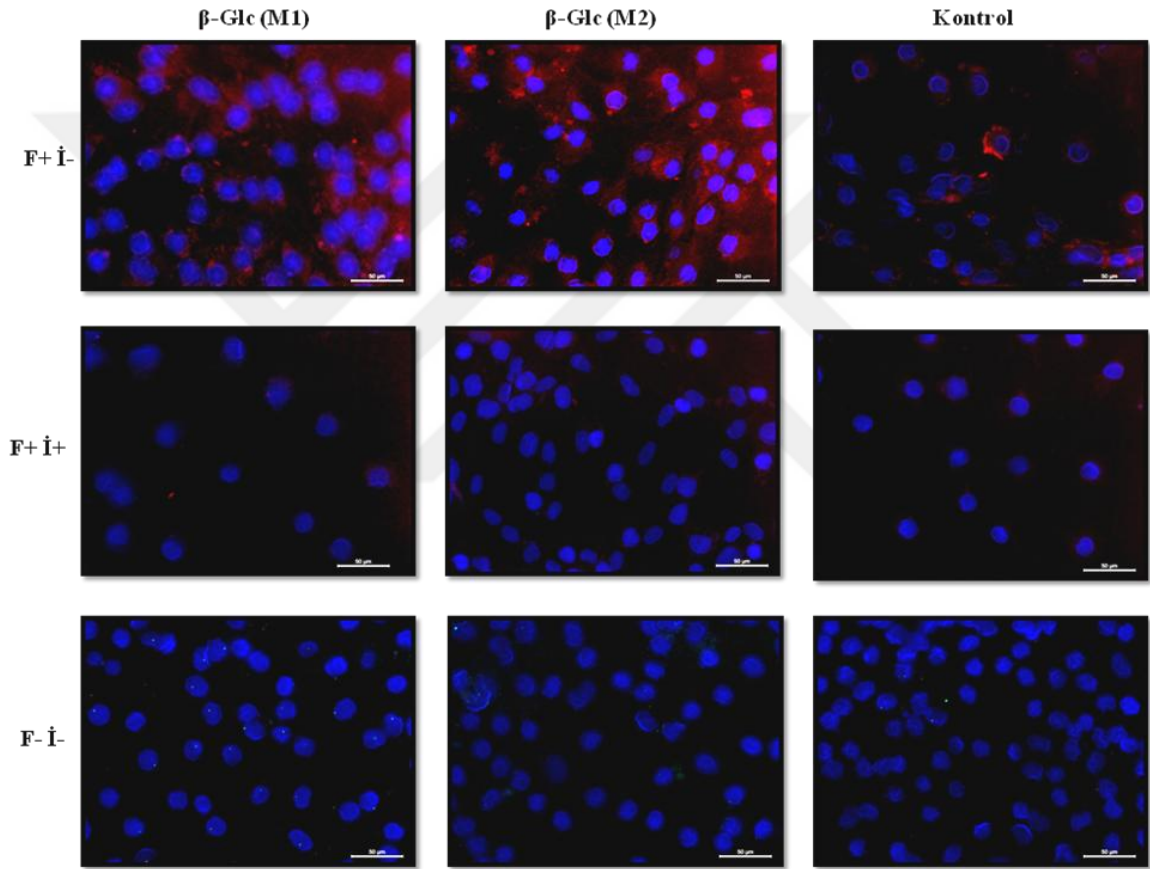
Çizim 4.13 (devam) Glukan kaplı yüzelerde 21 gün boyunca osteojenik farklılaştırmaya alınan ve aynı zamanda p38α inhibisyonu yapılan iKİ-MKH'lerde MAPK sinyal yolağında rol alan bazı proteinlerin gen ifadesinin analizi (p<0,05).

Gen ifadesi analizi haricinde, *P.ostreatus*'dan izole edilmiş olan α -glukanlar ve β -glukanlar ile kaplanmış olan yuvarlak cam lameller üzerine ekilen iKİ-MKH'ler normal kültür koşullarında(F- İ-), osteojenik farklılaşmaya yönlendirici besi ortamı koşullarında (F+ İ-) ve hem farklılaştırma hem de p38 inhibitörü eklenmiş besi ortamında(F+ İ+) 21 gün boyunca kültür edilmiştir. Ardından p38 α antikoru ile boyanmışlardır. Sonuçta ortaya çıkan boyama, floresan mikroskop altında Çizim 4.14 ve Çizim 4.15'de görülmekte olduğu gibidir.



Çizim 4.14 Osteojenik farklılaşmaya alınan iKİ-MKH'lerin İF boyama görüntüleri. α -Glukan kaplı yüzeyler üzerinde osteojenik farklılaştırma yapılan(F+ İ-), farklılaştırma yapılmadan normal kültür koşulları uygulanan(F- İ-) ve p38 inhibitörü (SB 202190) eklenerek farklılaşmaya alınan(F+ İ-) iKİ-MKH'lerin p38 alfa antikoru ile immün floresan işaretli ikincil antikor (yeşil:FITC, kırmızı:TR) kullanılarak floresan mikroskop kullanılarak alınan görüntüleri. Çerçek boyası: DAPI(mavi) Ölçüm çubuğu: 50 μ m

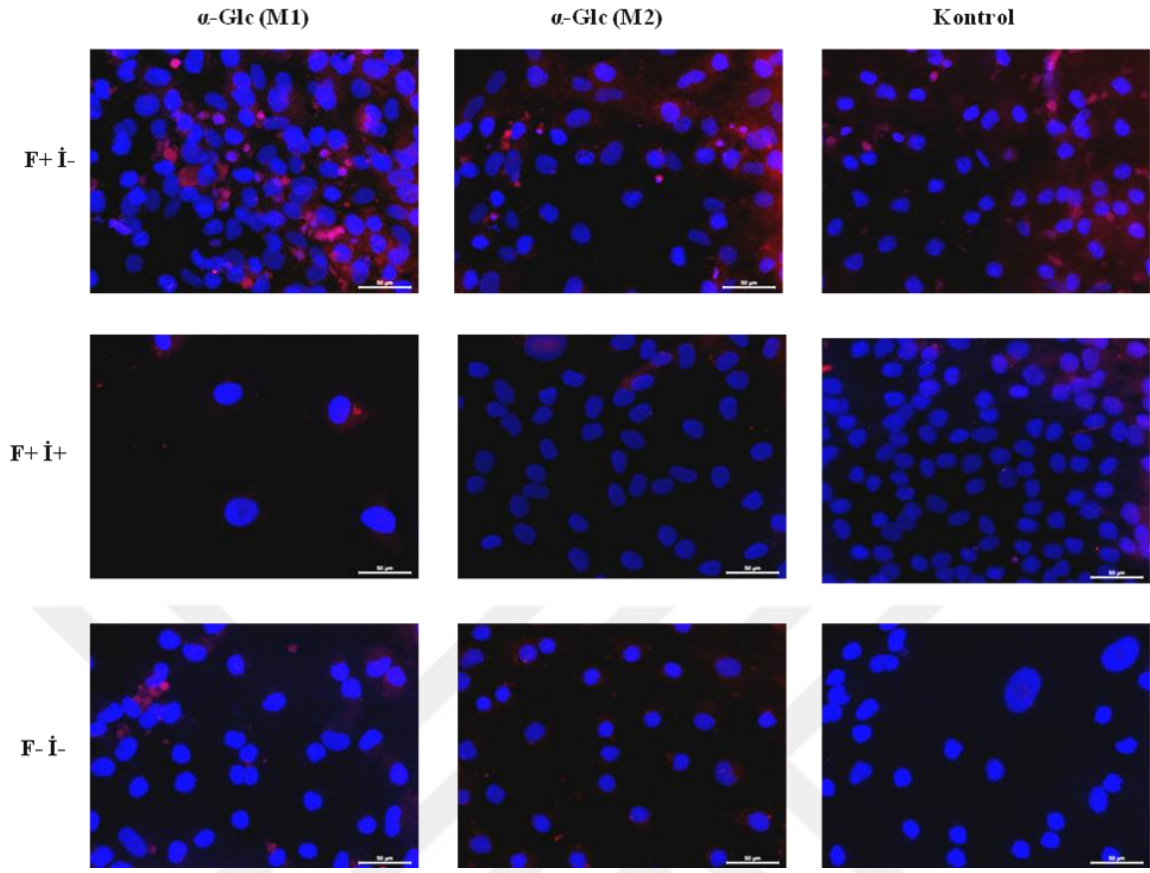
Çizim 4.14’de, p38 gen ifadesine benzer bir biçimde α -glukan (M1) ve α -glukan (M2) kaplı yüzeylerdeki hem farklılaşmanın hem de inhibisyonun yapılmadığı (F- İ-) hücrelerde p38 α boyaması kontrole göre daha fazla olduğu görülmektedir. Bununla beraber Hem farklılaşmanın hem de inhibisyonun (F+ İ+) yapıldığı hücrelerde ise, çok düşük bir miktarda da olsa boyama gözlemlenmiştir. Farklılaşmanın yapıldığı fakat inhibisyonun yapılmadığı (F+ İ-) hücrelerde ise kontrol grubuna göre çok daha az boyamanın olduğu gözlemlenmektedir.



