

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEZENKİMAL KÖK HÜCRE ÜRETİMİNDE
İN VİTRO TEMELLİ METABOLOMİK VE ANALİZLER

Dr. Tülay KARAAĞAÇ AKYOL

Kök Hücre Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2020

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEZENKİMAL KÖK HÜCRE ÜRETİMİNDE
İN VİTRO TEMELLİ METABOLOMİK VE ANALİZLER

Dr. Tülay KARAAĞAÇ AKYOL

Kök Hücre Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. DUYGU UÇKAN ÇETİNKAYA

ANKARA
2020

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE ÜRETİMİNDE
İN VİTRO TEMELLİ METABOLOMİK VE ANALİZLER

Dr. Tülay KARAAĞAÇ AKYOL

Danışman: Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA

Bu tez çalışması 15.01.2020 tarihinde jürimiz tarafından "Kök Hücre Doktora Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Ayşen ÖZCAN

Hacettepe Üniversitesi

İmza

Üye:

Prof. Dr. Türkan ELDEM

Hacettepe Üniversitesi

İmza

Üye:

Prof. Dr. Habibe Meltem ÖZGÜNER

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi

İmza

Üye:

Prof. Dr. İsmail Yaşar AVCI

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

İmza

Üye:

Doç. Dr. Fatma Visal OKUR

Hacettepe Üniversitesi

İmza

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

12 Şubat 2020

Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- ✘ Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir


14/02/2020

TÜLAY KARAAĞAÇ AKYOL

¹"**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**"

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. Duygu UÇKAN ETNKAYA danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Dr. Tülay KARAAĞAÇ AKYOL

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sırasında beni tez öğrencisi olarak kabul eden, bilimsel ve mesleki ufku genişleten, yurtdışı eğitimi de almamı sağlayan, adeta bir kök hücre gibi diferansiye olmama neden olan, sadece bilimsel anlamda değil, sosyal yaşamımda da desteğini esirgemeyen Kök Hücre Merkez müdürü ve tez danışmanım Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA'ya en içten minnettarlığımı bildiririm.

Eğitimim süresince bana her türlü desteği ve motivasyonu sunan, bir kök hücrenin yuvası olan 'niş' ortamını bana sunan Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi direktörü sevgili hocam Prof. Dr. Osman İlhami ÖZCEBE'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamın metabolomiks analizlerinde yardımları için Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU hocama, Kök hücre kültürü laboratuvar çalışmalarımın başlangıcında pratik eğitimime katkı veren Yard. Doç. Dr. Fatima Aerts Kaya'ya teşekkür ederim. Tez çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Dr. Emine Kılıç, Gülsena Tosyalı, Sema Aygar ve Bihter Muratoğlu'na teşekkür ederim.

Sağladıkları kan ürünleri, doktora eğitimim süresince gösterdikleri anlayış ve destek için Kan Merkezi ailesine ve ağabeyim Prof. Dr. Salih Aksu'ya da teşekkürü bir borç bilirim.

Beni ben yapan, desteklerini ve sevgilerini hayatımın hiçbir evresinde esirgemeyen anne, baba, ablama ve ailemize sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevgili eşim ve çocuklarım... Bu tez sizlere rağmen oluştu ama varlığınızla zenginleşti. İyi ki varsınız. Hep olun...

Bu tez çalışmaları Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından 014 D07 940 001 -593 ve THD-2018-17187 numaralı projelerle desteklenmiştir.

ÖZET

Karağaç Akyol, T., Mezenkimal Kök Hücre Üretiminde *In Vitro* Temelli Metabolomik Ve Analizler, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Doktora Tezi, Ankara, 2020. Çalışmamızda MKH'ler FBS, PL, PPP ve KİP varlığında ve ayrıca LPS varlığında inflamatuvar ortama maruz bırakılarak farklı eklentilerin etkisi araştırılmıştır. Eklentilerinin MKH proliferasyonu, farklılaşma özelliklerine etkileri, hücrelerin ve kültür ortamının metabolomik profili çalışılmıştır. Analizler sonucunda 479 metabolit anlamlı değişmiş, intrasellüler 242 metabolit tanımlanmıştır. Besiyerleri ve hücre kültürleri süpernatantlarında 605 ekstrasellüler metabolit saptanmış, bunların 116'sı tanımlanmıştır. PL içeren ortamda MKH'lerin daha çok glikolitik metabolizmaya yöneldiği, glutamin tüketiminin yüksek olup hücrelerin glutaminolizise yöneldiği ve inflamasyon durumunda bu yolların rolü olabileceği, MKH'lerin PL ortamında daha immünsupresif, antiinflamatuvar ve senesensi önleyici özelliğe sahip olabileceği düşünülmüştür. FBS içeren besiyeri ortamında genel olarak amino asit seviyeleri diğer eklentilere göre daha yüksek bulunmuş, metionin, treonin ve alaninin FBS ortamında, glutamik asit ve aspartik asitin ise PL ortamında daha fazla tüketildiği saptanmıştır. Hücrelerin immünolojik özelliklerini belirlemede önemi gösterilmiş olan LysoPC PL'ta, LysoPE FBS'de daha yüksek bulunmuş, bu eklentilerle çoğaltılan hücrelerin immünmodulatuvar özelliklerinin farklı olabileceği düşünülmüştür. LPS uyarımı sonucu elde edilen bulgular da bunu desteklemiştir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal Kök Hücre, plateletten zengin plazma, platelet lizat, metabolomik, inflamasyon.

Bu tez çalışmaları Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından 014 D07 940 001 -593 ve THD-2018-17187 numaralı projelerle desteklenmiştir.

ABSTRACT

Karağaç Akyol, T. Metabolomic And Analyzes In In-Vitro Based On The Production Of Mesenchymal Stem Cells, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Stem Cells Program Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2020. In our study, the effects of different additions MSC's exposed to FBS, PL, PPP and BMP and also inflammatory environment in the presence of LPS were investigated. These serum additions's effects on MSC proliferation, differentiation characteristics and metabolomic profile of cells and culture medium were studied. As a result of analysis, 479 metabolites changed significantly and 242 metabolites were identified intracellularly. 605 extracellular metabolites were detected in culture supplements, culture media and cell culture supernatants and 116 of them have been identified. MSCs in PL-containing media are mostly directed to glycolytic metabolism, glutamine consumption is high and cells are directed to glutaminolysis and this is thought that these pathways may have a role in the case of inflammation and MSCs may have more immunosuppressive, antiinflammatory and senescence inhibitory properties in PL. In general FBS-containing medium's amino acid levels were higher than other additions and it has been determined that methionine, threonine and alanine are consumed more in FBS medium, glutamic acid and aspartic acid are consumed more in the PL medium. LysoPC, which has been shown to be important in determining the immunological properties of cells was higher in PL, LysoPE was higher in FBS and it was thought that the immunomodulatory properties of the cells grown with these additives may be different. Findings obtained as a result of LPS stimulation supported this, too.

Key words: Mesenchymal Stem Cell, fetal bovine serum, platelet lysate, metabolomic, inflammation.

These thesis studies were supported by the projects of 014 D07 940 001 -593 and THD-2018-17187 by Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xvi
ŞEKİLLER	xxiii
TABLolar	xxxı
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kök Hücre (KH)	5
2.2. Pluripotent Kök Hücreler	7
2.2.1. Embriyonik Kök Hücre (EKH)	7
2.2.2. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (UPKH/ iPSC)	7
2.3. Multipotent (Erişkin) Kök Hücreler	9
2.4. Hematopoetik kök hücre (HKH)	10
2.5. Mezenkimal Kök Hücre	11
2.5.1. Mezenkimal kök hücre eldesi	12
2.5.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	14
2.5.3. MKH'lerin immünmodulatuvar özellikleri	16
2.5.4. Mezenkimal kök hücrelerin klinikte kullanımı	20
2.5.5. MKH'lerin klinik kullanım amaçlı üretimi	21
2.6. MKH Üretimine Etkili Faktörler	25
2.6.1. Biyolojik materyal, hammadde özellikleri:	25
2.6.2. <i>İn vitro</i> Hücre Kültürü Koşulları:	26
2.6.3. Besiyeri ve serum / plazma eklentileri	27

2.7. Plateletler ve platelet kaynaklı ürünlerin hazırlanması	31
2.8. MKH uygulamalarında etkinliğin artırılması ve güvenli uygulamaya yönelik MKH kültür aşamasında üzerinde durulması gereken konular	38
2.9. Kök hücrelerin Metabolik Özellikleri	40
2.10. Metabolomik Analizler	45
3. GEREÇ ve YÖNTEM	48
3.1. GEREÇ	48
3.1.1 Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyeri ve Eklentiler	48
3.1.2. İmmunfenotipleme İçin Kullanılan Antikorlar	49
3.1.3. Karakterizasyonda Kullanılan Boyalar ve Kitler	49
3.1.4. Gen Ekspresyon Analizinde Kullanılan Kit ve baz çiftleri	49
3.1.5. Metabolomiks Deneylerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler	50
3.1.6. Kullanılan Cihazlar	50
3.1.7. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler	52
3.1.8. Boya ve Çözeltilerin Hazırlanması	53
3.2. YÖNTEM	53
3.2.1. MKH Kültür Besiyeri ve Serum/Plazma Eklentilerinin Hazırlığı	53
3.2.2. Mezenkimal kök hücre (MKH)'lerin izolasyonu ve kültürü	60
3.2.3. MKH'lerin akım sitometri ile karakterizasyonu	62
3.2.4. MKH'lerin osteojenik ve adipojenik farklılaşma özelliklerinin saptanması	63
3.2.5. WST deneyi	66
3.2.6. Metabolomik Analizler	67
3.2.7. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Profil Analizleri	68
3.2.8. GC-MS Temelli Metabolomik Profil Analizleri	69
3.2.9. Metabolomik Analiz Profillerinin Yorumlanması	70

3.2.10. İstatistiksel Yöntem	72
4.BULGULAR	73
4.1. Kültür Besiyeri Eklentileri Özellikleri	73
4.2. Mezenkimal kök hücre (MKH)'lerin izolasyonu ve kültürü, farklı besiyeri eklentileri ortamında çoğaltılan MKH'lerin morfolojik özellikleri	73
4.3. Farklı koşullarda çoğaltılan MKH'lerin proliferasyon hızları	76
4.3.1. Hücre sayımı analizi	76
4.3.2. WST analizi sonuçları:	77
4.4. Farklı koşullarda çoğaltılan P3 MKH'lerin akım sitometri ile karakterizasyonu:	79
4.5. Farklı Koşullarda Çoğaltılan MKH'lerin Adipojenik Farklılaşma Özellikleri:	82
4.6. Farklı Koşullarda Çoğaltılan MKH'lerin Osteojenik Farklılaşma Özellikleri:	84
4.7. Adipojenik ve osteojenik genlerin (PPAR, LPL, Adiponektin, RUNX, ALP) ekspresyon analizi, PCR:	85
4.7.1. FBS ve PL eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşmaları uyarılan MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma gen Ekspresyonlarının karşılaştırmalı analizi:	85
4.7.2. FBS ve KİP eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma gen ekspresyonlarının karşılaştırmalı analizi:	86
4.7.3. FBS ve PPP eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma gen ekspresyonlarının karşılaştırmalı analizi:	87
4.7.4. PL ve PPP eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma gen ekspresyonlarının karşılaştırmalı analizi:	87

4.7.5. Farklı serum eklentileri (FBS, PL, KİP, PPP) ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma gen ifadelerinin toplu değerlendirilmesi:	88
4.7.6. İnflamatuvar uyarım varlığında FBS eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin farklılaşma gen ifadelerinin analizi:	89
4.7.7. İnflamatuvar uyarım varlığında PL eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin farklılaşma gen ifadelerinin analizi:	90
4.7.8. İnflamatuvar uyarım varlığında KİP eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin farklılaşma genlerinin ifade analizi:	90
4.7.9. İnflamatuvar uyarım varlığında PPP eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin farklılaşma gen ifadelerinin analizi:	91
4.7.10. Farklı serum eklentileri ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin inflamatuvar ortam varlığında adipojenik ve osteojenik farklılaşma gen ifadelerinin toplu değerlendirilmesi:	92
4.8. MKH'lerin Metabolik Karakterizasyonu, Metabolomiks Veri Analizleri:	92
4.8.1. Hücre İçi Metabolitlerin Veri Analizleri:	93
4.8.2. Ekstraselüler Metabolitlerin Veri Analizleri:	122
4.9. MKH'lerin Metabolik Karakterizasyonu, Metabolomiks Yolak Analizleri:	152
4.9.1. PL Eklentisi ile Çoğaltılan MKH'lerin Metabolik Karakterizasyonu/FBS ile karşılaştırmalı analizi:	152
4.9.2. KİP Eklentisi ile Çoğaltılan MKH'lerin Metabolik Karakterizasyonu/FBS ile karşılaştırmalı analizi:	158
4.9.3. PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolik Karakterizasyonu/FBS ile karşılaştırmalı analizi:	164
4.9.4. İnflamasyon varlığında FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin	

metabolomik karakterizasyonu:	170
4.9.5. İnflamasyon varlığında PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolomik karakterizasyonu:	175
4.9.6. İnflamasyon varlığında KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolomik karakterizasyonu:	181
4.9.7. İnflamasyon varlığında PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolomik karakterizasyonu:	187
4.9.8. PL ve PPP eklentisinin MKH'lerin metabolik özelliklerine etkilerinin karşılaştırılması:	192
4.9.9. PL ve KİP eklentisinin MKH'lerin metabolik karakterizasyonuna etkilerinin karşılaştırılması:	197
4.9.10. KİP ve PPP eklentisinin MKH'lerin metabolik karakterizasyonuna etkilerinin karşılaştırılması:	202
4.9.11. DMFBS ve DMPL besiyerlerinin istatistiksel anlamlı etkilediği metabolik yollar: (DMFBS-DMPL)	207
4.9.12. DMFBS ve DMPL besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler; kültür süpernatantları: (FBS1-PL1)	211
4.9.13. DMFBS besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları metabolitlerin; DMFBS ile karşılaştırması:	215
4.9.14. DMPL besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları metabolitlerin; DMPL ile karşılaştırması:	218
4.9.15. DMFBS ve DMKİP besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yollar:	223
4.9.16. DMFBS ve DMKİP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler; kültür süpernatantları:	226
4.9.17. DMKİP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları metabolitlerin; DMKİP ile karşılaştırması:	229