Çizim 4.15 Osteojenik farklılaştırmaya alınan iKİ-MKH’lerin İF boyama görüntüleri. α -Glukan kaplı yüzeyler üzerinde osteojenik farklılaştırma yapılan(F+ İ-), farklılaştırma yapılmadan normal kültür koşulları uygulanan(F- İ-) ve p38 inhibitörü (SB 202190) eklenerek farklılaştırmaya alınan(F+ İ-) iKİ-MKH’lerin p38 alfa antikorı ile immün floresan işaretli ikincil antikor (yeşil:FITC, kırmızı:TR) kullanılarak floresan mikroskop kullanılarak alınan görüntüleri. Çekirdek boyası: DAPI(mavi) Ölçüm çubuğu: 50 μ m

β -glukan kaplı yüzeylerde kültür edilen ve sadece farklılaştırılmaya (F+ İ-) alınan hücreler kontrol grubundaki hücelere kıyasla çok daha fazla boyandığı görülmektedir. Bunun yanı sıra, hem farklılaştırma hem de inhibisyon yapılan (F+ İ+) hücrelerde ise gen ifadesi sonucu ile birbirini doğrular nitelikte kontrole göre daha fazla boyanmanın olduğu görülmektedir. Son olarak hem farklılaştırma hem de inhibisyon yapılmayan (F- İ-) gruptaki hücrelerde yine gen ifadeleri ile benzer şekilde β -glukan (M1)'in daha düşük, β -glukan (M2)'nin ise daha yüksek boyamanın olduğu gözlemlenmektedir (Çizim 4.15).

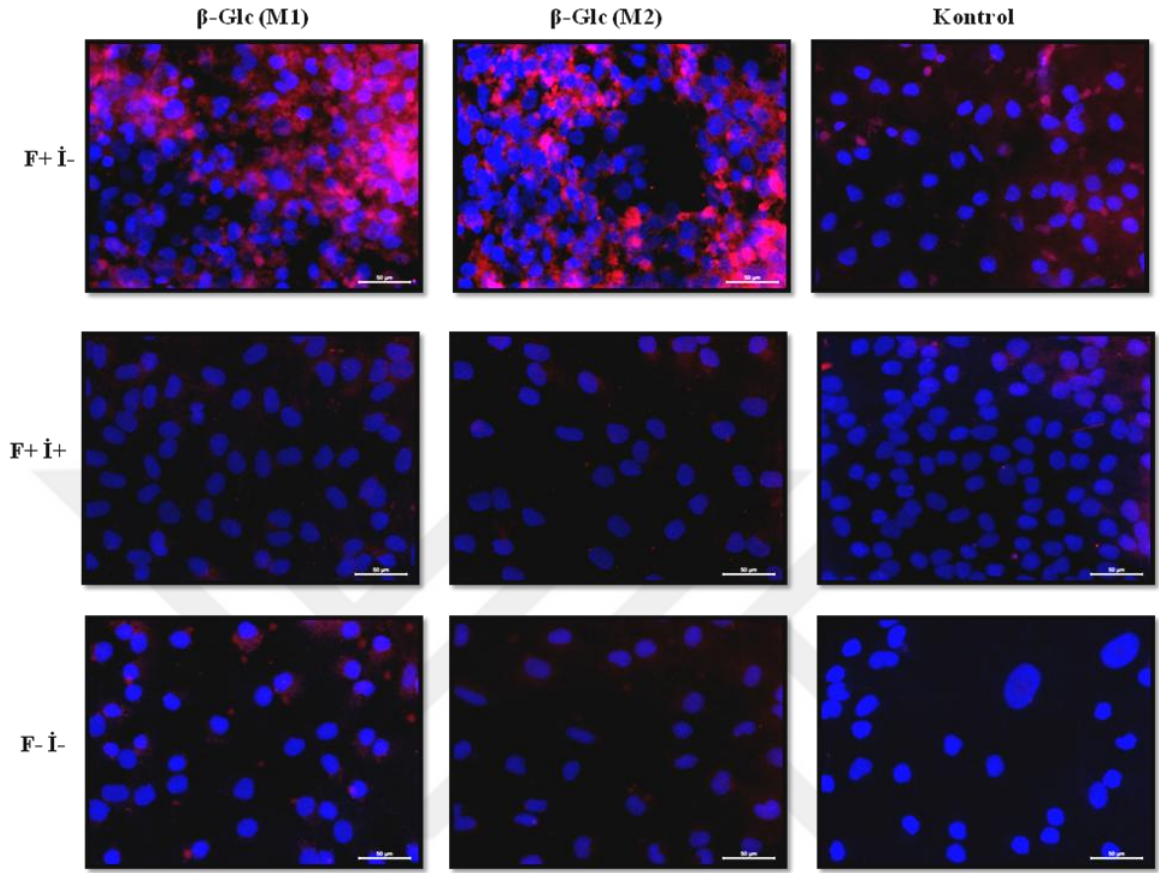
iKİ-MKH'lerin osteojenik farklılaşmaları üzerinde β -glukanların etkisini ve bu etkinin MAPK sinyal yolağı kaynaklı olup olmadığını anlayabilmek adına, MAPK sinyal yolağındaki MKK/MEK'lerin de inhibe edilmesi yoluna gidilmiştir. Bu sayede p38 dışında bir kaskatın da etkisini gözlemlemek mümkün olacaktır. Bu kapsamda *P.ostreatus*'dan izole edilen α -glukan ve β -glukan kaplı yüzeylere iKİ-MKH'ler ekilmiş ve bu hücreler normal kültür koşullarında, farklılaştırma ortamında ve MKK / MEK inhibitörünün (PD 98059) de eklendiğı farklılaştırma ortamında 21 boyunca kültür edilmiştir. Daha sonra fosfo ERK1/2 antikoru ile immün floresan boyama yapılmıştır. Sonuçta ortaya çıkan boyamalar Çizim 4.16 ve Çizim 4.17'de görülmekte olduğu gibi floresan mikroskop ile görüntülenmiştir.



Çizim 4.16 Osteojenik farklılaştırmaya alınan iKİ-MKH'lerin İF boyama görüntüleri. α -Glukan kaplı yüzeyler üzerinde osteojenik farklılaştırma yapılan(F+ İ-), farklılaştırma yapılmadan normal kültür koşulları uygulanan(F- İ-) ve MKK / MEK inhibitörü (PD 98059) eklenerek farklılaştırmaya alınan(F+ İ-) iKİ-MKH'lerin fofso erk1/2 antikorı ile immün floresan işaretli ikincil antikor (kırmızı:TR) kullanılarak floresan mikroskop kullanılarak alınan görüntüleri. Çekirdek boyası: DAPI(mavi) Ölçüm çubuğu: 50 μ m

PD 98059 inhibitörü ile MAPKK düzeyindeki inhibisyonun Erk 1/2'nin etkilenmiş olduğu çizim 4.16 ve çizim 4.17'de farklılaştırmanın ile beraber inhibisyonun yapıldığı (F+ İ+) hem α -glukan kaplı hem β -glukan kaplı hem de normal kültür kabı yüzeyine ekilmiş olan hücrelerde açık bir şekilde boyamanın olmaması durumu ile gözler önüne serilmektedir. Farklılaştırmanın olduğu, fakat inhibisyonun olmadığı (F+ İ-) gruplarda α -glukan kaplı yüzeylere ekilen hücrelerde boyanma oldukça düşük olduğu görülmektedir. β -glukan kaplı yüzeylere ekilen hücrelerde boyanma hem kontrol grubundan hem de α -glukan kaplı yüzeye ekilmiş olan hücrelerden çok daha fazla olduğu görülmektedir. Bununla beraber ne farklılaştırmanın ne de inhibisyonun yapılmadığı (F- İ-)

grupta Çizim 4.16 ve 4.17’de görülmekte olduğu gibi boyama kontrole göre nispeten fazla, fakat genel olarak boyamanın az olduğu gözlemlenmektedir.