4.9.18. DMFBS ve DMPPP Besiyerlerinin Anlamlı Etkilediği Metabolik Yolaklar:	234
4.9.19. DMFBS ve DMPPP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler; kültür medyum süpernatantları:	237
4.9.20. DMPPP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantları; salgıladıkları metabolitlerin; DMPPP ile karşılaştırması:	241
4.9.21. DMFBS ve DMFBSLPS besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yolaklar:	245
4.9.22. İnflamatuvar uyarım varlığında FBS eklentisi ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgılanan metabolitlerin; DMFBSLPS ile karşılaştırması:	247
4.9.23. DMPL ve DMPLLPS besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yolaklar:	251
4.9.24. İnflamatuvar Uyarım Varlığında PL Eklentisi ile çoğaltılan P3 MKH'lerin Kültür Süpernatantlarında Salgılanan Metabolitlerin; DMPLLPS ile Karşılaştırması:	254
4.9.25. DMKİP ve DMKİPLPS besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yolaklar:	258
4.9.26. İnflamatuvar Uyarım Varlığında KİP Eklentisi ile çoğaltılan P3 MKH'lerin Kültür Süpernatantlarında Salgılanan Metabolitlerin; DMKİPLPS ile Karşılaştırması:	261
4.9.27. DMPPP ve DMPPPPLPS Besiyerlerinin Anlamlı Etkilediği Metabolik Yolaklar:	265
4.9.28. İnflamatuvar Uyarım Varlığında PPP Eklentisi ile çoğaltılan P3 MKH'lerin Kültür Süpernatantlarında Salgılanan Metabolitlerin; DMPPPPLPS ile Karşılaştırması:	267
5. TARTIŞMA	271
6. SONUÇ	297
7. KAYNAKLAR	310

8. EKLER

332

EK-1: Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 16969557-53 numaralı kararı

EK-2: Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi Biyobanka Bilgilendirilmiş Onam Formu (Erişkin verici için)

EK-3: Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi Biyobanka Bilgilendirilmiş Onam Formu (Çocuk için Ebeveyn/Vasi Onamı)

EK-4: Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi 18 Yaşını Doldurmuş Birey İçin “Biyobanka Yeniden Bilgilendirilmiş Onam Formu”

EK-5: 7-11 Yaş Çocuk Kabul Formu

EK-6: 12-17 Yaş Çocuk Kabul Formu

EK-7: Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 16969557-744 numaralı kararı

Ek-8: Orjinallik Raporu

9. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISATMALAR

AABB	American Association of Blood Banks, Amerikan Kan Bankaları Birliği
AKH	Adipoz kök hücreleri
AsA	Askorbik asit
BMP	Bone morphogenic protein
BSE	Siğır süngerimsi ensefalopati
CaCl₂	Kalsiyum klorür
CBER	Center for Biologics Evaluation and Research, Biyolojik Değerlendirme ve Araştırma Merkezi
CD	Cluster of differentiation
CD73	Ecto-5'-nucleotidase, SH3, SH4
CD105	Endoglin, SH2, TGFb-RIII
CD45	Lymphocyte common antigen
CD90	Thy-1
CFU-F	Colony forming units-fibroblast
cGMP	Current good manufacturing practice
CLEC	C-type lectin receptor
COX-2	Siklooksijenaz 2

CO₂	Karbondioksit
CTAP	Connective tissue activating peptide, bağ dokusu aktiveleştirici peptit
CXCL12	C-X-C Motif Chemokine 12
DMEM-LG	Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low glucose
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EKH	Embriyonik kök hücre
EMA	European Medicines Agency
ESM	Ekstrasellüler Metabolit
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FACT	Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy, Hücresel Tedavi Akreditasyonu Vakfı
FBS	Fetal buzağı serum
FGF2	Fibroblast growth factor 2
FDA	Food and Drug Administration, Gıda ve İlaç İdaresi
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry

GVHH	Graft versus host hastalığı
GP	Glukoprotein
HGF1	Hepatocyte growth factor 1
HIF1α	Hipoksi indüklenebilir faktör 1alfa
HKHN	Hematopietik kök hücre nakli
HKH	Hematopoetik kök hücre
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthine
IDO	İndolamin 2,3-dioksijenaz
IF	İmmünfloresan
IFN-γ	İnterferon-gamma
Ig	İmmünglobulin
IGF1	İnsülin like growth factor 1
IHC	İmmünhistokimya
IL	İnterlökin
IPS	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
ISCT	Uluslararası Hücresel Terapi Derneği
iUKK	İnsan umbilikal kord kanı
KH	Kök hücre
kHz	Kilohertz

Kİ	Kemik iliği
KİP	Kemik iliği plazması
Kİ-MNH	Kemik iliği Mononükleer hücre
LCQTOF MS	Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry
LDH	Laktat dehidrojenaz
LNGFR	Low-affinity nerve growth factor receptor, CD 271
LPS	Lipopolisakkarit
MCAM	Melanoma cell adhesion molecule, CD146
MEM	Minimum essential medium
MHC	Majör doku uygunluk kompleksi
miRNA	MicroRNA
MKH	Mezenkimal kök hücre
MNH	Mononükleer hücre
mRNA	Massenger Ribonükleik Asit
MSTFA	N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NO	Nitrikoksit
OIE	Office International des Epizooties, Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı

OXPHOS	Oksidatif fosforilasyon
OPN	Osteopontin
ORO	Oil Red O
PAF	Platelet activating factor
PBS	Fosfat-tampon tuz
PCA	Principal Component Analysis
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
pH	Power of hydrogen
PF	Platelet factor
PGE2	Prostaglandin E2
PK	Platelet Konsantresi
PL	Platelet lizat
PPP	Platelet poor plazma (platelet fakir plazma)
PTH	Paratiroid Hormon
PLS-DA	Partial least squares-discriminant analysis
P0	Pasaj 0
P3	Pasaj 3

Q²	Tahmin edebilme değerleri
RNA	Ribonükleik Asit
RT-PCR	Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
RANTES	Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
ROS	Reaktif oksijen türlerinin
R²	Hesaplanan değerler
SCF	Stem-Cell Factor
SDF-1	Stromal-Derived Factor-1
SDF-1α	Stromal cell derived factor-alpha
SHK	Skvamöz hücreli karsinom
SOD2	Süperoksit dismutaz 2
Tb-4	Thymosin b-4
TGFb1	Transforming growth factor beta-1
Treg	Düzenleyici T hücreleri
TNF- α	Tumor necrosis factor- alfa
tRNA	Transfer Ribonükleik Asit
TXA2	Tromboksan A2
UPKH	Uyarılmış pluripotent kök hücre

vWF	von Willebrand faktör
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLA	Very late antigen
VIP	Variable Important in Project



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kök hücrelerin kökeni. Zhang L, 2009 (14) makalesinden uyarlanmıştır.	5
2.2. Hastaya özel uPKH üretilmesi. Kristina Hug, 2010. Translational Stem Cell Research (26) adlı kitaptan uyarlanmıştır.	8
2.3 MKH immünomodülasyonu. Yuan, X 2019 (93) makaleden uyarlanmıştır.	17
2.4. Trombosit yapısı. Zapata JC, 2014 (159) makalesinden uyarlanmıştır.	31
2.5. Trombosit içeriği. Burnouf T, 2016 (162) makaleden uyarlanmıştır.	33
2.6. Trombosit konsantresi hazırlamada farklı yöntemler. Burnouf T, 2016 (162) makaleden uyarlanmıştır.	34
2.7. Glikoliz ve mitokondriyal solunumun şeması. Yetkin-Arik B, 2019 (205) makaleden uyarlanmıştır.	41
2.8. Pluripotent KH ve farklılaşmış hücre enerji metabolizması. Zhang J, 2012 (208) makaleden uyarlanmıştır.	43
2.9. Krebs döngüsü.	45
3.1. Kanbankası bileşen hazırlama aşamaları (TDP, Taze donmuş plazma)	56
3.2. PL hazırlama aşamaları	58
4.1. Dört farklı eklenti içeren besiyeri ortamlarında üretilen O. Pasaj (P0) MKH'lere ait görüntü (Ölçek çizgisi 1.0 mm).	74
4.2. Dört farklı eklenti içeren besiyeri ortamında üretilen MKH'lerin P3 görüntüsü (Ölçek çizgisi 2.0 mm).	75
4.3. Dört farklı medyumda üretilen MKH'lerin P3 görüntüsü (Ölçek çizgisi 200 µm).	75
4.4. Farklı koşullarda çoğaltılan MKH'lerin pasaj 0 proliferasyon özellikleri	76
4.5. Farklı besiyeri eklentilerinin MKH proliferasyonuna etkisi (Solda; inflamatuvar uyarım olmadan, sağda; inflamatuvar uyarım varlığında)	77
4.6. MKH'lerin akım sitometre ile alınan FBS-MKH dot plot görüntüleri.	80
4.7. MKH'lerin akım sitometre ile alınan KİP-MKH dot plot görüntüleri.	81
4.8. MKH'lerin akım sitometre ile alınan PL-MKH dot plot görüntüleri.	81
4.9. MKH'lerin akım sitometre ile alınan PPP-MKH dot plot görüntüleri.	82
4.10. MKH'lerin adipojenik farklılaşmasının Oil red O boyası ile gösterilmesi. MKH'ler FBS, PL, KİP ve PPP eklentileri varlığında adipojenik uyarım sonucu adipojenik farklılaşma göstermiştir.	83
4.11. İnflamatuvar uyarım altındaki MKH'lerin adipojenik farklılaşmasının Oil red O boyası ile gösterilmesi. Tüm serum eklentileri (FBS, PL, KİP ve PPP) varlığında adipojenik uyarım sonucu MKH'lerin adipojenik farklılaşma gösterdiği görülmüştür.	83
4.12. MKH'lerin osteojenik farklılaşmasının Alizarin Red boyası ile gösterilmesi. MKH'ler FBS, PL, PPP ve KİP eklentileri içeren osteojenik farklılaşma ortamına maruz bırakıldığında 4 grup arasından en iyi osteojenik farklılaşma PL varlığında indüklenen MKH'lerde gözlenmiştir.	84

- 4.13.** İnflamatuvar uyarım altındaki MKH'lerin osteojenik farklılaşmasının Alizarin Red boyası ile gösterilmesi. Tüm serum eklemleri (FBS, PL, KİP ve PPP) varlığında osteojenik uyarım sonucu en iyi osteojenik farklılaşma PL varlığında gözlenmiştir. 85
- 4.14.** Besiyerine PL eklemlisi ile çoğaltılan ve adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları uyarılan MKH'lerin kontrol grubuna (FBS eklemlisi ile çoğaltılan MKH'lere) göre değişen adipojenik (solda) ve osteojenik (sağda) farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi. 86
- 4.15.** Besiyerine KİP eklemlisi ile çoğaltılan ve adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları uyarılan MKH'lerin kontrol grubuna (FBS eklemlisi ile çoğaltılan MKH'lere) göre değişen adipojenik (solda) ve osteojenik (sağda) farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi. 86
- 4.16.** Kültür medyumuna PPP eklemlisi ile çoğaltılan ve adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları uyarılan MKH'lerin kontrol grubuna (FBS eklemlisi ile çoğaltılan MKH'lere) göre değişen adipojenik (solda) ve osteojenik (sağda) farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi. 87
- 4.17.** Kültür medyumuna PPP eklemlisi ile çoğaltılan ve adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları uyarılan MKH'lerin kontrol grubuna (PL eklemlisi ile çoğaltılan MKH'lere) göre değişen adipojenik (solda) ve osteojenik (sağda) farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi. 88
- 4.18.** FBS, PL, KİP, PPP eklemlisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin adipojenik (solda) ve osteojenik (sağda) farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi. 89
- 4.19.** Besiyerine FBS eklemlisi ile çoğaltılan ve adipojenik ve osteojenik farklılaşma uyarılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen adipojenik (solda) ve osteojenik (sağda) farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi. 89
- 4.20.** Besiyerine PL eklemlisi ile çoğaltılan ve adipojenik ve osteojenik farklılaşma uyarılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen adipojenik (solda) ve osteojenik (sağda) farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi. 90
- 4.21.** Besiyerine KİP eklemlisi ile çoğaltılan ve adipojenik ve osteojenik farklılaşma uyarılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen adipojenik (solda) ve osteojenik (sağda) farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi. 91
- 4.22.** Besiyerine PPP eklemlisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi. 91
- 4.23.** İnflamatuvar uyarım varlığında FBS, PL, KİP, PPP eklemlisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin farklılaşma genlerinin RT-PCR analizinin toplu değerlendirilmesi. 92
- 4.24.** Farklı serum eklemleri içeren besiyeri ortamında ve inflamatuvar uyarım varlığı/yokluğunda çoğaltılan MKH'lerin bütünleşik metabolomiks (GC-MS ve LC-qTOF-MS) verilerine ait PCA skor grafiği. 94
- 4.25.** Farklı serum eklemleri içeren besiyeri ortamında ve inflamatuvar uyarım varlığı/yokluğunda çoğaltılan MKH'lerin bütünleşik metabolomiks (GC-MS ve LC-qTOF-MS) verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0.955 ve Q2:0.700). 94
- 4.26.** Farklı serum eklemleri içeren besiyeri ortamında ve inflamatuvar uyarım yokluğunda çoğaltılan MKH'lere ait metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizinde farklılık gösteren metabolitlere ait PLS-DA skor grafiği (R2: 0.576 ve Q2:0.863) ve VIP Grafiği. 95
- 4.27.** Farklı serum eklemleri içeren besiyeri ortamında ve inflamatuvar uyarım varlığında çoğaltılan MKH'lere ait metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizinde farklılık gösteren metabolitlere ait PLS-DA skor grafiği (R2: 0.652 ve Q2:0.968) ve VIP Grafiği. 95
- 4.28.** Ekstrasellüler metabolitlerin PCA grafiği. 123
- 4.29.** Ekstrasellüler metabolitlerin PLS-DA grafiği. (R2: 0,954 Q2:0,903). 123