Çizim 4.17 β -Glukan kaplı yüzeyler üzerinde osteojenik farklılaştırma yapılan(F+ I-), farklılaştırma yapılmadan normal kültür koşulları uygulanan(F- I-) ve MKK / MEK inhibitörü (PD 98059) eklenerek farklılaştırmaya alınan(F+ I-) iKİ-MKH’lerin fosfo erk1/2 antikoru ile immün floresan işaretli ikincil antikor (kırmızı:TR) kullanılarak floresan mikroskop kullanılarak alınan görüntüleri. Çekirdek boyası: DAPI(mavi) Ölçüm çubuğu: 50 μ m

5. TARTIŞMA

Yapılan bu çalışma ile *P.ostreatus*'dan α - ve β -glukanlar izole edilerek bir kaplama materyali olarak kullanılmış ve β -glukanın iKİ-MKH'lerin osteojenik farklılaşmaları üzerindeki etkisi ve MAPK sinyal yolağının bu etkileşimdeki rolü araştırılmıştır.

iKİ-MKH'ler mezoderm tabakasından köken almış olan adiposit, kondrosit ve osteoblastlara farklılaşma özelliğine sahip olması yanı sıra, enflamasyon bölgesine göç ederek oradaki immün sistem hücrelerini uyaran çeşitli aktiviteler sergileme özelliğine sahiptir. Bu özellikleri sayesinde günümüzde Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda ya da kırık hasarı gibi durumlarda doku rejenerasyonunun sağlanması ya da kemik iliği nakilleri sonrasında meydana gelen graft versus host hastalığına karşı klinik olarak tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Kim ve Cho, 2013).

Tümör, kaza ya da herhangi bir neden dolayısıyla meydana gelen doku kayıplarını tedavi etmek amacıyla günümüzde artık sadece kök hücreler değil, bu hücreleri destekleyecek insan vücudu ile uyumlu bir takım malzemeler de kullanılmaktadır. Örneğin kemik dokusunun rejenerasyonunu kuvvetlendirmek adına günümüzde biyoseramik tabanlı yapılar üzerinde çalışılmaktadır. Özellikle son birkaç yıldır Przekora'nın farklı bilim insanlarıyla yapmış olduğu çalışmalarda (2014a, 2014b, 2015, 2016a, 2016b, 2017a, 2017b) hidroksiapatit, kitosan ve biyoseramik ile beraber β -glukan'da içeren yapılar ile kemik dokusunun yenilenmesini hedefleyen çalışmalar yapmışlardır.

β -glukanlar, çok eski zamanlardan beri immün sistemi desteklemek, antitünör etkisinden faydalanmak ya da kolesterol düşürme özelliğinden faydalanmak üzere özellikle Asyalılar tarafından alternatif tıpta ve genel olarak farmakoloji biliminde sıklıkla kullanılmaktadır. Günümüzde bu polisakkaritlere karşı artan ilgi ve bununla ortantılı olarak artan çalışmalar sayesinde β -glukanların hücreler ile girmiş olduğu etkileşim ve buna bağlı olarak hücrede ya da vücutta meydana gelen etkiler gözlemlenebilmiştir. Yapılan literatür taraması sonucunda β -glukanların hücrelerde laktozilseramidler ile bağlantı kurduğu ve bunun sonucunda MAPK sinyal yolağında fosforilasyonu sağladığı tespit edilmiştir (Vetvicka ve Novak 2011).

Özellikle son yıllarda artan hücre sinyal yolları çalışmaları bizlere MAPK sinyal yolağının ozmatik stresten büyüme faktörlerine, sitokinlerden UV'ye dek pek çok uyaran tarafından aktive olarak birçok hücrel cevabın oluşturulmasında rol aldığını

göstermektedir. Bu cevaplardan biri olan hücre farklılaşması üzerinde de MAPK sinyal yolağının rol aldığı bilinmektedir.

Yapılan çalışmalar, MKH'lerin hücre kültürü ortamında osteojenik farklılaştırmaya yönlendirilmesinde kullanılan eklentilerin ve hatta özellikle bir glikokortikoid olan deksametazonun bir mitojen gibi davranarak MAPK sinyal yolağını aktive ettiğini işaret etmektedir (Jaiswal ve diğ. 2000). Dolayısıyla MKH'lerin osteojenik farklılaşmaları üzerinde MAPK sinyal yolağının etkisinin büyük olduğunu söylenebilir.

Sonuç olarak hem osteojenik farklılaştırma eklentilerinin ve özellikle de deksametazonun hem de β -glukanın MAPK sinyal yolağı aktivasyonu üzerindeki etkisi bu çalışmaya yön veren etkenlerdendir. Bu kapsamda, yapılan çalışmada β -glukanın MKH'lerin osteojenik farklılaşma üzerindeki etkisi ve bu etkinin MAPK sinyal yolağı ile bağlantısı araştırılmıştır.

Yapılan çalışmada kullanılacak olan β -glukan, ülkemizin de içinde bulunduğu ılıman iklimin hakim olduğu ülkelerde doğal olarak yetişmekte olan *P.ostreatus* türü mantardan Palacios ve diğ. (2012) izah etmiş oldukları izolasyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. İzole edilen β -glukan 1,3 glikozidik bağlar ile düz bağlanmış, 1,6 glikozidik bağlar ile de yan dallanmalar yapmış glikoz monomerlerine sahip bir yapıdadır. Çok çeşitli yapılara sahip olan β -glukanların izole edildiği kaynaktan izolasyon yöntemine, zincir yapısından zincir uzunluğuna dek pek çok farklı çeşitleri ve buna bağlı olarak da farklı etkileri söz konusudur (Rop ve diğ. 2009).

P.ostreatus'dan izole edilen α - ve β - glukanların tayini Megazyme firmasından alınan ve ticari bir ürün olan kit vasıtasıyla tespit edilmiş ve sonuçta kontrole yakın değerlerde bir miktarın elde edilmiş olduğu yapılan analiz ile tespit edilmiştir. Çizelge 4.3.'de birinci *P.ostreatus*'dan izole edilen β -glukanın (M1) kontrole göre ve diğer mantardan izole edilene göre bir miktar daha fazla olduğu gözlemlenmektedir. Bunun muhtemel sebepleri mantarın kültür ortamındaki yetiştirilme koşullarına bağlı olabilir. Diğer açıdan kitten çıkmış olan kontrol amaçlı kullanılan β -glukanın maya kaynaklı olmasından kaynaklanıyor olabilir. Çünkü daha önceden bahsedildiği gibi β -glukanlar izole edilmiş oldukları kaynakların türünden izolasyon yöntemine dek pek çok değişikliklerden etkilenmektedirler (Rop ve diğ. 2009).

MKH'ler ile β -glukanların arasındaki etkileşimin analiz edilebilmesi için izole edilmiş olan α - ve β - glukanlar hücre kültür kabı yüzeyini kaplamak üzere kullanılmışlardır. Kaplama materyali olarak kullanılan bu polisakkaritlerin hücre tutunmasını desteklemiş olduğu (Çizelge 4.5.) dahası hücrelerin üzerinde toksik bir

etkilerinin olmadığı analiz edilmiştir (Çizelge 4.6). Bunun ardından hücre proliferasyonu üzerinde Çizelge 4.7’de de gösterilmiş olduğu gibi olumsuz bir etkiye neden olmadıkları gözlemlenmektedir. 5.günde meydana gelmiş olan hücre sayısındaki düşüşün nedeni, 0., 2., ve 4., günlerde neredeyse iki kat artmış olan hücre sayısı nedeniyle, kültür kabı yüzeyinin artan hücre sayısını karşılayamayan kapasitesi dolayısıyla hücrelerin bulunduğu yüzeyden kalkmalarından kaynaklanmış olması muhtemeldir. 6. Günde ise kültür kabında açılmış olan yerleri çoğalmaya devam eden hücrelerin kaplaması ya da kalkan hücrelerden bazılarının yeniden tutunması dolayısıyla toplam hücre sayısının artmış olması muhtemeldir.

α -Glukan ve β -Glukan ile kaplanmış hücre kültür kapları üzerine ekilen iKİ-MKH’ler 21 gün süren osteojenik farklılaştırılmaya alınmış ve buna bağlı olarak hücrelerin farklılaşmaları, çeşitli analizlerle tespit edilmiştir. Çizim 4.8’de gözlemlendiği üzere hücrelerde ilk 7.günde osteojenik farklılaşmanın erken belirteçlerinden olan ALP aktivitesi seviyesi artmıştır. 21.gün sonunda ise Çizim 4.9’da gözlemlendiği üzere α -glukan kaplı yüzeylerde ve kaplama yapılmamış olan normal kültür kabı üzerine ekilerek osteojenik farklılaştırmaya alınan hücrelerdeki farklılaşma, Alizarin Red S boyaması ile ışık mikroskobu vasıtasıyla görüntülenmiştir. Sonuçta hem α -Glukan kaplı yüzeylerdeki hücreler hem de kaplanmamış yüzeydeki hücreler pozitif boyanmış ve dolayısıyla bu boyama ile ekstraselüler matriksteki kalsiyum kristallerinin varlığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde β -glukan kaplı yüzeylere ekilen hücreler de Alizarin Red S ile boyanmış ve Çizim 4.10’da görülmekte olduğu gibi pozitif sonuç vermiştir.