- 4.30.** İnflamatuvar uyarım yokluğunda çoğaltılan MKH'lere ait ekstrasellüler metabolitlerin PCA grafiği. 124
- 4.31.** İnflamatuvar uyarım yokluğunda çoğaltılan MKH'lere ait ekstrasellüler metabolitlerin PLS-DA skor grafiği (R2: 1.000 ve Q2:0.971) ve VIP grafiği. 124
- 4.32.** İnflamatuvar uyarım varlığında çoğaltılan MKH'lere ait ekstrasellüler metabolitlerin PCA grafiği. 125
- 4.33.** İnflamatuvar uyarım varlığında çoğaltılan MKH'lere ait ekstrasellüler metabolitlerin PLS-DA skor grafiği (R2: 1.000 ve Q2:0.983) ve VIP grafiği. 125
- 4.34.** PL ve FBS varlığında altında çoğaltılan MKH'lere ait metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0.581 ve Q2:0.971). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir. 153
- 4.35.** PL ve FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği. 153
- 4.36.** PL ve FBS varlığında altında çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi. 154
- 4.37.** FBS-PL eklentileri ile çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolomiks yolak analizi (renkler p değerini (kırmızı: $p < 0,05$), halkaların büyüklüğü: yolağın impaktını, yani metabolitin etkilediği yolak sayısını ifade eder). 156
- 4.38.** FBS-PL eklentileri ile çoğaltılan MKH'lerde istatistiksel olarak önemli değişen intrasellüler metabolitlerin yer aldıkları yolaklar. 157
- 4.39.** KİP ve FBS varlığında altında çoğaltılan MKH'lere ait metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0.538 ve Q2:0.976). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir. 158
- 4.40.** KİP ve FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği. 159
- 4.41.** KİP ve FBS varlığında altında çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi. 160
- 4.42.** FBS-KİP eklentileri ile çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolomiks yolak analizi. 162
- 4.43.** FBS-KİP eklentileri ile çoğaltılan MKH'lerde istatistiksel olarak önemli değişen intrasellüler metabolitlerin yer aldıkları yolaklar. 163
- 4.44.** PPP ve FBS varlığında altında çoğaltılan MKH'lere ait metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0.576 ve Q2:0.983). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir. 165
- 4.45.** PPP ve FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği. 165
- 4.46.** PPP ve FBS varlığında altında çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi. 166
- 4.47.** FBS-PPP eklentileri ile çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolomiks yolak analizi. 168
- 4.48.** FBS-PPP eklentileri ile çoğaltılan MKH'lerde istatistiksel olarak önemli değişen intrasellüler metabolitlerin yer aldıkları yolaklar. 169
- 4.49.** İnflamatuvar uyarım varlığında FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0.628 ve Q2:0.956). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir. 171
- 4.50.** İnflamatuvar uyarım varlığında FBS eklentisi içeren besiyerinde çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği. 171

4.51. İnflamatuvar uyarım varlığında FBS eklentisi içeren besiyerinde çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi.	172
4.52. Standart kültür koşulları olan FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yolak analizi.	173
4.53. Standart kültür koşulları olan FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar.	174
4.54. İnflamatuvar uyarım varlığında PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0.604 ve Q2:0.929). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.	175
4.55. İnflamatuvar uyarım varlığında PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.	176
4.56. İnflamatuvar uyarım varlığında PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi.	177
4.57. Besiyerine PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar.	179
4.58. Besiyerine PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar.	180
4.59. İnflamatuvar uyarım varlığında KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0.594 ve Q2:0.961). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.	181
4.60. İnflamatuvar uyarım varlığında KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.	182
4.61. İnflamatuvar uyarım varlığında KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi.	183
4.62. Kültür medyumuna KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar.	185
4.63. Besiyerine KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar.	186
4.64. İnflamatuvar uyarım varlığında PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,627 ve Q2:0,920). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.	187
4.65. İnflamatuvar uyarım varlığında PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.	188
4.66. İnflamatuvar uyarım varlığında PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi.	189
4.67. PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar.	190
4.68. PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar.	191
4.69. PL - PPP varlığında çoğaltılan MKH'lerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,635 ve Q2:0,987).	193
4.70. PL-PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.	193
4.71. PL-PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi.	194

4.72. Besiyerine PL veya PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar.	195
4.73. Besiyerine PL ve PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar.	196
4.74. PL ve KİP varlığında çoğaltılan MKH'lerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,648 ve Q2:0,99).	197
4.75. PL ve KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.	198
4.76. PL ve KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi.	199
4.77. Besiyerine PL ve KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar.	200
4.78. Besiyerine PL ve KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar.	201
4.79. KİP ve PPP varlığında çoğaltılan MKH'lerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2:0.996 ve Q2:0.818). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.	202
4.80. KİP ve PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.	203
4.81. KİP ve PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi.	204
4.82. Besiyerine KİP ve PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar.	205
4.83. Besiyerine KİP ve PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar asellüler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar.	206
4.84. DMFBS ve DMPL'ın içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,795 ve Q2:0,943). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.	208
4.85. DMFBS ve DMPL'ın veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.	208
4.86. DMFBS ve DMPL ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.	209
4.87. DMFBS ve DMPL besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yolaklar.	210
4.88. DMFBS ve DMPL besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatanlarının içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,883 ve Q2:0,985). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.	211
4.89. DMFBS ve DMPL besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatanlarının içerdikleri metabolitlere ait VIP grafiği.	212
4.90. DMFBS ve DMPL besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatanlarının içerdikleri ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.	213
4.91. DMFBS ve DMPL besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitlere bağlı değişen yolaklar.	214
4.92. DMFBS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatanlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlerin ve DMFBS'un içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,854 ve Q2:0,974). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.	215

4.93. DMFBS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMFBS'un içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği.	216
4.94. DMFBS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMFBS'un içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği, regresyon analizi.	217
4.95. DMFBS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMFBS'un içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar.	218
4.96. DMPL besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlerin ve DMPL'in içerdiği metabolitlerin metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R ² : 0,934 ve Q ² :0,995). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.	219
4.97. DMPL besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMPL'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği.	219
4.98. DMPL besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMPL'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği, regresyon analizi.	220
4.99. DMPL besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMPL'in içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar.	221
4.100. DMFBS ve DMKİP'nin içerdikleri metabolitlerin metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R ² : 0,817 ve Q ² :0,974). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.	223
4.101. DMFBS ve DMKİP'nin analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.	224
4.102. DMFBS ve DMKİP ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.	225
4.103. DMFBS ve DMKİP besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yollar.	226
4.104. DMFBS ve DMKİP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitlerin metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R ² : 0,767 ve Q ² :0,998). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.	227
4.105. DMFBS ve DMKİP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği.	227
4.106. DMFBS ve DMKİP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.	228
4.107. DMFBS ve DMKİP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitlere bağlı değişen yollar.	229
4.108. DMKİP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlerin ve DMKİP'nin içerdiği metabolitlerin metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R ² : 0,901 ve Q ² : 0,956).	230
4.109. DMKİP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMKİP'nin içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği.	231
4.110. DMKİP besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMKİP'nin içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği, regresyon analizi.	232
4.111. DMKİP besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMKİP'nin içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar.	233

- 4.112.** DMFBS ve DMPPP'nın içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,843 ve Q2:0,985). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir. 234
- 4.113.** DMFBS ve DMPPP'nın analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği. 235
- 4.114.** DMFBS ve DMPPP ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi. 236
- 4.115.** DMFBS ve DMPPP'nın anlamlı etkilediği metabolik yollar. 237
- 4.116.** DMFBS ve DMPPP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,782 ve Q2:0,957). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir. 238
- 4.117.** DMFBS ve DMPPP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdikleri metabolitlere ait VIP grafiği. 238
- 4.118.** DMFBS ve DMPPP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdikleri ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi. 239
- 4.119.** DMFBS ve DMPPP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitlere bağlı değişen yollar. 240
- 4.120.** DMPPP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlerin ve DMPPP'in içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,901 ve Q2:0,956). 241
- 4.121.** DMPPP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMPPP'in içerdikleri metabolitlere ait VIP grafiği. 242
- 4.122.** DMPPP besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMPPP'nin içerdikleri metabolitlere ait VIP grafiği, regresyon analizi. 243
- 4.123.** DMPPP besi yeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMPPP'in içerdikleri metabolitlere bağlı değişen yollar. 244
- 4.124.** DMFBS ve DMFBSLPS'in içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,938 ve Q2:0,952). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir. 245
- 4.125.** DMFBS ve DMFBSLPS'in analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği. 246
- 4.126.** DMFBS ve DMFBSLPS ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi. 247
- 4.127.** DMFBSLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlerin ve DMFBS'un içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,809 ve Q2:0,906). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir. 248
- 4.128.** DMFBS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMFBSLPS'in içerdikleri metabolitlere ait VIP grafiği. 248
- 4.129.** DMFBSLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMFBSLPS'in içerdikleri metabolitlere ait VIP grafiği, regresyon analizi. 249
- 4.130.** DMFBSLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMFBSLPS'in içerdikleri metabolitlere bağlı değişen yollar. 250
- 4.131.** DMPL ve DMPLPS'in içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,883 ve Q2:0,562). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir. 251

4.132. DMPL ve DMPLPS'in analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.	252
4.133. DMPL ve DMPLPS ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.	253
4.134. DMPLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlerin ve DMPLPS'in içerdiği metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,959 ve Q2:0,853).	254
4.135. DMPLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMPLPS'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği.	255
4.136. DMPLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMPLPS'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği, regresyon analizi.	256
4.137. DMPLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMPLPS'in içerdiği metabolitlere bağlı anlamlı değişen tek yolak; biyotin metabolizması.	257
4.138. DMKİP ve DMKİPLS'in içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,84 ve Q2:0,957).	258
4.139. DMKİP ve DMKİPLS'in analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.	259
4.140. DMKİP ve DMKİPLS ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.	260
4.141. DMKİP ve DMKİPLS besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yollar.	261
4.142. DMKİPLS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlerin ve DMKİPLS'in içerdiği metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,863 ve Q2:0,96). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.	262
4.143. DMKİPLS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMKİPLS'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği.	262
4.144. DMKİPLS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMKİPLS'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği, regresyon analizi.	263
4.145. DMKİPLS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMKİPLS'in içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar.	264
4.146. DMPPP ve DMPPPLS'in içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,972 ve Q2:0,592).	265
4.147. DMPPP ve DMPPPLS'in analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.	266
4.148. DMPPP ve DMPPPLS ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.	267
4.149. DMPPPLS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlerin ve DMPPPLS'in içerdiği metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,948 ve Q2:0,585).	268
4.150. DMPPPLS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMPPPLS'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği.	268
4.151. DMPPPLS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMPPPLS'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği, regresyon analizi.	269

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Klinik kullanım için hazırlanan MKH için kalite kontrol testleri.	24
2.2. MKH'ler için etkinlik testlerinden örnekler.	25
2.3. MKH üretiminde yaygın olarak kullanılan biyolojik materyal ve faktörler	26
3.1. MKH kültür besiyerleri içerikleri .	54
3.2. Kanın Temel İçeriğinin Hacim ve Yoğunlukları..	55
3.3. PK grup 1 (10 x 50 mL, 1 x 40 mL)	57
3.4. PK grup 2 (12 x 47,16 mL).	57
3.5. PPP grup (10 x 46,2 mL)	59
3.6. KİP grup (10 x 49,8 mL)	60
3.7. qRT-PCR de kullanılan primerlerin dizileri	66
3.8. LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizler gradient elüsyon porgramı.	69
3.9. LC-qTOF-MS cihaz parametreleri.	69
3.10. GC-MS analiz koşulları ve cihaz parametreleri	70
4.1. Kültür besiyeri eklentilerinin kalite test sonuçları ortalama değerler verilmiştir	73
4.2. WST assay One-Way ANOVA analizleri	78
4.3. WST assay Two-Way ANOVA analizleri	79
4.4. Dört farklı koşulda çoğaltılan MKH'lerin akım sitometri incelemesi	79
4.5. GC-MS ve LC_qTOF-MS analizleri ile tanımlanan intrasellüler metabolitler	96
4.6. Farklı besiyeri eklentileri ve inflamatuvar uyarım varlığında ve yokluğunda MKH'lerin metabolomik analizler sonucunda intrasellüler metabolitler ve bağlı derişimleri.*	102
4.7. Farklı besiyeri eklentileri ve inflamatuvar uyarım varlığında ve yokluğunda çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolitlerinin gruplar arası istatistiksel olarak karşılaştırılmalarına ait p değerleri.	112
4.8. GC-MS analizleri ile tanımlanan ekstrasellüler metabolitler	126
4.9. Besiyeri eklentileri (FBS, PL, KİP, PPP)'nin tanımlanan bu ekstraselüler metabolitlere göre karşılaştırmalı içerikleri ve bağlı derişimleri.*	129
4.10. Kültür besiyerleri (DMFBS, DMPL, DMKİP, DMPPP, DMFBSLPS, DMPLLPS, DMKİPLPS, DMPPPLPS)'nin içerikleri ve bağlı derişimleri.*	132

4.11. Kùltür süpernatanları (DMFBS medsup, DMPL medsup, DMKİP medsup, DMPPP medsup, DMFBSLPS medsup, DMPLLPS medsup, DMKİPLPS medsup, DMPPPPLPS medsup)'nin içerikleri ve bağıl derişimleri.*	137
4.12. MKH kùltüründe kullandığımız besiyerlerinin metabolik analizlerle saptanan ekstrasellùler metabolitlerinin gruplar arası istatistiksel olarak karşılaştırılmalarına ait p değerleri.	142
4.13. MKH kùltür süpernatanlarının metabolik analizlerle saptanan ekstrasellùler metabolitlerinin gruplar arası istatistiksel olarak karşılaştırılmalarına ait p değerleri..	147
4.14. FBS-PL eklentileri ile çoğaltılan MKH'lerde istatistiksel olarak önemli değişen intrasellùler metabolitlerin yer aldıkları yolaklar.	155
4.15. FBS-KİP eklentileri ile çoğaltılan MKH'lerde istatistiksel olarak önemli değişen intrasellùler metabolitlerin yer aldıkları yolaklar.	161
4.16. FBS-PPP eklentileri ile çoğaltılan MKH'lerde istatistiksel olarak önemli değişen intrasellùler metabolitlerin yer aldıkları yolaklar	167
4.17. Standart kùltür koşulları olan FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellùler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar.	173
4.18. Besiyerine PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellùler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar	178
4.19. Besiyerine KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellùler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar	184
4.20. Kùltür medyumuna PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellùler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar	189
4.21. Besiyerine PL ve PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin değişen intrasellùler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar	195
4.22. Besiyerine PL ve KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin değişen intrasellùler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar	199
4.23. Besiyerine KİP ve PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin değişen intrasellùler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar	204
4.24. DMFBS ve DMPL besiyerlerinin istatistiksel olarak anlamlı değişen metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar	210
4.25. DMFBS ve DMPL besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan akstrasellùler metabolitlere bağlı değişen yolaklar	214
4.26. DMFBS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMFBS'un içerdđđi metabolitlere bağlı değişen yolaklar	217
4.27. DMPL besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMPL'in içerdđđi metabolitlere bağlı değişen yolaklar.	221
4.28. DMFBS ve DMKİP besiyerlerinin istatistiksel olarak anlamlı değişen metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar	225
4.29. DMFBS ve DMKİP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitlere bağlı değişen yolaklar.	229
4.30. DMKİP besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMKİP'nın içerdđđi metabolitlere bağlı değişen yolaklar.	232
4.31. DMFBS ve DMPPP besiyerlerinin istatistiksel olarak anlamlı değişen metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar	236

4.32. DMFBS ve DMPPP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitlere bağlı değişen yollar.	240
4.33. DMPPP besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMPPP'in içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar.	243
4.34. DMFBSLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMFBSLPS'in içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar	250
4.35. DMPL ve DMPLLPS besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yolak; yağ asit biyosentezi	253
4.36. DMPLLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMPLLPS'in içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar	256
4.37. DMKİP ve DMKİPLPS besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yollar	260
4.38. DMKİPLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMKİPLPS'in içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar	264
5.1. Farklı besiyeri eklentileri ve inflamatuvar uyarım varlığında ve yokluğunda üretilen MKH'lerin bazı yağ asitlerinin intrasellüler düzeyinin bağlı değişimleri.	283

1 GİRİŞ

Rejeneratif tıpta mezenkimal kök hücre (MKH)'lerin hasar onarımında ve immünmodulasyonda önemli rolleri vardır ve klinik kullanıma olan ilgi giderek artmaktadır. Mezenkimal kök hücreler stromal kökenli hücreler olduğundan sayıları azdır, bu yüzden *in vitro* olarak kültürde çoğaltılıp kullanılırlar (1). Günümüzde MKH üretiminde kültür ortamında temel besi kaynağı olarak gerekli olan amino asit, vitamin, glikoz, inorganik tuzlar yanında büyüme faktörleri kaynağı olarak fetal sığır serumu (Fetal bovine serum, FBS) kullanılmaktadır (2). Klinik amaçlı kullanılacak hücrelerin geliştirilmesi için kullanılacak olan FBS sadece virüsler, prionlara bağlı hastalıklar ve zoonotik kontaminasyonlar gibi istenmeyen ksenojenik patojenlerin kaynağı değil, aynı zamanda immün aracılı reaksiyonlara, hatta anafilaktik şoka sebep olabilecek antijenleri ve immüoglobulinleri de içerebilmektedir (3). Bu sebeple, hayvansal ürün içermeyen serum eklentileri veya benzerlerini içeren kültür besiyerlerinin klinik uygulamalar amaçlı kullanımına yönelik ilgi her geçen gün artmaktadır.

İnsanlar için kullanımda tüm bu sorunların önüne geçebilmek için insan kaynaklı alternatifler mevcuttur. Bunlar serum, plazma, platelet kökenli ürünler, göbek kordonu serumu ve plazmasıdır (4). Mezenkimal kök hücre kültüründe kullanılacak bu eklentilerin ayrıştırma yöntemleri, oranları, tek başlarına/kombine kullanım şekilleri standart değildir. Serum/plazma eklentilerinin MKH'lerin biyolojik ve fonksiyonel özelliklerine etkisini araştıran çalışmalar vardır, ancak araştırma yöntemlerindeki farklılıklar nedeniyle sonuçlar değişkendir. Ayrıca bu eklentilerin MKH'lerin metabolik özelliklerine olan etkisi konusunda çok kısıtlı çalışma vardır. Mitokondri ve granül yönünden çok zengin olan plateletlerin (trombosit, kan pulcuğu) ortamın metabolik özelliklerini değiştirmek yoluyla MKH'lerin biyolojik özelliklerine ve metabolit profiline etkisi olacağı düşünülerek bu tez planlanmıştır.

Bunun için çalışmamızda MKH üretim ortamında serum/plazma kaynağı olarak FBS veya insan kaynaklı serum faktörlerinden platelet lizat (PL)'in etkisi karşılaştırılmış elde edilen sonuçların platelet ilişkili olduğunun gösterilmesi için plateletten fakir plazma (platelet poor plazma-PPP), ayrıca kemik iliği mikroçevresinin etkilerinin araştırılması için de kemik iliği plazması (KİP) varlığında incelemeler yapılmıştır. Bu serum eklentilerinin MKH proliferasyonu, farklılaşma özellikleri üzerine etkileri araştırılmış, hücrelerin ve kültür ortamının metabolomik profili çalışılmıştır. Ek olarak da MKH'lerin klinikte en sık kullanıldığı durum olan inflamatuvar hastalıklarda MKH üretiminde kullanılacak serum/plazma eklentilerinin hücrelerin biyolojik ve metabolik özelliklerine etkisini araştırmak üzere, MKH'ler lipopolisakkarit (LPS) varlığında inflamatuvar ortama maruz bırakılmış ve farklı eklentilerin etkisi araştırılmıştır. Plateletler pıhtılaşma faktörleri, büyüme faktörleri (Platelet derived growth factor/PDGF, transforming growth factor beta-1/TGF β 1, insulin like growth factor 1/IGF1, hepatocyte growth factor 1/HGF1, vascular endothelial growth factor/VEGF, fibroblast growth factor-2/FGF2 ve interleukinler (IL1, IL4, IL6, IL10, IL13) açısından zengindirler. Bu faktörlerden PDGF (5, 6), VEGF ve HGF'ün (7-9) *in vitro* MKH üretimini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca platelet lizat veya plateletten zengin plazma kullanımının FBS ile kıyaslandığında MKH üretimini ve/veya fonksiyonlarını (farklılaşma, immunsupresyon, angiogenez, trofik etki vb) olumlu etkilediği de gösterilmiştir (10). Diğer taraftan, son yıllarda rejeneratif veya immünmodulasyon amaçlı kullanılacak hücrelerin kullanım öncesi özel kültür koşullarında uyarılması/koşullandırılması (preconditioning)'nın önemi gösterilmiştir. IFN gamma (IFN- γ) ile uyarıldıktan sonra MKH'lerin antiinflamatuvar etkili olması buna örnektir (11). Çalışmamızda farklı besiyerlerinde üretilen MKH'lerin, koşullandırılmış inflamatuvar ortam ile özel kültür koşullarında birleştirilmesi ile de karşılaştırma yapılmıştır.

Bir hücrenin/organizmanın fenotipi ve fonksiyonu, bir arada olan ve etkileşen genler, transkriptler, proteinler ve metabolitler ile tanımlanır. Günümüzde yenilikçi teknolojiler sayesinde genom, transkriptom, proteom ve metabolom detaylı tarama analizleri yapılabilmektedir. Metabolomik analizler; çalışmamızda yapmak istediğimiz

gibi farklı kültür koşullarının MKH'ler ve mikroçevrede oluşan metabolik değişiklikleri ayrıntılı analiz edecek, büyük bir potansiyele sahiptir (12). Güçlü bir analiz tekniği olarak kullanılan metabolomik, 'omiks' teknolojilerinin içinde en yenilerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğer omik teknolojilerine göre en büyük üstünlüğü yaşayan organizmada ne olduğunu gösteren anlık fotoğrafı yani fenotipi yansıtmadır (13). Metabolomik; belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda küçük moleküllü metabolitlerin (moleküler ağırlığı <1000 Da) tanımlaması ve miktarının belirlenmesidir. Bu tez çalışmasında MKH kültürlerinde standart olarak kullanılan FBS ile, bunun yerine geçebilecek insan kaynaklı PL'ın, ayrıca PPP ve KİP'nin, ve LPS ile oluşturulan inflamatuvar ortamın MKH biyolojik ve metabolik özelliklerine etkileri incelenmiştir.

Farklı serum/plazma eklentileri (FBS, PL, PPP, KİP) MKH'lerde hücre düzeyinde belirgin metabolik değişikliklere yol açmıştır. Hücrelerin çok değişkenli veri analizi ile PLS-DA (partial least squares-discriminant analysis, kısmi en küçük kareler-ayrıt edici analiz) skor grafiğinde tüm grupların birbirinden belirgin ayrıldığı dikkati çekmiş, VIP (variable important in project, projede önemli değişken) grafiğinde azalan ve artan metabolitler belirlenmiş, yolak analizlerinde de istatistiksel anlamlı farklılık gösteren yolaklar belirlenmiştir. Lipopolisakkarid ile oluşturulan inflamatuvar ortamda da MKH metabolik profillerinde istatistiksel anlamlı değişiklikler olmuştur.

Farklı serum/plazma eklentileri (FBS, PL, PPP, KİP) ile ekstraselüler metabolitlerin incelenmesinde hücre eklenmeden önce tam besiyeri ortamı ve ardından "conditioned medium"/supernatan analizlerinde belirgin metabolik değişiklikler gözlenmiştir. Ortamda fazla bulunan bir metabolitin MKH eklenince azalması bu metabolitin hücreler tarafından kullanıldığı, aksine MKH eklenmesi ile ortamda artış olması MKH'ler tarafından ortama salınım olarak değerlendirilmiştir. Ortamın metabolik analizlerinde gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Çok değişkenli veri analizi ile PLS-DA skor grafiğinde tüm gruplar hücrelerin analizinde olduğu gibi birbirinden belirgin ayrılmasa da grupların ikili karşılaştırmalarında ayırım görülmüş, VIP grafiğinde azalan ve artan metabolitler

belirlenmiş, MetaboAnalyst programı ile yolak analizlerinde de istatistiksel anlamlı farklılık gösteren yolaklar belirlenmiştir.