α -Glukan ve β -Glukan ile kaplanmış hücre kültür kapları üzerine ekilen iKİ-MKH’lerin osteojenik farklılaştırma süreci sonunda, kemik ve diş gibi dokularda mineralize olmuş matriks dokusunun düzenlenmesinde rol oynayan OPN geninin ifadesi (Sodek ve diğ. 2000) ve kemik dokusu oluşumunun düzenlenmesinde rol oynayan (McCabe ve diğ. 1995) cFos’un gen ifadesi miktarları RT-PCR ile analiz edilmiştir. Çizim 4.10’da gözlemlendiği üzere özellikle *P.ostreatus*’dan izole edilen β -glukan ile kaplanan yüzeylere ekilerek osteojenik farklılaşmaya yönlendirilen hücrelerde OPN gen ifadesi, kontrolden yaklaşık 35 kat daha fazladır. Buna karşın cFos geni ifadesi kontrol olarak kullanılan β -glukan ile kaplanmış yüzeye ekilen hücrelerde, *P.ostreatus*’dan izole edilen β -glukan ile kaplanmış yüzeye ekilen hücrelerden yaklaşık 20 kat daha fazla olduğu gözlemlenmektedir. *P.ostreatus*’dan izole edilen β -glukan ile kaplanmış yüzeye ekilen hücrelerdeki cFos gen ifadesinin ise kontrolden yaklaşık 2 kat fazla olduğu görülmektedir. Bunun nedeni kontrol olarak kullanılan β -glukanın maya kaynaklı olmasına bağlı olabilir.

Fakat bilhassa gen ifadesi sonuçları doğrultusunda, özellikle β -glukan ile kaplı yüzeylerin, hiç kaplanmamış yüzeylere kıyasla osteojenik farklılaşmayı daha iyi desteklediği açık bir şekilde görülmektedir.

Ayrıca yapılan immün floresan boyama sonucu incelendiğinde (Çizim 4.11) hem birinci hem de ikinci mantardan izole edilmiş olan β -glukanlar ile kaplanmış yüzeylere ekilerek osteojenik farklılaşmaya yönlendirilen iKİ-MKH'lerde BMP2/4 boyamasının hem kontrole hem de α -glukan grubundaki hücelere göre daha yüksek oranda olduğu gözlemlenmektedir. Buna karşın, D) ve E) resminde görülen hücrelerin tamamında değil, bir kısmında boyamanın olduğu görülmektedir. Bunun nedeninin ise, polisakkaritlerin tüm kültür kabına homojen olarak dağılmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak çalışmanın ilk aşamasını oluşturan kısımda, β -glukanların iKİ-MKH'lerin osteojenik farklılaşma koşulları altında farklılaşma potansiyellerini arttırdığı gözlemlenmiştir.

Lin ve diğ. (2013) yapmış oldukları çalışmada da ifade etmiş oldukları gibi, p38 inhibitörü ve ERK inhibitörü osteojenik farklılaşmaya dair genlerin ifadesinde düşüşe neden olmaktadır. Dolayısıyla MAPK sinyal yolağının, hücrelerin osteojenik farklılaşmaları üzerinde etkisinin olduğu açıktır.

Tarafımızca yapılan bu çalışmada, iKİ-MKH'lerin osteojenik farklılaşmaları üzerinde glukanların olumlu etkiye sahip olduğu sonucuna vardıldıktan sonra bu etkinin MAPK sinyal yolağı üzerinden olup olmadığı tespit edilmiştir. Bunun için MAPK sinyal yolağındaki p38 ve MKK/MEK kaskatının aktivasyonunu engellemek adına SB202190 ve PD98059 inhibitörleri kullanılmıştır. p38 kaskatı hücre canlılığı için de oldukça önemli olduğu için, kullanılacak dozun hücreyi apoptoza yönlendirmeyecek miktarda olması bu çalışma için oldukça önemlidir. Bu kapsamda hücre besi ortamındaki yoğunluğu $5\mu\text{M}$ olacak şekilde ayarlanmak kaydı ile inhibisyon yapılmıştır. Nemoto ve diğ. (1998) yapmış olduğu çalışmaya göre bu oran inhibitörün %20 aktivite göstermesini sağlarken %20'den çok daha az hücre ölümüne neden olacaktır. Dolayısıyla bu miktar hem hücrelerin canlılığını koruyabilmek hem de belirli bir oranda inhibisyonu sağlayabilmek için bu çalışmada tercih edilmiştir. Aynı şekilde MKK/MEK inhibisyonu için kullanılan PD98059 inhibitörü ise Lin ve diğ. (2013) de yaptıkları çalışmada kullanmış oldukları gibi, besi ortamında $10\mu\text{M}$ yoğunluğunda inhibitör olacak şekilde inhibisyon yapılmıştır.

α -glukan ve β -glukan kaplı yüzeyler üzerine ekilen iKİ-MKH'ler sadece osteojenik farklılaştırma eklentileri ilave edilmiş besi ortamı (F+ İ-); osteojenik farklılaştırma eklentileri ile beraber p38 inhibitörünün de eklenmiş olduğu besi ortamı (F+

İ+) ve kontrol olarak; osteojenik farklılaştırma eklenmelerinin ve p38 inhibitörün ilave edilmediği bazal besi ortamında (F- İ-) 21 gün boyunca kültür edilmiştir. Süreç sonunda hücrelerin gen ifadesi analizleri yapılmış (Çizim 4.12 ve Çizim 4.13) ve bunun yanı sıra immünfloresan boyama yapılarak floresan mikroskopta görüntüleri alınmıştır (Çizim 4.14 ve Çizim 4.15).

Çizim 4.12’de gösterilmiş olan gen ifadesi analiz sonucu incelendiğinde sadece osteojenik farklılaştırmanın yapıldığı grupta özellikle ikinci mantardan izole edilmiş olan β -glukan ile kaplanmış yüzeye ekilen hücrelerde kontrole ile kıyaslandığında OPN gen ifadesinin $252,5 \pm 7,6$ kat, cFos gen ifadesinin $479,4 \pm 23,9$ kat artmış olduğu görülmektedir. Diğer yandan birinci mantardan izole edilmiş olan β -glukan kaplı yüzeylere ekilmiş olan hücrelerde kontrole göre OPN gen ifadesinin $188,8 \pm 7,5$ kat, cFos gen ifadesinin $400,3 \pm 16,0$ kat artmış olduğu görülmektedir. Fakat α -glukan kaplı yüzeylere ekilmiş hücrelerdeki hem OPN hem de cFos gen ifadelerinin, kontrolden anlamlı bir farkı olmadığı görülmektedir.

Bir büyüme faktörü olan BMP2 (kemik morfojenetik protein), alkalen fosfataz aktivitesini indükleyen osteojenik farklılaşma belirteçlerinden birisidir (Legard ve Schluter 2010). Dahası günümüzde rekombinant insan BMP2 2002, 2004, 2007 yıllarında FDA tarafından spinal füzyon, açık tibia kırıkları ya da oyuk dişlerin tedavisinin yapılmasında klinik olarak uygulanabilirliği konusunda onay verilmiştir (Schmidt-Bleek ve diğ. 2016). Diğer yandan Runx2 ise farklılaşma süreci boyunca osteoblasta spesifik bütün genlerin (osteokalsin, tip I kollajen a3, kemik siyaloprotein, alkalen fosfataz, osteopontin ve kollajenaz III) promotör bölgelerine bağlanarak bunların gen ifadelerini kontrol eden temel düzenleyici özelliğine sahip osteo-spesifik bir transkripsiyon faktörüdür (Scheurer 2013). Osteojenik farklılaşmada oldukça önemli olan bu iki genin ifadelerine de bakıldığında; sadece farklılaştırma yapılan (F+ İ-) grupta, özellikle ikinci mantardan izole edilmiş olan β -glukan ile kaplanmış yüzeye ekilen hücrelerde kontrole ile kıyaslandığında Runx2 gen ifadesinin $552,6 \pm 22,1$ kat, BMP2 geninin ise $504,9 \pm 20,1$ kat artmış olduğu görülmektedir (Çizim 4.12 devam). Bunun yanı sıra birinci mantardan izole edilmiş olan β -glukan kaplı yüzeylere ekilmiş olan hücrelerde kontrole göre BMP2 geninin $161,5 \pm 4,8$ kat, Runx2’nin ise $38,8 \pm 1,2$ kat artmış olduğu görülmektedir.