Lipopolisakkarid ile oluşturulan inflamatuvar ortamda ekstraselüler metabolitlerde MKH öncesi ve sonrası belirgin değişiklikler olmuş, her grubun kendi içinde inflamatuvar ortama maruz kaldığı durumların çok değişkenli veri analizi ile PLS-DA skor grafiğinde LPS sonrası gruplarda belirgin bir ayrılma gözlenmiş, istatistiksel anlamlı değişen metabolit ve yolaklar belirlenmiştir.

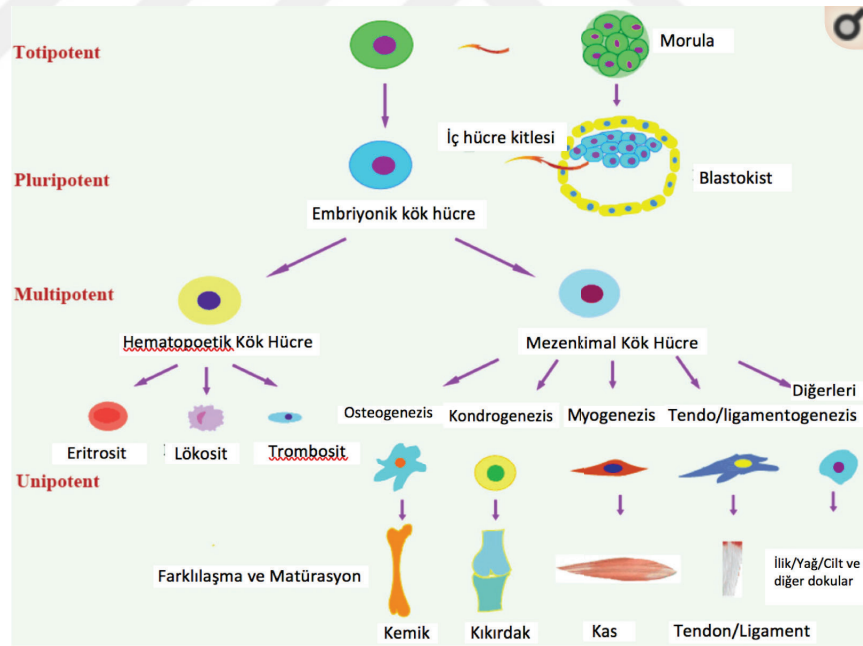
Bu çalışmada 8 ayrı grup, ayrıca her grubun kendi içinde çok sayıda tekrarlı (n=6) olarak hem hücre düzeyinde hem de ortamdaki değişikliklerin (tam besiyeri ve supernatan) ayrı ayrı GCMS ve LCQTOF MS (liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry) ile analiz edilmiş olması nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı çok sayıda değişiklik saptanmıştır. Bunlar içerisinde MKH biyolojisi ile ilişkilendirilen metabolitler ve ilişkili yolaklar seçilmiş, bunların gruplar içerisindeki ifadeleri tek tek analiz edilerek sonuçlar bir bakıma teyit edilmiş/desteklenmiş ve bu sonuçlar ile literatür verileri üzerinden MKH biyolojisi ve kliniğe yönelik potansiyel açısından değerlendirmeler yapılmıştır.

Tüm analizler grupların tamamında yapılmış, FBS yerini alabilecek eklenti adayı olarak PL ile FBS karşılaştırmaları esas alınmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre (KH)

Kök hücreler, kendini yenileyebilme ve farklı hücre türlerine farklılaşma kapasiteleri olan hücreler olarak tanımlanmaktadır. Bütün kök hücreler döllenmiş yumurtadan köken alırlar. Döllenmiş yumurta totipotent özelliktedir, büyüme ve gelişme sırasında tüm intra ve ekstraembriyonik dokuların oluşumunu sağlama kapasitesine sahiptir. Embriyonik olgunlaşma sürecinde, embriyonik kök hücreler (EKH) ise embriyonun tüm dokularının oluşumunu yönlendirmek için pluripotent kapasiteye sahiptir, ancak plasenta ve amniyotik membran gibi ekstraembriyonik dokular bu özellikte değildir. Embriyo olgunlaştıkça, tespit edilen multipotent kök hücreler pluripotent kapasiteleri sınırlansa da ileri farklılaşmış hücre tiplerini üretebilmek için son derece güçlü bir yetenektedirler.



Şekil 2.1. Kök hücrelerin kökeni. Zhang L, 2009 (14) makaleden uyarlanmıştır.

Kök hücre araştırmalarının tarihçesine baktığımızda, eski Yunanlıların canlı varlıkların kendiliğinden ortaya çıkabileceğine inandıkları (*Generatio spontanea*) zamanlardan, Aristoteles'in (MÖ 384-322) embriyonun annenin adet kanından

kaynaklandığını varsaydığı, düzenin düzensizlikten doğabileceği inacına kadar gidebiliriz (15). Kendiliğinden nesil kavramı (*spontaneous generation*), İtalyan doktor Francesco Redi'nin tüm yaşam biçimlerinin kendiliğinden ortaya çıkmadığını deneylerle gösterdiği 1600'lerin ortasına kadar kabul görmüş ve geçerli olmuştur (16). 1800'lerin ortalarında Alman zoolog Franz Leydig kendiliğinden nesil kavramının hiçbir bağlamda gerçekleşmediğini ve tüm yaşamın önceden var olan yaşamdan geldiği (*omne vivum ex vivo*) savını önermiştir.

Her ne kadar Robert Hooke, hücrenin keşfi ile anılsa da, Çek anatomist ve fizyolog Purkyne'nin, serebellumun histolojik özelliklerini ilk kez mikrotom kullanarak ve doku dilimlerini inceleyerek yaptığı analizlerle Purkinje hücrelerini keşfettiği gözlem genellikle hücrelerin gösterildiği ilk kesin belgeleri olarak kabul edilir (17). Kendiliğinden nesil teorisine kesinlikle katılmayan Virchow, 1858'de tüm hücrelerin önceden var olan hücrelerden (*Omnis cellula e cellula*) geldiğini ön koşul olarak göstermek için, nematodlarla birtakım deneyler yapmış ve "hücre teorisi"nin büyük bir savunucusu olarak tarihte yerini almıştır. Hem Leydig'in hem de Virchow'un hücre biyolojisi alanındaki araştırma ve teorileri kök hücre araştırmaları için zemin hazırlamıştır. Ardından 1864'te Louis Pasteur'ün fermantasyonda mikroorganizmaların rolü üzerine yapılan araştırmalar resmen kendiliğinden nesil teorisini çürütmüştür (18).

Biyofizikçi James Till ve hematolog Ernest McCulloch, 1961'de kemirgen kemik iliği hücre süspansiyonunda sonsuz çoğalma yeteneğine sahip yetişkin kök hücrelerin varlığını keşfetmişlerdir. Bu hücrelerin nakledilebildiğini ve kök hücre sayılarını karakterize eden ilk koloni sayma metodolojisini de belirlemişlerdir (19). Till ve McCulloch'un bu erken bulguları, kök hücre araştırmaları ve terapötik gelişmeler üzerindeki belki de en önemli etkiye sahiptir.

Günümüzde kök hücreler potansiyellerine göre başlıca pluripotent veya multipotent kök hücre olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca, farklılaşma potansiyelleri sınırlandıkça oligopotent, bipotent, unipotent diye de adlandırılmaktadırlar.

2.2. Pluripotent Kök Hücre

Pluripotent kök hücre her üç germ yaprağına (endoderm, mezoderm, ektoderm) ait tüm hücre tiplerine farklılaşabilen ve sonsuz (veya çok uzun süre) çoğalma kapasitesine sahip hücrelerdir. Sadece embryonik dönemde bulunurlar. Postnatal bir organizmada pluripotent özellikte kök hücre bulunmaz, farklı dokularda tespit edilen ve erişkin kök hücre denilen hücreler multipotent özelliktedir.

2.2.1. Embriyonik Kök Hücre (EKH)

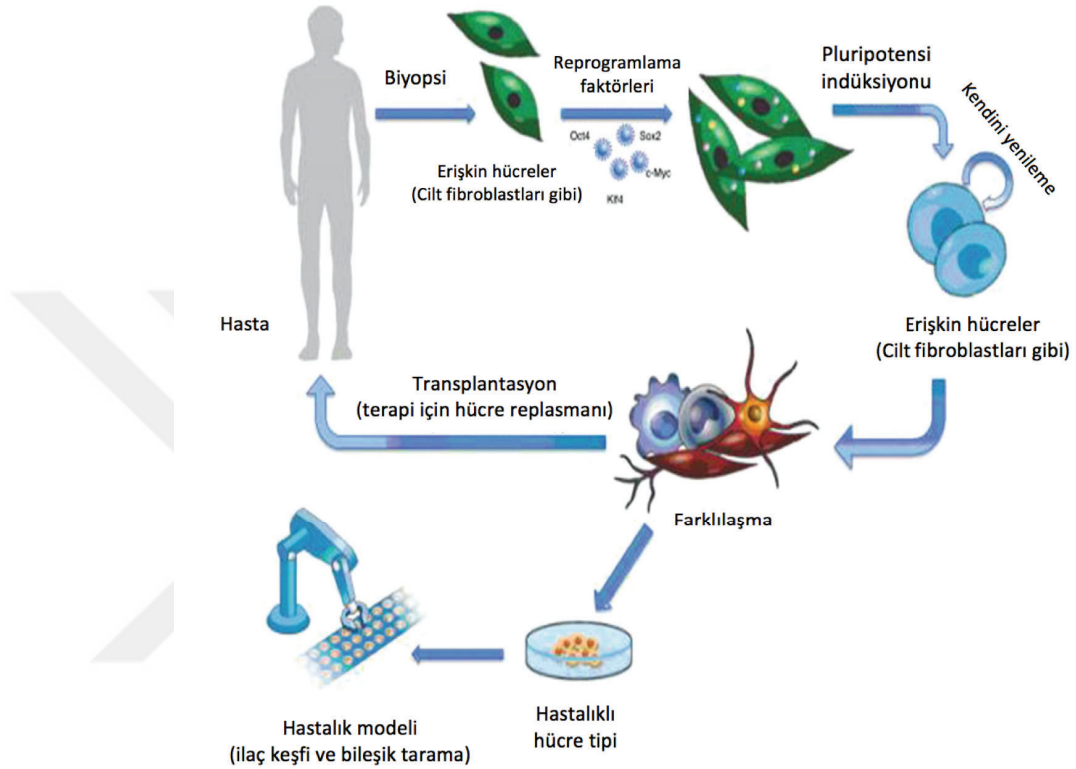
Embriyonik kök hücreler, pluripotent özelliktedir ve blastosist aşaması embriyolarının iç hücre tabakasından elde edilirler. Memeli EKH'leri ilk kez 1967'de, Robert Edwards ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada besleyici katmanlarda kültüre ettikleri tavşan blastosistlerinin hematopoetik, nöral, kas ve bağ dokusunu temsil eden çeşitli erişkin hücre tiplerine farklılaştırılması ile izole edilmiştir (20). 1981'de, fare EKH'leri, iki bağımsız araştırma ekibi tarafından (Gail Martin - Martin Evans ve Andrew Kaufman) izole edilmiş ve kültürlenmiştir (21, 22). İnsan EKH'leri ise in-vitro fertilizasyonların atık embriolarından Thomson ve arkadaşları tarafından 1998'de kültür edilmiştir (23).

Embriyonik kök hücreler, sadece embryonik dönemde bulunurlar. Çok potent olup her tip dokuya ait hücre serilerini oluşturabilirler. Bu nedenle klinikte kullanım açısından çok ilgi çekse de insan embriolarından (atık da olsa) elde edilmiş olmaları nedeniyle etik kısıtlılıklar vardır. Ayrıca her üç germ yaprağına ait hücrelere farklılaşabilme ve teratom oluşturma potansiyeli taşımaları da klinik uygulama açısından dezavantaj oluşturmaktadır (24, 25).

2.2.2. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (UPKH) (induced pluripotent stem cells - iPSC)

Doğum sonrası bir organizmada pluripotent özellikte kök hücre bulunmamaktadır. Son 10 yılda hücrelerin yeniden programlanma teknikleri çok gelişmiş, olgunlaşmış bir hücrenin de-diferansiasyonu mümkün olmuş, böylelikle,

herhangi bir kişiye ait farklılaşmış hücrelerden EKH'lere benzer pluripotent özellikte kök hücreler elde edilebilmiştir. Bu teknoloji, Kyoto Üniversitesi Frontier Tıp Bilimleri Enstitüsü'nden Japon araştırmacı Shinya Yamanaka'ya 2012 yılı Nobel ödülünü kazandırmıştır.



Şekil 2.2. Hastaya özel uPKH üretilmesi. Kristina Hug, 2010. Translational Stem Cell Research (26) adlı kitaptan uyarlanmıştır.

Bu teknoloji ile hastaya özel pluripotent özellikte son derece potent hücrelerin eldesi mümkün olmuş, bu durum hastalık modelleme, ilaç araştırmaları açısından çığır açmış ve ileriye dönük tedavi potansiyeli oluşturmasıyla da tıp alanında günümüzün en ilgi çeken konuları arasına girmiştir.