Farklılaştırma ve inhibisyonun yapılmadığı grupta (F- İ-) ve hem farklılaştırmanın hem de inhibisyonun yapıldığı grupta (F+ İ+) tüm yüzey tiplerine ekilen hücrelerdeki OPN, cFos, Runx2 ve BMP2 gen ifadelerinin kontrol ile anlamlı farklı olmadığı görülmektedir. Dolayısıyla yapılan bu gen ifadesi analizi sonucunda p38 inhibisyonunun

farklılaştırma eklentisi olsa dahi hücrelerin osteojenik farklılaşmaya yönleneemediğini ortaya çıkmıştır. Carballo ve diğ. (2016) yapmış oldukları çalışmada, p38 MAPK'ın osteojenik farklılaşmanın farklı evrelerinde kritik rol oynadıklarını ve in-vivo p38 delesyonunun osteoblast farklılaşmasını engellediğini ifade etmişlerdir.

Yapılan gen ifadesi analizi sonucunda osteojenik farklılaştırma ortamında, β -glukanların iKİ-MKH'lerin osteojenik farklılaşmalarını artırıcı bir etkisi olduğu ortaya koyulmuştur. Ancak p38 inhibisyonu varlığında gerçekleştirilen farklılaştırma işleminde hücreler β -glukan kaplı yüzeylere ekilmiş olsalar dahi farklılaşmaya gidemediği gözlemlenmektedir. Bu doğrultuda p38'in, MKH'lerin farklılaşmasında önemli bir etken olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.

Yapılan çalışmada p38 inhibisyonu sonucunda MAPK sinyal yolağında yer alan proteinlerin gen ifadeleri de analiz edilmiş ve analiz sonuçları Çizelge 4.13'de gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda hücre canlılığından apoptozuna ve farklılaşmasından çoğalmasına birçok hücresel cevabın oluşmasında rol alan MAPK sinyal yolağı elemanlarının p38 inhibisyonundan nasıl etkilendiği gözlemlenmiştir. Her ne kadar p38'in inhibisyonu hedef alınmış olsa da MAPK sinyal yolağında yer alan diğer proteinlerin de ifadelerinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. Çizelge 4.13'de gösterilmekte olan grafikten anlaşılacağı gibi sadece farklılaştırma işlemi (F+ İ-) yapılan grupta ikinci mantardan izole edilmiş olan β -glukan (M2) kaplı yüzeylere ekilmiş hücrelerde MEK1 ifadesinin kontrole göre $4255,2 \pm 170,2$ kat, p38 α ifadesinin ise $528,2 \pm 19,5$ kat, artmış olduğu fakat MEK2 ifadesinin kontrolden anlamlı derece farkı olmadığı gözlemlenmektedir ($p < 0,05$). Birinci mantardan izole edilmiş olan β -glukan kaplı yüzeylere ekilen hücrelerde ise MEK1 ifadesi kontrolden $133,4 \pm 5,3$ kat, p38 α ifadesi $217,5 \pm 8,7$ kat fazla iken, MEK2 ifadesi kontrolden $6,45 \pm 0,2$ kat daha fazla artmış olduğu gözlemlenmektedir. Farklılaştırma eklentisinin ve inhibitörün eklenmediği grupta (F- İ-) ve hem farklılaştırma eklentisinin hem de inhibitörün bulunduğu grupta (F+ İ+) tüm yüzeylere ekilmiş hücrelerde MEK1 gen ifadesi ve p38 α ifadesi kontrole göre anlamlı bir ifade taşımamaktadır.

Osteojenik farklılaştırmanın yapıldığı grupta MEK1 ile MEK2'nin gen ifadelerinin birbirinden farklı olduğu ve MEK1 ifadesinin MEK2'den anlamlı derece fazla olduğu gözlemlenmektedir (Çizim 4.13). Bunun ise karakterize edilmiş çeşitli iskele proteinlerinin özellikle MEK1'e bağlanıp onu aktive ederken MEK2'ye bağlanmamalarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Bélanger ve diğ. 2003), (Kolch, 2005), (Yin ve diğ. 2004).

Gen ifadesi analizi incelendiğinde sadece farklılaştırmanın yapıldığı grupta (F+ İ-) özellikle ikinci mantardan izole edilmiş olan β -glukan ile kaplanmış yüzeye ekilen hücrelerde ERK1'in $63,5 \pm 2,5$ kat ve Jnk'nın da $51,9 \pm 2,1$ kat artmış olduğu gözlemlenmektedir. Buna karşın ERK2 ifadesi diğerlerinden daha düşüktür. Diğer yandan birinci mantardan izole edilen β -glukan ile kaplı yüzeylere ekilen hücrelerde anlamlı derece ERK1 ve Jnk gen ifadesi gözlemlenmezken, ERK2 ifadesi anlamlı derece yüksektir.

MAPK sinyal yolağına dair yapılan gen ifadesi analizi incelendiğinde, MAPKK düzeyindeki MEK1 ifadesinin MAPK düzeyindeki ERK1/2 ye göre oldukça yüksek olduğu gözlemlenmektedir. Bu, ERK1 ve 2'nin Serin Treonin aktivasyon bölgelerinin her ikisine de bağlanma gerçekleştiğinde aktive olmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca, Cesar ve diğ. (2007) yapmış olduğu çalışmada ortaya koydukları bilgiye göre p38 α 'nın izoformu olan Mxi2, p38 MAPK'lardan ziyade ERK1/2 MAPK'lara bağlanmaktadır. Bu doğrultuda, p38 α 'da yapılan inhibisyon, izoformu olan Mxi2'nin inhibisyonuna ve dolayısıyla ERK1/2'nin daha düşük düzeyde aktivasyonuna ve buna bağlı olarak daha düşük gen ifadesinin ortaya çıkmasına neden olmuş olabilir.

Osteojenik farklılaştırmanın ve p38 α inhibisyonunun yapılmadığı (F- İ-) grupta, tüm yüzey türlerine ekilen hücrelerde ERK1 ve Jnk gen ifadelerinin birbirlerine genel olarak yakın olduğu gözlemlenmektedir. ERK2 gen ifadesinin ise kontrole göre daha düşük olduğu gözlemlenmektedir.

Hem osteojenik farklılaştırmanın hem de p38 α inhibisyonunun yapıldığı grupta ise, tüm yüzey çeşitlerine ekilmiş hücrelerde ERK1 ve Jnk gen ifadesinin düşük olduğu gözlemlenmektedir. Ancak ERK2 gen ifadesinin β -glukan kaplı yüzeylere ekilmiş hücrelerde kontrolden yaklaşık iki kat fazla olduğu gözlemlenmektedir. Bunun nedeninin gen ifadesi analizi göz önünde bulundurulduğunda, MEK2 varlığına bağlantılı olarak hücrede ERK2 gen ifadesinin meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir.

MAPK sinyal yolağı üyelerinden olan p38 α 'nın hücrede bulunduğu konum hakkında belirsizlikler söz konusudur. Raingeaud ve ark. (1995) yapmış oldukları çalışmada, herhangi bir strese ya da uyarana maruz bırakılmayan hücrelerde p38 α 'yı hem sitoplazmada hem de çekirdekte; UV ile uyarılan hücrelerde ise sitoplazmada lokalize olduğunu, aktive olan p38 α 'nın ise perinükleer bölge yakınlarına doğru hareket ettiklerini gözlemlemişlerdir. Diğer yandan bazı kaynaklarda ise çevresel bir uyarana maruz bırakılmayan hücrelerde de hem sitoplazmada hem de nükleusta p38 α 'nın varlığından söz edilmektedir (Roux ve Blenis 2004).