Hücrelerin yeniden programlaması yoluyla hastaya özgü kök hücreler üretmek için, bağımsız fakat birbiri ile ilgili üç yöntem geliştirilmiştir; hücre füzyonu, nükleer transfer, transkripsiyon faktörü temelli indüksiyon. Terminal olarak farklılaşmış fenotipi hangi faktörlerin tersine çevirebileceği, Yamanaka ve ark tarafından, farklılaşmamış EKH'lerde yüksek düzeyde ifade edildiği bilinen 24 gen lokusunun sistematik karakterizasyonu yoluyla araştırılmış, embriyonik ve yetişkin fare

fibroblastlarında Fbx15'in sadece EKH'lerde ifade edildiği gösterilmiştir. Bu eleme yönteminde dört anahtar transkripsiyon faktörü Oct-4, Sox2, Klf4 ve c-Myc kombinasyonu, morfolojik ve moleküler bir dönüşümü sağlamak ve fibroblastların yeniden programlanması ve EKH benzeri pluripotent özellik kazanmaları için yeterli bulunmuştur (27). Diğer çalışma grupları daha sonra c-Myc'nin pluripotenti uyarılması için vazgeçilebilir olduğunu göstermişlerdir (28, 29). UPKH eldesinin geleceği kuşkusuz yukarıda bahsedilen endojen faktörleri uyarmak için küçük moleküllerin kullanılmasını veya henüz tanımlanmamış bir asıl faktör düzenleyicisini kullanmayı içerecektir. Bu yaklaşım, yeniden programlanma için dışarıdan transkripsiyon faktörleri kullanma ihtiyacını ortadan kaldırarak genom değişimi güvenlik kaygılarını giderecektir.

Rejeneratif tıpta genetik olarak uyumlu olmayan hücreleri içeren doku ve hücre replasman tedavileri, hastanın bağışıklık sistemi tarafından reddedilme riski taşımaktadır. Rejeneratif terapide otolog replasman, hücre, doku veya organ reddi olasılığını ortadan kaldırarak hastanın kendi hücrelerindeki bir bozukluğu etkili bir şekilde tedavi etmeyi mümkün kılar. Parkinson hastalığı, alzheimer hastalığı, diyabet gibi rahatsızlıkların tümü immün rejeksiyon engelinin giderilmesi durumunda, kök hücre ile ilgili rejeneratif tıp için adaydırlar. Ayrıca, bireyin kendi olgunlaşmış hücrelerinden uPKH üretmek, rejeneratif tıp tedavilerinin geliştirilmesinde embriyo kullanma ihtiyacını da ortadan kaldıracaktır. Ancak henüz yeni sayılabilecek bu teknoloji ile üretilmiş hücrelerin kullanımı konusunda hasta güvenliği tam anlamıyla sağlanana kadar günümüzde yine de en çok kullanılan kök hücreler, erişkin kök hücre tiplerinden ve multipotent özellikte olan hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerdir.

2.3. Multipotent (Erişkin) Kök Hücreler

Erişkin kök hücreler, organ veya dokularda bulunan, kendi kendini yenileyebilme ve o organ veya doku sisteminin hücrelerinin bazılarını veya tümüne farklılaşabilme kapasitesine sahip olan, farklılaşmamış hücrelerdir. Bu kök hücrelerin, dönüşecekleri olgun hücrelerin üretimi için kaderleri kararlaştırılmış ve yönlendirilmiş

olup, farklılaşma kapasiteleri oldukça kısıtlıdır. Multipotent veya bipotent ya da unipotent özelliktedirler. McCulloch ve Till'in kemik iliğindeki ilk çalışmalarından başlayarak, son 50 yılda, çok sayıda somatik kök hücrenin keşfedildiğini ve ihtiyaç halinde bunların doku ve organları hücrelerle doldurma kapasitesine sahip oldukları görülmüştür. Erişkin kök hücrelerin, beyin, kemik iliği, damar ve periferik kan, iskelet kası, kalp dokusu, hepatik doku, yumurtalık epiteli, bağırsak, diş ve testis gibi çeşitli dokularda ve organ sistemlerinde varlığı keşfedilmiştir. Bu dokuların her birinde, içinde erişkin kök hücrelerin bulunduğu ideal bir mikroçevre olan bir “kök hücre niş”i vardır. Bu niş hem kök hücre havuzunun korunmasına, kök hücrelerin çoğalmasına hem de bazı durumlarda kök hücrelerin farklılaşmasına yol açar. Bu hücreler çok sayıda tıbbi rahatsızlığın tedavisi için değerli bir kaynak sağlayabilmektedir.

Erişkin kök hücrelerin, embriyonik kök hücrelerden en belirgin farkı, hücre bölünme kapasitelerinin sınırlı olması ve farklılaşma kapasitelerinin de bir veya birkaç soy ile sınırlandırılmış olmasıdır. Erişkin kök hücreler içerisinde en iyi bilinen ve en fazla araştırılmış olanlar klinikte hematopoietik kök hücre nakli (HKHN) amacıyla yaygın kullanılmakta olan HKH'ler ile son 15-20 yılda rejeneratif tıp araştırma ve uygulamalarında çok ilgi çeken mezenkimal kök hücreler (MKH)'dir. Her iki hücre tipi de multipotent özelliktedir

2.4. Hematopoetik kök hücre (HKH)

HKH'ler, erişkin kan sisteminin tüm hücresele elemanlarına farklılaşabilen heterojen bir kök hücre popülasyonu olarak tanımlanabilir. HKH'ler multipotent özellikleri ile, çeşitli kan hücresi tiplerine farklılaşma yeteneğine sahipken, özel koşullar dışında diğer organ sistemlerine katkıda bulunmazlar ki bu sınırlı farklılaşma kapasitesi, onları erişkin kök hücre olarak tanımlar. Embriyonik dönemde HKH'ler yolk sak kesesi damar gelişimini oluşturmak üzere hem endotelial hücreler, hem de eritrositlere farklılaşan ekstraembriyonik hemanjiyoblastlar olarak bulunurlar. Erişkin HKH'ler, daha sonra gelişimde ortaya çıkar ve embriyogenez sırasında erken HKH oluşumuna benzer sinyal ve transkripsiyonel kontrol mekanizmaları ile kontrol edilir. 1978'in başlarında Schofield, doğumdan sonra kemik iliğinin belirli bir “niş”i

içinde yer alan, köklülük ve farklılaşma yeteneği olan HKH'lerin, varlığını ortaya çıkarmıştır (30). HKH'lerin köklülük özelliği, farklı kan hücre tiplerinin üretimi ve yaşam boyu devamı için gereklidir. Son 40 yıl boyunca, HKH niş kavramı, kemik iliği endosteal ve vasküler nişler arasındaki etkileşim tanımı ile genişletilmiştir. Kemik iliğinin kemiğe bağlandığı endosteum bölgesi (endosteal niş) HKH'lerin gelişimine, korunmasına ve KH davranışına yol açtığı düşünülen çok sayıda sitokin salgılayan osteoblastik hücrelerden oluşur. Örneğin, trombopoietin ve anjiyopoietin HKH'lerin sessiz kalma özelliğini artırır (31, 32). Osteoblastlardan salgılanan Jagged, N-cadherin ve stromal cell derived factor-alpha (SDF-1 α /CXCL12) gibi moleküllerin, kök hücrelerinin kendini yenileme ve miyelopoezi arttırdığı gösterilmiştir (33, 34). SDF-1 endosteal niş yanısıra vasküler niş, endotel hücreleri ve stromal hücrelerden de salgılanır ve migrasyon ile ilişkilidir. Transforming growth factor β süperailisi üyeleri TGF β 1, Bone morphogenetic protein (BMP)2 ve BMP7A osteoklastların kemiği parçalaması sonucu salınır ve HKH'lerin migrasyonuna katkı sağlar (35, 36). Yüksek endosteal kalsiyum seviyeleri de HKH göçünü artırır (37). Kemik iliğinin sinüzoidlerden zengin vasküler bölgesi ise HKH'lerin farklılaşması ve kana olgun kan hücreleri olarak çıkması için gerekli sinyalleri sağlar. Endosteal nişin bir bileşeni olan sempatik sinir sistemi de, kemik iliğinden HKH mobilizasyonu için bir uyarandır (38). Endosteal ve vasküler nişlerden kaynaklanan diğer birçok sinyal faktörü hematopoezi etkilemektedir. Kemik iliği nişinin en önemli elemanlarından birisi stromal kökenli hücreler olup kemik iliğinde osteoblast ve adipositlerin öncüsü olan mezenkimal kök hücrelerdir (MKH).

2.5. Mezenkimal Kök Hücre

Mezenkimal kök hücre olarak bilinen hücreler, ilk olarak Friedenstein ve arkadaşları tarafından kemirgenlerin kemik iliğinden kültürlenmiş fibroblast benzeri hücre popülasyonunda yapışan hücreler olarak tanımlanmıştır (39). Yaptıkları deneysel çalışmalarda, bu hücrelerin böbrek kapsülü altına implantasyonu ardından, hematopoezi destekleyen rudiment kemik dokusu ürettiklerini göstermişlerdir. Friedenstein'in metodu daha sonra insan kemik iliğinden benzer hücreleri türetmek

için de kullanılmış (40), bu hücrelerin uzun süreli kültür deneylerinde hematopoezi desteklediği gösterilmiştir (41). Daha sonra Caplan, bu hücrelerin mezenkimal dokular için kök hücre olduğunu ve bu “mezenkimal kök hücreler”in birçok doku rejenerasyonunda terapötik potansiyele sahip olabileceğini önermiştir (42). Mezenkimal kök hücreler, yetişkin kemik iliği (Kİ) hücrelerinin sadece küçük bir popülasyonuna (<% 0.01) karşılık gelir (43) ve bu alandaki en büyük zorluklardan biri, bunların Kİ hedeflerinden doğrudan izole edilmesi için güvenilir veya yaygın olarak kabul edilen bir belirteçin bulunmamasıdır. Bu nedenle, Stro-1 (44), cluster of differentiation (CD)271 (Low-affinity nerve growth factor receptor, LNGFR) (45) ve CD146 (melanoma cell adhesion molecule, MCAM) (46) gibi yüzey belirteçleri bu hücrelerin doğrudan izolasyonu için önerilmiş olmasına rağmen, hangisinin Kİ ortamında bulunan hücrelerin en fazla temsilcisi olduğu konusunda hala bir fikir birliği yoktur. Halen MKH tanımlanmasında kullanılan yöntemler, bu hücrelerin adeziv özellikleri, stromal belirteçlere sahip olmaları ve konnektif dokuya ait hücrelere farklılaşabilme özelliklerinin gösterilmesine dayanmaktadır.

2.5.1. Mezenkimal kök hücre eldesi

Kemik iliğindeki düşük MKH sayısı, deneysel veya klinik kullanım için, hücrelerin *in vitro* olarak çoğaltılmasını gerektirir. Kemik iliği kaynaklı MKH'ler, en yaygın olarak Kİ mononükleer hücre (Kİ-MNH)'lerinin kültür plakalarına yerleştirilmesi ve yapışan hücrelerin pasajlanması ile izole edilirler. Bu işlem, birkaç pasajdan sonra homojen bir fibroblast benzeri hücre popülasyonunun çoğalmasına yol açar (47). Her ne kadar MKH'ler başlangıçta Kİ'nden izole edilmiş olsa da, yağ dokusu (48), göbek kordon kanı, kordon dokuları ve plasenta (49) ve kalp (50) dahil olmak üzere hemen hemen tüm dokulardan; fetal akciğer, karaciğer ve kan (51); ve hatta embriyonik kök hücrelerden (52) de, benzer fenotip, farklılaşma potansiyeli ve biyolojik özellikleri olan hücreler türetilmiştir. Ayrıca, Kİ dışı dokulardan türetilen MKH'lerin Kİ'nden türetilmiş MKH'lere çok benzeyen immünomodülatör özelliklere sahip oldukları da gösterilmiştir (53-55). Adipoz dokudan üretilmiş MKH'lerin Kİ'nden türetilmiş MKH'lere benzer şekilde HKH transplantasyonundan sonra graft versus

host hastalığı (GVHH) tedavisi için kullanıldığı (56), plastik ve rekonstrüktif cerrahi alanlarında yüksek klinik uygulama alanları bulmaları beklenmektedir (57). Göbek kordonundan türetilmiş MKH'ler de GVHH [56] ve ciddi ve refrakter sistemik lupus eritematozus (58) tedavisi için umut vadeden hücreler olarak önerilmektedir.

Kemik iliği, MKH üretiminde kolay erişilebilir doku kaynağıdır. İnsan MKH'leri, etik onay ve bilgilendirilmiş onamdan sonra, posterior iliak krestten kemik iliği aspirasyonu yapılan sağlıklı kemik iliği nakli donörlerinden elde edilebilir (59-61). Kemik iliği genellikle koruyucu içermeyen heparin ile toplanır, Ki-mononükleer hücreleri (MNH), yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ile elde edilir ve adeziv karakterde olan MKH'lerin çoğaltılması için kültür edilir. Bildirilen koşulların çoğunda, MNH'ler $1-5 \times 10^6$ MNH / cm^2 konsantrasyonlarında ekilmektedir (62). Alfa-minimum essential medium (MEM) veya Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low glucose (DMEM-LG) gibi bazal kültür ortamı, seçilmiş FBS (tipik olarak % 10 ila % 20) ve / veya diğer hayvan serumları ile desteklenir (63). DMEM protein, lipit veya büyüme faktörü içermez. DMEM bir sodyum bikarbonat tampon sistemi (3.7 g/L) kullanır ve bu nedenle fizyolojik pH'yi korumak için kültürde % 5-10 CO₂ ortamı gerektirir. DMEM aderan hücreler için en ideal ortamı oluşturan besiyeridir ve orjinal eagle medyumuna göre bazı aminoasitler ve vitaminler için 4 kat zengindir. DMEM-LG 1 g/L glukoz içerir. DMEM-HG (high glukoz) ise 4,5 g/L glukoz içerir. Hücre kültüründe yüksek glukozun, MKH'lerin yaşlanmasına Akt/mTOR sinyal yolağı aracılığıyla neden olduğu gösterilmiştir (64). KİMKH'ini geliştirmek için %60 DMEM-LG, %40 MCDB-201 birleştirilerek kullanılır (65). MCDB medyumunu 1970 ve 1980'lerde Ham ve arkadaşları tarafından, hormonlar, büyüme faktörleri, eser elementler ve /veya düşük seviyelerde diyalize edilmiş FBS kullanılarak, spesifik hücre tiplerinin düşük proteinli ve serumsuz büyümesi için geliştirilmiştir. MCDB medyumunu nicel ve nitel olarak tanımlanmış ve spesifik bir hücre hattının büyümesini seçici olarak desteklemek üzere optimal olarak dengelenmiş olarak formüle edilmiştir. MCDB 201, insan keratinositlerinin büyümesi için düşük FBS ve kapsamlı eser elementler kullanılarak tasarlanmış, serum proteini içermeyen Ham'in besin karışımı F-12 medyumunun modifikasyonudur (66).

MKH üretiminde, hücre kültür ortamına eklenecek serum faktörleri çok önemlidir. En yüksek verim için seçilmiş FBS lotlarının kullanılması önerilmektedir. Hücreler 37 °C'de, %5 CO₂ ve nemlendirilmiş bir ortamda inkübe edilirler. Kültür kabına yapışma için 24 ila 48 saat bekledikten sonra, üst faz atılır ve çoğunluğu hematopoetik kökenli olan yapışmayan hücreler uzaklaştırılır. Hücreler, yaklaşık 14 gün boyunca çoğaltılır. Yaklaşık %70-80 konfluent bir yapı oluşturduklarında Tripsin / EDTA çözeltisi ile yapışan hücreler kaldırılarak hücre yoğunluğu azaltılmış bir şekilde yeniden ekim yapılarak pasajlanırlar. Böylelikle birkaç pasaj sonunda, başlangıçta MNH'ler arasında çok düşük yoğunlukta olan MKH'ler çoğaltılmış olur. Başlangıçta (0.pasaj) MKH'ler dışında adezyon özelliği gösteren diğer hücre tipleri (makrofajlar, endotel hücreleri gibi) de kültür kabına yapışır. Ancak o hücrelerin çoğaltılması için gerekli koşullar sağlanmadığından ilerleyen pasajlarda bu tip hücreler kaybolur ve ikinci kültür geçişinden sonra morfolojik olarak, homojen bir hücre popülasyonu oluşur. Ancak belirli bir yüzey belirteci ile ayrıştırılmadığı takdirde MKH'ler homojen görünüme sahip olsa da biyolojik özellikleri yönünden heterojendir. Mezenkimal kök hücrelerin CD45, CD34 ve CD14 gibi tipik hematopoetik hücre yüzey belirteçlerini içermediği, stromal belirteçlere sahip olduğu (CD73, CD90, CD44, CD105, CD29) akım sitometrik analiz ile doğrulanır. Farklı laboratuvarlarda FBS'a çeşitli büyüme faktörlerinin veya sitokinlerin eklenmesi, stromal progenitör (öncü) hücrelerin seçici bir şekilde zenginleşmesine yol açabilir (67, 68).

2.5.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu (İmmunfenotip analiz ve osteojenik, adipojenik yönde farklılaşma kapasitesinin gösterilmesi)

Multipotent mezenkimal kök hücreler (MKH) ilk kez Friedenstein ve arkadaşları tarafından, *in vitro* kültür koşulları altında koloni oluşturan birim-fibroblast (CFU-F) özelliği gösteren, plastiğe yapışan hücreler olarak tanımlanmıştır (69). Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (ISCT)'nin Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi, standart kültür koşulları altında plastiğe yapışan hücreleri "multipotent mezenkimal stromal hücreler" olarak isimlendirmiştir. ISCT tanımlamasına göre,

kültür koşullarında çoğaltılan MKH'lerin yüzey fenotipleri homojen olmamakla beraber genellikle CD73 (ecto-5'-nucleotidase, SH3, SH4), CD90 (Thy-1) ve CD105 (endoglin, SH2, TGFb-RIII) gibi hücre-yüzey belirteçleri bakımından pozitif; CD14, CD11b (ITGAM, Integrin alpha M), CD45 (lymphocyte common antigen), CD34, CD79 (Immunoglobulin- α/β) veya CD19 (B-Lymphocyte Surface Antigen B4) ve HLA-DR (Human Leukocyte Antigen – DR isotype) gibi hematopoetik yüzey belirteçleri bakımından negatiftir (70). Gerçek MKH'lerin tanımını yapabilmek için gerekli olan minimum kriterler; *in vitro* koşullar altında ekzojen faktörlerin ortama eklenmesiyle kemik, yağ ve kıkırdak dokularına farklılaşabilme ve plastiğe yapışabilme özelliği göstermesidir (71). Ancak, yeni yapılan birçok çalışma MKH'lerin daha fazla farklılaşma yeteneklerinin olduğunu, tenosit ve iskelet miyositleri gibi mezoderm kaynaklı hücelere; hepatosit, nöral ve epitelyal hücre gibi non-mezoderm kaynaklı hücelere farklılaşabildiğini açığa çıkarmıştır (47, 72-74).

CD105, CD73 ve CD90 ifadesi erken-pasaj (potent) ve geç-pasaj (yaşlanmış, pre-senesens) MKH'lerde de benzer düzeyde bulunabildiğinden, bunların kullanımı sadece temel MKH karakterizasyonu için sınırlanabilmektedir (47). Buna ek olarak, bu belirteçler hem deri fibroblastları hem de diğer plastik-aderan hücelerde de bulunduğundan non-spesifiklerdir. Bunun aksine, olası CFU-F içeren popülasyonu saf halde izole edebilen insan kemik iliği hücrelerinin küçük bir bölümüne bağlanabilen çeşitli monoklonal antikorlar tanımlanmıştır. Bunlar; Stro-1 (44), CD106 (VCAM-1) (75), CD271 (Low affinity Nerve Growth Factor Receptor, LNGFR) (76), SSEA4 (Stage-specific embryonic antigen-4) (77), CD146 (46), CD49a (Integrin alpha1) (78), GD2 (disialoganglioside 2) (79) ve CD140b (Platelet-derived growth factor receptor- β , PDGFR- β)'dir (80). Bu tip antikorlardan bazıları, MKH matüritesini (senesens) veya potenslik durumunu tek-hücre düzeyinde belirlemeye yardımcı olduğundan önem taşımaktadır. Ayrıca; homing, migrasyon ve adezyon yeteneklerinin değerlendirilmesinde rol oynamaktadırlar. Örneğin; uzun süreli kültüre edilen MKH'lerde Stro-1 ve CD106 ekspresyonu baskılanabilmekte olduğu ve bu durumun hücrelerin homing, migrasyon ve adezyon yetenekleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir

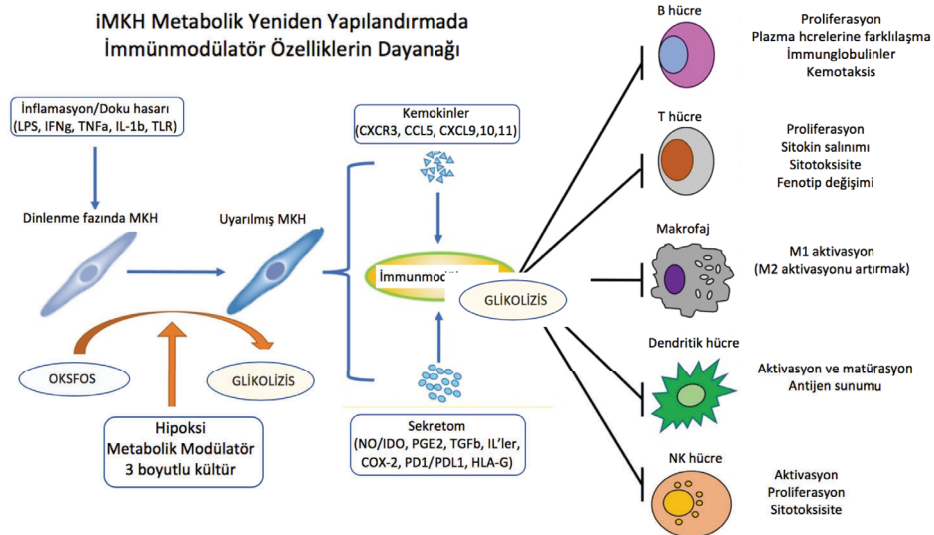
(44), (81). Benzer şekilde, erken-pasajda çoğaltılmış MKH'lere kıyasla geç evrelerde çoğaltılmış MKH'lerde; CCR1 (C-C chemokine receptor type 1), CCR7 (C-C chemokine receptor type 7), CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4, CD184), CXCR5 (C-X-C chemokine receptor type 5, CD185) ve CX3CL1 (C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1, Fractalkine) gibi belirli kemokin reseptörlerinin ifadeleri de baskılanabilmektedir (82).

2.5.3. MKH'lerin immünmodulatuvar özellikleri

MKH'ler, major histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I molekülünü düşük düzeyde eksprese ederken, MHC sınıf II moleküllerini eksprese etmemektedir. Bu bakımdan MKH'lerin zayıf immunojenik olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, MKH'ler T hücre aktivasyonunda rol oynayan; CD40, CD80 veya CD86 gibi ko-stimulatuvar molekülleri de eksprese etmemektedir (83). Mezenkimal kök hücrelerin güçlü immün baskılayıcı kapasiteleri vardır. Bunu T hücre proliferasyonunu ve sitokin üretimi yanısıra, B hücrelerin antikor üretimini ve antijen sunucu hücrelerin oluşumunu ve fonksiyonunu baskılaması ile yapar. Bu özellikler, bu hücrelerin klinik kullanımı için önemli avantaj oluşturmakta, HKH'lerin aksine, doku grubu uyumu gerektirmeden kullanılabilmelerine olanak sağlamaktadır.

MKH'lerin diğer önemli özellikleri sekresyon kapasitesinin yüksek olması ve immünmodulatuvar, anti-inflamatuvar, anti-apoptotik, anjiojenik ve trofik özelliğe sahip birçok solubl faktör, sitokin, kemokin, büyüme faktörü, metabolit salgılayabilmeleri, ayrıca ekstraselüler veziküller, ekzozomlar yoluyla mikroRNA ve mRNA transferi yaparak hasarlı hücre/dokuların onarımına katkı sağlamalarıdır (84). MKH'lerin salgıladıkları solubl faktörler immün baskılayıcı etkilerinin ortaya çıkmasında rolü olan başlıca etkindir. Bunlara örnek olarak TGF- β , hepatosit büyüme faktörü (HGF), nitrik oksit, HLA-G ve indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) verilebilir (85). MKH'lerin immün baskılayıcı kapasitesinin inflamatuvar koşullar altında arttığı da bilinmektedir (86). MKH'ler anti-inflamatuvar faktörlere ek olarak IL6, IL8, CCL2, TIMP-2, ICAM-1, CXCL10 ve CCL8 gibi proinflamatuvar sitokin ve kemokinleri de üretip

salgılayabilirler. Çevresel faktörler MKH'lerin hangi immünmodülör yolağı yöneleceğinde belirleyicidir (85). Örneğın MKH'lerin salgıladığı PGE2 ve PGE2 mimetik takviyeleri, IL-10⁺ IFN-γ⁺ CD4⁺ T regülatör hücrelerin immün-baskılayıcı potansiyelini artırabilmektedir (87). Proinflatuar sitokin interferon-γ (IFN-γ)'nın, tek başına veya tümör nekroz faktörü-α (TNF-α), IL-1α veya IL-1β ile kombinasyon halinde, immünosupresif aktiviteye aracılık eden çeşitli enzimler ve siklooksijenaz 2 (COX-2), PGE2 veIDO gibi çözünebilir faktörleri salgılaması için MKH'leri indüklediğini gösterilmiştir (88). Periferik kan MNH'leri ile birlikte MKH'lerin ortak kültüründen sonra artan PGE2'nin T-hücre proliferasyonunu inhibe ettiğı gösterilmiştir (89). İDO, triptofanın kinurenine dönüşümünü katalize ederek, immün hücrelerin büyümesini ve fonksiyonunu inhibe edebilir. MKH'ler tarafından İDO salgılanmasının allojenik T-hücre yanıtlarını inhibe ettiğı ve böbrek allogreft toleransını indüklediğı (90), İDO eksprese eden dendritik hücrelerin, MKH'lerin T-hücre proliferasyonu üzerindeki inhibe edici etkisine aracılık ettiğı gösterilmiştir (91). Nitrikoksit (NO), T hücre proliferasyonunu inhibe ettiğı bilinen başka bir faktördür. MKH'lerin ürettiğı NO'in, MKH'ler tarafından T hücre baskılamasının başlıca araçlarından biri olduğı gösterilmiştir (92).