Yapılan bu çalışmada α - ve β -glukan kaplı yüzeyler üzerine ekilerek sadece osteojenik farklılaştırmaya alınan (F+ İ-), hem farklılaştırmaya alınıp hem de p38 α inhibisyonu yapılan (F+ İ+) ve ne farklılaştırmaya ne de inhibisyona uğratılan (F- İ-) iKİ-MKH'lerdeki p38 α varlığı, antikor boyaması yapılarak floresan mikroskopta görüntülenmiştir. Çizim 4.14'de herhangi bir kaplama ve de osteojenik farklılaştırma eklentileri gibi bir mitojene maruz bırakılmamış olan yani kontrol olarak kullanılan (F- İ-) hücrelerde p38 α boyaması neredeyse hiç yoktur. Oysaki α -glukan kaplı yüzeylerdeki hücrelerde farklılaşma ve inhibisyon yapılmamasına rağmen, çekirdek etrafında ve sitoplazmada p38 α boyamasının olduğu görülmektedir. Dolayısıyla bu durum, hücrelerin α -glukanlarla etkileşime girdiğini ve dolayısıyla hücrel bir tepki olarak p38 α 'da bir artışın meydana geldiğini düşündürmektedir. Hem farklılaştırmanın hem de p38 inhibisyonun (F+ İ+) yapıldığı grupta kontrol grubundaki hücrelerde de α -glukan kaplı yüzeylere ekilen hücrelerde de inhibisyon olmasına karşın düşük bir miktarda p38 α boyamasının varlığı görülmektedir. Bu durum ise kullanılan inhibitörün neredeyse %20'lik etki sağlayabileceği düşük yoğunluktaki bir dozda kullanılmasından kaynaklanıyor olabilir. Sadece farklılaştırmanın uygulandığı grupta (F+ İ-) ise α -glukan kaplı yüzlerde kültüre edilen hücrelerdeki p38 α boyamasının kontrole göre daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum, p38'in dört izoformu olması dolayısıyla α -glukanların belki de p38 α üzerinden hücrede bir sinyal akışına neden olmadığı düşüncesini akıllara getirebilir.

Oysaki Çizim 4.15'de de görüleceği gibi α -glukanlara göre iKİ-MKH'lerin β -glukanlar ile etkileşimleri oldukça farklıdır. Hem farklılaştırmanın hem de inhibisyonun yapıldığı grupta (F+ İ+) her iki tür β -glukan kaplı yüzeylere ekilmiş olan hücrelerdeki boyamanın kontrolden anlamlı derecede yüksek olmadığı gözlemlenmektedir. Diğer yandan sadece farklılaştırmanın yapıldığı (F+ İ-) grupta β -glukan kaplı yüzeyler üzerine ekilmiş olan hücrelerdeki hem sitoplazmada hem de çekirdek etrafında p38 α boyamasının kontrole göre oldukça yoğun olduğu görülmektedir. Gen ifadesi analizinde p38 α 'nın kontrole göre anlamlı derece yüksek olduğu Çizim 4.13'de de gözlemlenmektedir. Farklılaştırmanın ve inhibisyonun yapılmadığı grupta ise (F- İ-) hem β -glukan kaplı yüzeylerde hem de kontrolde anlamlı bir p38 α boyamasının olmadığı ve gen ifadesi analizi ile orantılı bir sonuç ortaya çıktığı gözlemlenmektedir.

Yapılan bu çalışmada, osteojenik farklılaştırmaya yönlendirilen iKİ-MKH'ler üzerinde β -glukanların etkisinin MAPK sinyal yolağı üzerinden olup olmadığı anlaşılması adına p38 α inhibisyonu haricinde MKK/MEK inhibisyonu da yapılmıştır. 21 boyunca

farklı şartlar altında kültür edilen hücreler fosfo erk1/2 antikor boyaması yapılarak floresan mikroskopta görüntülenmiş ve bu görüntüler Çizim 4.16 ve Çizim 4.17’de sergilenmiştir.

Sadece farklılaştırmaya alınarak (F+ İ-) α -glukan kaplı yüzeylere ekilmiş olan hücrelerdeki fosforile olmuş erk1/2’nin hem kontrol hücrelerindeki boyamaya göre anlamlı derecede daha yoğun boyanmış olduğu görülmektedir (Çizim 4.16). Hem farklılaşmanın hem inhibisyonun yapıldığı (F+ İ+) grupta tüm yüzey türlerine ekilen hücrelerde benzer derece düşük miktarda boyama gözlemlenmektedir. Buna karşın farklılaşmanın ve inhibisyonun yapılmadığı (F- İ-) grupta α -glukan kaplı yüzeylere ekilmiş olan hücrelerde fosforile olmuş ERK1/2 boyamasının kontrole göre daha fazla olduğu gözlemlenmektedir.

Çizim 4.17’de gösterilmiş olduğu gibi farklılaştırma ve inhibisyon uygulanmayan (F- İ-) grupta kontrol grubuna ekilen hücrelerde boyama neredeyse hiç gözlemlenemezken, β -glukan kaplı yüzeyler üzerine ekilen hücrelerde özellikle sitoplazmadan çekirdeğe doğru yoğunlukları artan bir biçimde ERK1/2 boyamasının olduğu görülmektedir. Aslında oldukça spesifik ve güçlü bir MEK etkileşimi sonrasında fosforile olabilen Erk1/2 nin, MEK inhibisyonuna rağmen bu derece varlık sergilemesinin nedeni anlaşılamamıştır. Bunun için MAPK hücre yolağının daha kapsamlı bir şekilde incelendiği çalışmanın yapılması bu durumu aydınlatılabilir. Bunun haricinde sadece farklılaştırmanın yapıldığı grupta (F+ İ-) kontrol grubundaki hücrelere göre β -glukan kaplı yüzeylere ekilen hücrelerde anlamlı derecede yüksek ERK1/2 boyamasının olduğu ve bunun da gen ifadesi analizi ile birbirleri ile paralel sonuçlar verdiği gözlemlenmektedir. Bu durum ise, β -glukanların ERK1/2 ve dolayısıyla Raf-MEK-ERK sinyal kaskadının aktivitesini arttırdığını göstermektedir.

5.1.Sınırlılıklar

Yapılan çalışmada elde edilmiş olan verilere göre üç boyutlu bir biyometaryal olarak kullanılması önerilen β -glukanın, etkilerinin daha iyi gözlemlenebilmesi adına, *in vivo* deneyinin yapılması daha uygun olacaktır. Zira vücut içinde β -glukanların immün sistem hücrelerini uyarıp uyarmayacağı ve böyle üçboyutlu bir yapıya karşı vücudun nasıl bir tepki vereceği bilinmemektedir. Çalışmada zamanın kısıtlı olmasından dolayı sadece *in vitro* deneyler yapılabilmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada yapılan deney ve analizler sonucunda β -glukanların hem normal kültür kabı yüzeylerine hem de α -glukan kaplı yüzeylere göre, osteojenik farklılaştırma koşulları altında iKİ-MKH'lerin farklılaşmalarını daha iyi destekleyecek nitelikte olduğu gerek osteojenik farklılaşmada rol alan gen ifadelerindeki ve gerekse ALP aktivitesindeki artış ortaya koyulmuştur. Ancak β -glukanların da, tek başına herhangi bir osteojenik farklılaştırma eklentisinin bulunmadığı bir ortamda iKİ-MKH'lerin osteojenik farklılaşması üzerinde ciddi bir etkisinin olmadığı da açıktır.

Yapılan çalışmanın bir diğer kısmında ise hücrelerin osteojenik farklılaşmaya doğru yönlendirirken MAPK sinyal yolağının etkisi ve β -glukanın ilişkisi ortaya koyulmuştur. β -glukan kaplı yüzeylere ekilerek osteojenik farklılaşmaya yönlendirilen hücrelerde MAPK sinyal yolağına ait olan proteinlerdeki gen ifadesinin diğer yüzeylere ekilen hücrelere göre daha yüksek ifade olduğu ortaya koyulmuştur. p38 α ve MKK/ERK inhibisyonları yapıldığında ise hem osteojenik farklılaşmaya dair önem arz eden faktörlerin ifadesinde hem de MAPK sinyal yolağında rol olan proteinlerin ifadesinde düşüş olduğu gen ifadesi analizleri ile ispatlanmıştır.

Sonuç olarak, β -glukanların osteojenik farklılaştırmayı destekleyici bir rol oynadığı ve bu etkisini MAPK sinyal yolağı üzerinden gerçekleştirdiği ortaya koyulmuştur.

Günümüzde üç boyutlu yazıcılarda defekt olmuş kemik dokusunu tamamlayacak bir yapı iskelesi tasarlanarak, kemik dokusunun bütünlüğün sağlanması amacıyla eksikliğin olduğu böyleye transplantasyonu yapılmaktadır. Yapılan bu çalışmadan yola çıkarak, çeşitli nedenlerden dolayı defekte uğramış kemik dokusunda özellikle rejenerasyonunu sağlayabilmek ve eksikliğin olduğu bölgede mekanik destek sağlayabilmek amacıyla iKİ-MKH'lerle zenginleştirilmiş β -glukan tabanlı üç boyutlu bir yapı iskelesi oluşturulabilir.

KAYNAKÇALAR DİZİNİ

Andres S (Ed) ve Baumann N (Ed), *Mushrooms: Types, Properties and Nutrition*. Nova Science Publishers, New York, 2014

Avasthi S, Srivastava R.N, Singh A ve diğ. Stem Cell: Past, Present and Future- A Review Article. *Internet Journal of Medical Update*. 2008; 3(1):22-30

Avni S, Ezove N, Hanani H ve diğ. Olive Mill Waste Enhances α -Glucan Content in the Edible Mushroom *Pleurotus eryngii*. *Int J Mol Sci.*, 2017; 18(7): 1564.

Bélangier LF, Roy S, Tremblay M ve diğ. Mek2 is dispensable for mouse growth and development. *Mol Cell Biol*. 2003 Jul;23(14):4778-87.

Bhaskar B, Mekala NK, Baadhe RR ve Rao PS, Role of signaling pathways in mesenchymal stem cell differentiation. *Current stem cell research & therapy*, 2014;9(6):508-12.

Bobek P ve Galbavy S. Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon. *Br J Biomed Sci*, 2001;58(3):164-8.

Bobek P, Galbavy S ve Ozdin L. Effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on pathological changes in dimethylhydrazine-induced rat colon cancer, *Oncol Rep*, 1998; 5(3):727-30

Bobek P, Nosalova V ve Cerna S. Effect of pleuran (beta-glucan *Pleurotus ostreatus*) in diet or drinking fluid on colitis rats. *Molecular nutrition & food research*, 2001;45(5):360-3.

Bobovčák M, Kuniaková R, Gabriž J, ve diğ. Effect of Pleuran (β -glucan from *Pleurotus ostreatus*) supplementation on cellular immune response after intensive exercise in elite athletes. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2010;35(6):755-62

Bongso A ve Lee EH (Ed) *Stem Cells: From Bench To Bedside (2nd Edition) : From Bench to Bedside*. World Scientific Publishing Co Pte Ltd, Singapore, 2010

Bradshaw RA (Ed) ve Dennis EA (Ed), *Handbook of Cell Signaling*, Elsevier Science & Technology, Academic Press, 1315-28, 2009

Caplan A, Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 1991;9(5):641-50.

Cargnello M ve Roux PP, Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2011;75(1):50-83

Casar B, Sanz-Moreno V, Yazicioglu MN ve diğ. Mxi2 promotes stimulus-independent ERK nuclear translocation. *EMBO J*. 635–646, 2007

Choromanska A, Kulbacka J, Harasym J, Dubinska-Magiera M, Saczko J. Anticancer Activity of Oat β -Glucan in Combination with Electroporation on Human Cancer Cells. *Acta Pol Pharm*. 2017;74(2):616-623.

Cuadrado A ve Nebreda AR, Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J.*, 2010 1;429(3):403-17

Dalonso N, Goldman GH, Gern RM. β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(19):7893-906.

Dantuma E, Merchant S, ve Sugaya K, Stem cells for the treatment of neurodegenerative diseases. *Stem Cell Research & Therapy*, 2010; 1(5): 37.

Deepalakshmi K, Mirunalini S, *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *J Biochem Tech*, (2014) 5(2):718-726

- Doğan N, Doğan C ve Hayoğlu İ, Farklı sıcaklık ve süre uygulamalarının pleurotus ostreatus (istiridye mantarı)'un bazı özelliklerine etkisi, *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 18 (4), 10-16, 2014
- Drew BA, Burow ME ve Beckman BS, MEK5/ERK5 pathway: the first fifteen years. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012;1825(1):37-48
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK ve diğ. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 1956, 28 (3), 350–356
- English JM, Vanderbilt CA, Xu S ve diğ., Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms. *J. Biol. Chem.*, 1995 1;270(48):28897-902
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS, The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.*, 1970;3(4):393-403.
- Garcia-Gomez I, Elvira G, Zapata AG ve diğ. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther.*, 2010;10(10):1453-68
- Garrington TP ve Johnson GL, Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current opinion in cell biology*, 211-8,1999
- Gnecchi M (Ed), *Mesenchymal Stem Cells; Methods and Protocols*. Humana Press, New York, 2016
- Han J, Lee JD, Bibbs L ve diğ., A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 808-11, 1994
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI ve diğ. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997; 64(2):295-312.
- Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP ve diğ. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2000 31;275(13):9645-52.
- Karácsonyia Š ve Kuniakb E. Polysaccharides of Pleurotus ostreatus: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble β -d-glucan, *Carbohydrate Polymers*, 1994 24;2 107-111,
- Kim N ve Cho SG. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J Intern Med*. 2013; 28(4): 387–402
- Klimek K, Przekora A, Benko A ve diğ. The use of calcium ions instead of heat treatment for β -1,3-glucan gelation improves biocompatibility of the β -1,3-glucan/HA bone scaffold. *Carbohydr Polym*. 2017 15;164:170-178
- Kolch W, Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(11):827-37.
- Kolf CM, Cho E ve Tuan RS, Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. *Arthritis research & therapy*, 2007; 9(1): 204.
- Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BioMed Central genomics*, 2007; 8: 70
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC ve diğ., A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 1994 22-29;372(6508):739-46.
- Lee JD, Ulevitch RJ ve Han J, Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1995 15;213(2):715-24
- Legard V(Ed), Schluter R(Ed), *Bone Regeneration: Growth Factors, Augmentation Procedures and Tissue Engineering Applications*. Nova Science Publishers, 2010

- Lin H, She YH, Cassileth BR ve diğ. Maitake beta-glucan MD-fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity in vitro. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(1):91-9
- Lin K, Xia L, Li H ve diğ. Enhanced osteoporotic bone regeneration by strontium-substituted calcium silicate bioactive ceramics. *Biomaterials.* 2013;34(38):10028-42
- Lotfy A, Salama M, Zahran F ve diğ. Characterization of Mesenchymal Stem Cells Derived from Rat Bone Marrow and Adipose Tissue: A Comparative Study. *International Journal of Stem Cells,* 2014;7(2):135-42
- Majtán J, Kumar P, Koller J ve diğ. Induction of metalloproteinase 9 secretion from human keratinocytes by pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*). *Z Naturforsch C.,* 2009;64(7-8):597-600
- Martin SF, Williams N ve Chatterjee S. Lactosylceramide is required in apoptosis induced by N-Smase. *Glycoconj J.* 2006;23(3-4):147-57.
- McCabe LR, Kockx M, Lian J ve diğ. Selective expression of fos- and jun-related genes during osteoblast proliferation and differentiation. *Exp Cell Res.* 1995;218(1):255-62.
- Mehrotra RS ve Aneja KR, *An Introduction to Mycology,* New Age International Publishers, Hindistan, 1990
- Nemoto S, Xiang J, Huang S ve diğ. Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1998 26;273(26):16415-20.
- Nielsen SS, *Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates,* Food Analysis Laboratory Manual, 2009 47-53.
- Nosál'ová V, Bobek P, Cerná S ve diğ. Effects of pleuran (beta-glucan isolated from *Pleurotus ostreatus*) on experimental colitis in rats, *Physiol Res,* 2001;50(6):575-81.
- Palacios I, García-Lafuente A, Guillamón E ve diğ. Novel isolation of water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Carbohydrate Research,* 2012 1;358:72-7
- Peşşen A, Kayın mantarı (*pleurotus ostreatus*): Kütük yetiştiriciliği, *Samtim,* 2013 43, 18-20,
- Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, ve diğ., The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta,* 2011;1813(9):1619-33.
- Przekora A, Palka K ve Ginalska G. Chitosan/ β -1,3-glucan/calcium phosphate ceramics composites--novel cell scaffolds for bone tissue engineering application. *J Biotechnol.* 2014 20;182-183:46-53
- Przekora A ve Ginalska G. Addition of 1,3- β -D-glucan to chitosan-based composites enhances osteoblast adhesion, growth, and proliferation. *Int J Biol Macromol.* 2014;70:474-81
- Przekora A ve Ginalska G. Enhanced differentiation of osteoblastic cells on novel chitosan/ β -1,3-glucan/bioceramic scaffolds for bone tissue regeneration. *Biomed Mater.* 2015 13;10(1):015009.
- Przekora A, Benko A, Blazewicz M ve diğ. Hybrid chitosan/ β -1,3-glucan matrix of bone scaffold enhances osteoblast adhesion, spreading and proliferation via promotion of serum protein adsorption. *Biomed Mater.* 2016 7;11(4):045001
- Przekora A, Palka K ve Ginalska G. Biomedical potential of chitosan/HA and chitosan/ β -1,3-glucan/HA biomaterials as scaffolds for bone regeneration--A comparative study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016 1;58:891-9.
- Przekora A ve Ginalska G. Chitosan/ β -1,3-glucan/hydroxyapatite bone scaffold enhances osteogenic differentiation through TNF- α -mediated mechanism. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017 1;73:225-233
- Przekora A, Vandrovcova M, Travnickova M ve diğ. Evaluation of the potential of chitosan/ β -1,3-glucan/hydroxyapatite material as a scaffold for living bone graft production in vitro by comparison of ADSC and BMDSC behaviour on its surface. *Biomed Mater.* 2017 24;12(1):015030.

- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS ve diğ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem.* 1995 31;270(13):7420-6.
- Rop O, Mlcek J ve Jurikova T. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutr Rev.* 2009; 67(11):624-31
- Rosenblum JS, Nomanbhoy TK ve Kozarich JW, Functional interrogation of kinases and other nucleotide-binding proteins. *Federation of European Biochemical Societies*, 2013 27;587(13):1870-7
- Roskoski R Jr, ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research*, 2012; 66(2):105-43
- Roskov Y, Abucay L, Orrell T ve diğ. *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life*, www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858, Erişim: 1 Mayıs 2018
- Rouse J, Cohen P, Trigon S ve diğ., A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, 1994 23;78(6):1027-37
- Roux PP ve Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68(2):320-44
- Scheurer H(Ed), *_Morphology, Functions and Clinical Implications*. Nova Science Publishers, 2013
- Schmidt-Bleek K, Willie BM, Schwabe P ve diğ. BMPs in bone regeneration: Less is more effective, a paradigm-shift. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;27:141-8
- Shchemelinin I, Sefc L ve Necas E, Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia Biol*, 2006;52(3):81-100
- Sodek J, Ganss B ve McKeel M.D. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(3):279-303
- Solchaga LA, Penick KJ ve Welter JF, Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Tips and Tricks. *Methods in molecular biology*, 2011;698:253-78
- Steinhoff, G (Ed) *Regenerative Medicine: From Protocol to Patient*. Springer Netherlands, 2013
- Synytsya A, Mičková K, Synytsya A. ve diğ. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 2009 76;4 548-556
- Takagi H (Ed), Kitagaki H (Ed), *Stress Biology of Yeasts and Fungi Applications for Industrial Brewing and Fermentation*, Springer Japan, 2015
- Takahashi K ve Yamanaka S, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006 25;126(4):663-76
- Vetvicka V (Ed), Novak M (Ed), *Biology and Chemistry of Beta Glucan Vol: 1 Beta Glucans - Mechanisms of Action*, Bentham Science Publishers, 2011
- Yan L, Carr J, Ashby PR, ve diğ., Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC developmental biology*, 2003; 16;3:11.
- Yin G, Haendeler J, Yan C ve diğ. GIT1 Functions as a Scaffold for MEK1-Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 Activation by Angiotensin II and Epidermal Growth Factor, *Mol Cell Biol.* 2004; 24(2): 875–885.
- Yoshioka Y, Tabeta R, Saitô H ve diğ. Antitumor polysaccharides from *P. ostreatus* (Fr.) Quél.: isolation and structure of a beta-glucan. *Carbohydr Res*, 1985 1;140(1):93-100
- Zhou G, Bao ZQ ve Dixon JE, Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *The Journal of biological chemistry*, 1995 26;270(21):12665-9.

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Leyla KAYIŞ
Doğum yeri ve tarihi: Çarşamba 11.09.1988
Uyruğu: T.C.
Medeni durumu: Bekar
İletişim adresi: Tepeköy Mh. Toki Klç. Knt. Şanlı Sk. 168.Ada B-13
Blok Daire:7 İzmit – KOCAELİ
Telefon: 0551 202 50 16

2. Eğitimi (tarih sırasına göre)

09.2015-Devam ediyor **Yüksek Lisans**
Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre AD.
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı
Kocaeli – TÜRKİYE

09.2009-09.2014 **Lisans**
Mustafa Kemal Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Hatay – TÜRKİYE

09.2007-06.2009 **Önlisans**
Dumlupınar Üniversitesi
Altıntaş MYO İşletme Bölümü
Kütahya – TÜRKİYE

09.2003-06-2005

Lise

Avcılar Lisesi

Fen Bilimleri

İstanbul – TÜRKİYE

Yabancı Dili:

İngilizce

3. Bilimsel Etkinlikler

a) Aldığı burslar

Proje bilgileri

Erişkin Kök Hücreler Kullanılarak Deneysel Spinal Musküler Atrofi Hayvan Modelinin Oluşturulması Ve İşlevselliğinin Gösterilmesi, 1003 - Öncelikli Alanlar (2. Aşama), Burslu, Yürürlükte, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, ARDEB, 216S467

BİDEB destekleri

LEYLA KAYIŞ, Yarışma Programları Müdürlüğü, 2238- Girişimcilik ve Yenilikçilik Yarışması, Finalde Elendi, 2017 – 1

b) Uluslararası bilimsel etkinliklere poster bildirileri

1. L. KAYIŞ & G. DURUKSU, Isolation Of Polysaccharides From The Fruit Bodies Of *Pleurotus Ostreatus* (oyster Mushroom) And Characterization Of Their Effect On Cell Proliferation, Poster Sunumu, 6th International Molecular Biology And Biotechnology Congress, 22 Aralık 2017, 25 Aralık 2017, 70 - 70.
2. G. DURUKSU, L. KAYIŞ & Y. YAZIR, The Effect Of Fungal β -glucan On The Osteogenic Differentiation Of Mesenchymal Stem Cells, Poster Sunumu, Advances In Stem Cells And Regenerative Medicine-embo Conference, 23 Mayıs 2017, 26 Mayıs 2017.
3. G. DURUKSU, S. POLAT, L. KAYIŞ, N. EKİMCİ GÜRCAN, G. GACAR & Y. YAZIR, Encapsulation Of Beta Cell Line, Brn-bd11, In Platelet-rich Plasma - Calcium Alginate/poly-l-histidine/alginate Microbeads, Poster Sunumu, 15th International Congress Of Histochemistry And Cytochemistry (ıchc 2017), 18 Mayıs 2017, 21 Mayıs 2017, 10.5505/2017ıchc.PP-15, 169 - 169.

4. G. DURUKSU, L. KAYIŞ, Z. S. HALBUTOĞULLARI, G. GACAR & Y. YAZIR, The Effect Of Alpha-glucan On Mapk Signaling Pathway And Its Impact On Osteogenic Differentiation Of Mesenchymal Stem Cells, Poster Sunumu, 15th International Congress Of Histochemistry And Cytochemistry (ıchc 2017), 18 Mayıs 2017, 21 Mayıs 2017, 10.5505/2017ıchc.PP-14, 168 - 168.
5. SELEN POLAT, YUSUFHAN YAZIR, GÜLAY ERMAN, LEYLA KAYIŞ, GÖKHAN DURUKSU, Placentel Perisit İzolasyonunda Alternatif Bir Yöntem, XIII THED Ulusal Kongresi, 10-13 Mayıs 2018, https://docs.wixstatic.com/ugd/e31f1d_2e722159edbd4d95beb1b7cd4a112a58.pdf, 264.

c) Projeler

Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasına Fungal Beta-glukanın Etkilerinin İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: KÖK HÜCRE VE GEN TEDAVİLERİ ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ (KÖGEM) KURUMSAL (BAP V.B.)

EKLER

Ek 1. İnsan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin kullanımı için etik kurul onay belgesi

Karar Bilgileri	Karar No: KÜ GOKAEK 2016/20.3 Proje No: 2016/309 Tarih: 30/11/ 2016
	Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik açıdan, <input checked="" type="checkbox"/> Uygun bulunmuştur. <input type="checkbox"/> Eksikliklerin tamamlanması koşulu ile uygun bulunmuştur.* <input type="checkbox"/> Uygun bulunmamıştır.*

Dayanakları	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi; İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi
-------------	--

Etik Kurul Üyeleri

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Toplantıda Bulunma		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Kadir Babaoğlu Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İ. Erdem Okay Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Canan Baydemir Üye	Biyostatistik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Selcen Göçmez Üye	Farmakoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Özlem Yıldız Gündoğdu Üye	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Haluk Emre Özel Üye	Restoratif Diş Tedavisi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Yusufhan Yazır Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Aslihan Akpınar Raportör	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ceyla Eraldemir Üye	Biyokimya	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

* Gereke ve öneriler:

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
	Onay formu	21.09.2016/KOGOEK01.1	2/2

Tez Denetleme Listesi

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

... / ... / 2018

Dr. Öğr. Üyesi Gökhan DURUKSU

İmza