Şekil 2.3. MKH immünomodülasyonu. Yuan, X 2019 (93) makaleden uyarlanmıştır.

MKH immünomodülasyonu, enflamatuar ortam tarafından polarizasyon gerektirir ve kemokinler ve sitokinler, hücre dışı veziküller ve eksozom gibi immünomodülatör faktörlerin salgılanması ve doğrudan hücre-hücre temasıyla elde edilir (93). IFN- γ 'nın tek başına varlığında veya TNF- α ve IL-1 gibi inflammatuar sitokinler ile kombinasyonları halinde MKH'ler kemotaksis yoluyla bağışıklık hücrelerini çeken CXC-kemokin reseptörü 3 (CXCR3), CC-kemokin reseptörü 5 (CCR5) ligandları, CXC-kemokin ligand 9 (CXCL9), CXCL10 ve CXCL11 gibi kemokinler salgırlar (88, 94).

MKH sekretomunun önemli bir alt kümesi, çapı 50 ila 100 nm arasında değişen, multi veziküler cisimlerden (multi- vesicular bodies) veya plazma membranından köken alan ve hücre içi iletişim için proteinler, lipidler ve nükleik asitlerle zenginleştirilmiş olan küçük membran vezikülleri; hücre dışı araçlar (extracellular vehicles) ve eksozomlardır (95, 96). MKH kökenli hücre dışı araçlar ve eksozomlar, akut böbrek hasarı, deneysel otoimmün ensefalomyelit, tip-1 diabetes mellitus ve miyokard iskemik hasarı gibi çeşitli hastalık modellerinde microRNA (miRNA) düzenlemesiyle test edilmiştir (97-101). Mekanik olarak, MKH kökenli hücre dışı araçlar ve eksozomlar, CXC ligandlarını inhibe eden ve makrofajın kemotaksisini baskılayan miR-15a, miR-15b, miR-16 gibi miRNA ile zenginleştirilebilir (101). Bu araştırmalar, metabolizmanın, endosomal sekresyon yollarının düzenlenmesi yoluyla hücre dışı araçların biyogenezini ve kargo kompozisyonunu düzenlediğini göstermiştir. Başka bir çalışmada MKH kökenli eksozomların metabolomik analizinde tespit edilen birçok metabolit ile ilişkili enzimatik ve sinyal yollarına karşılık gelen sayısız protein ile paklendiği, lipidomik analiz ile de, seramid, lisofosfatidilkolinler ve fosfatidiletanolamin fosfolipitlerin yüksek oranlarda bulunduğu gösterilmiştir. Koşullandırılmış MKH kökenli eksozomların adenosin, arginin, aspartik asit, kolesterol, glutamin, nikotinamid, UDP-N-asetilglukosamin, 50-deoksi-50-metiltioadenosin, palmitik asit ve izolösin gibi immünoregölasyon ile doğrudan ilişkili olan 21 ayrı metabolit içerdiği bildirilmiştir, ve bu metabolitlerin de, antiinflammatuar

yanıtların modülasyonu, M2 makrofaj polarizasyonu ve düzenleyici T lenfositlerin indüksiyonu ile doğrudan ilişkili olduğu ifade edilmiştir (102).

MKH'ler intrinsik immünoşüpresif ve anti-inflamatuvar etkilerine bağlı olarak, immün sistem düzenleyicileri olarak rol oynamaktadırlar (103). MKH'ler hem adaptif (sonradan kazanılan) hem de doğal bağışıklık sistem üzerine T hücrelerini ve dendritik hücre matürasyonunu baskılayarak, B hücre aktivasyonunu ve çoğalmasını azaltarak, NK hücrelerinin çoğalmasını ve sitotoksik aktivitesini inhibe ederek, IL-10 aracılı mekanizma ile Treg (düzenleyici T hücreleri) hücrelerin oluşumunu ve gelişimini uyararak etki etmektedirler (104). Bağışıklık hücrelerinin inhibisyonu çeşitli faktörlerin kombinasyonuna dayanır; örneğin MKH'lerin T lenfositlerin proliferasyonu üzerindeki inhibe edici etkisi, bir interferon- γ reseptör (IFN- γ R) monoklonal antikoru (mAb) ilave edilerek tamamen kaldırılmıştır. T lenfositleri veya NK hücreleri tarafından üretilen Interferon gamma (IFN- γ), MKH'lerin immün modülatör aktivitesini teşvik ederken, diğer yandan T veya NK hücre çoğalmasını baskılamaktadır. Eksojen IFN- γ varlığında, B lenfositler de MKH'lerin inhibitör etkisine duyarlı hale gelir. Bu bulgular IFN- γ üreten tip 1 T (Th1) yardımcı hücrelerin aracılık ettiği bir bozukluk olan GVHH tedavisinde MKH uygulamasının yararlı olabileceğini düşündürmüştür (86). Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma ve doku rejenerasyonu özellikleri yanısıra hasar alanına migrasyon gösterdikleri, gittikleri bölgede farklılaşarak doku onarımına direkt ve/veya parakrin mekanizmalarla indirekt katkıları olmaktadır. Böylelikle, MKH'ler doku hasarı ve inflamasyon bölgelerine giderek immün düzenleyici sitokinler ve büyüme faktörleri salgılayabilen hücreler olarak rejeneratif tıp, doku mühendisliği uygulamalarında ve inflamatuvar hastalıklarda kullanılmak için en uygun hücre tipi olarak ortaya çıkmaktadır. Klinik çalışmalar, MKH'lerin allojenik alıcılarda az immün reaktivite gösterdiğini veya hiç göstermediğini ortaya koymaktadır (105).

2.5.4. Mezenkimal kök hücrelerin klinikte kullanımı

Mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanımına giderek artan büyük bir ilgi vardır. Klinik çalışmaların kaydedildiği clinicaltrials.gov sitesine kayıtlı >700 çalışma yürütüldüğü görülmektedir (106, 107). Bu hücrelerin klinikte kullanıldığı alanlar arasında akut GVHH, ortopedik rahatsızlıklar (osteoartrit), akut respiratuvar distress sendromu, yenidoğan hastalıkları, HKH naklinde rejeksiyon/graft yetmezliğinin önlenmesi/tedavisi, HKH nakli komplikasyonlarının yönetimi, organ nakli (böbrek), yenidoğan rahatsızlıkları, intraventriküler kanama, respiratuvar distress, bronkopulmoner displazi, sistemik lupus eritematozis ve diğer otoimmün/inflamatuvar hastalıklar, Crohn hastalığı, karaciğer, böbrek hastalıkları, tip 1 diabet, diyabetik ayak yaraları, kardiyovasküler hastalıklar, konjestif kalp yetmezliği, kardiyomyopati, kronik iskemik kalp, myokard enfartı, iskemik bacak, kritik kemik kırıkları, dejeneratif disk rahatsızlıkları, spinal kord yaralanmaları, amyotrofik lateral skleroz, serebral iskemi, diğer nörolojik bozukluklar yer almaktadır (87, 108-116). Uygulamaların önemli bir kısmında ciddi yan etki gözlenmemiş olması bu hücrelerin klinikte kullanımının yaygınlaşmasını kolaylaştıran sebeplerin başında gelmektedir. Hücrelerin *in vitro* ortamda uzun süre işlenmiş olmasına rağmen, muhtemelen vücutta uzun süre kalmamaları nedeniyle onkojenik transformasyon riski çok düşük bulunmakta, ayrıca hücre infüzyonu sonucu emboli, allerji gibi akut yan etkilere, çok nadir uygulamalar dışında rastlanmamaktadır. Genel olarak MKH uygulamalarının güvenli olduğu konusunda görüş birliği olsa da bu hücre uygulamalarının etkinliği konusunda, *in-vivo* deneysel uygulamaların aksine çoğu zaman hedeflenen cevap elde edilememektedir. Hayvan deneylerinde, MKH'lerin doku onarımına katkıları inflamatuvar hastalıklarda ve birçok hasar modelinde gösterilmiştir (117). Serebral iskemi (118), spinal kord hasarı (119), myokard enfarktı (120), travma/iskemi (121), kas-iskelet sistemi tendon hastalıkları (122), deneysel otoimmün ensefalomyelitler (123-126) bu çalışmalara gösterilebilecek örneklerdir.

İnsanlarda MKH uygulamalarının en etkin olduğu ve en sık kullanıldığı alanların başında özellikle çocuklardaki akut GVHH gelmektedir. İmmünojenitelerinin düşük

olması nedeniyle doku grubu uyumu olmayan üçüncü şahıslar da MKH vericisi olabilmekte, hatta farklı vericilerden elde edilen havuzlanmış ve ticari hale getirilmiş MKH'ler de kullanılabilir (127). Diğer taraftan stromal hücrelerin öncülük olmaları nedeniyle MKH'lerin HKH ve organ nakillerinde başarılı greft sağlanması konusunda da yararlı olacağı konusunda umut vadeden çalışmalar vardır. Ancak cevap değerlendirme kriterleri standart olmadığından ve cevapsız vakaların fazla yayınlanmaması nedeniyle akut GVHH da dahil olmak üzere rapor edilen çalışmaların etkinliği konusunda kesin bir görüşe varmak zordur. Hasarlı doku/organ onarımında *in vitro* ve *in-vivo* deneysel çalışmalarda gösterilmiş olsa da klinik uygulamalarda yeterli etkinlik elde edilememesinin nedenlerinin araştırılması ve etkinliğin artırılması konusunda çok fazla çalışma gerekmektedir. Genellikle hücrelerin tek başına kullanımı yerine kombine yaklaşımlar ile daha başarılı sonuçlar elde edileceği ileri sürülmektedir. Bu konuda, doku mühendisliği uygulamaları ile üç boyutlu ortamların oluşturulması, farklı hücre tiplerinin birlikte kullanılması, tekrarlayan uygulamalar yapılması, hücre dozlarının optimize edilmesi, sistemik ve bölgesel olmak üzere farklı uygulama bölgeleri kullanılması, hücrelerin hedeflenen dokuya ulaşma ve kalma sürelerinin optimizasyonu için kombine yaklaşımlar uygulanması, hücrelerin *in vitro* hazırlık aşamasında hastadaki patolojinin düşünülerek hastaya özel olacak şekilde mikroçevre ortamı hazırlanması (primed/uyarılmış MKH) gibi çok farklı yaklaşımların kullanılması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında, MKH üretimi esnasında kullanılan serum faktörlerinin hücrelerin ve ortamın metabolik özelliklerine olan etkisinin detaylı araştırılması planlanmıştır.

2.5.5. MKH'lerin klinik kullanım amaçlı üretimi

Klinik uygulamalar için MKH üretilirken, mevzuata uygunluğun yanı sıra, kaynak biyomateryal, kullanılan kimyasal ve malzemeler, hücre kültürü koşulları ve besiyeri kaynağı / kalitesi ile ilgili sorunlar ele alınmalıdır. Mezenkimal kök hücrelerin klinik uygulama amaçlı kullanımı için güncel iyi üretim koşullarında (current good manufacturing practice / cGMP) üretilmiş olmaları gerekmektedir. Çeşitli çalışma grupları, klinik kullanım için uygun hücrelerin kalitesini ve üretim sürecinin genel

verimliliğini artırmak amacıyla, farklı üretim süreçleri geliştirmiştir. Hücre kaynağı ve üretim sürecindeki değişikliklerin, MKH ürününün etkinliği üzerinde önemli bir rolü vardır. Kapsamlı kalite kontrol testlerinin uygulanması ile birlikte, iyi kontrol edilen üretim süreçlerinin geliştirilmesi, önemlidir. MKH klinik uygulamalarında başlangıç hücre kaynağı genellikle Kİ, adipoz doku, göbek kordonu ve kanıdır. Verici uygunluğunun değerlendirmesi uzman bir doktor tarafından yapılır, verici anket, tıbbi muayene, standart testler ve bulaşıcı hastalıklar için yapılan testlerle birlikte değerlendirilir (128).

Klinik çalışmalardan elde edilen sonuçların karşılaştırılmasındaki tekrarlama başarısı değişken olarak sonuçlanmıştır. Buradaki ana faktör, hastadaki klinik tablonun özellikleri ve hücre kalitesindeki potansiyel değişikliklerdir. Hücre tedavilerinin karmaşık yapısı nedeniyle üretim sürecinin, *in vivo* etkinliğe etkisinin olacağının bilinmesi önemlidir. Klinik uygulamalar için MKH üretiminde başlangıç hücre kaynağı seçimi, kültür ortamı ve kültür uygulamaları önemli etkidir. Bu değişkenlerin MKH ürününün güvenliği ve potansiyeli üzerindeki etkisini değerlendirmek için kullanılabilecek kalite kontrol test yöntemlerini oluşturmak çok önemlidir.

ABD'de hücresel tedaviler, Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration, FDA)'nin Biyolojik Değerlendirme ve Araştırma Merkezi (Center for Biologics Evaluation and Research, CBER) tarafından düzenlenmektedir. FDA, üretim ve test alanlarını kapsayan rehber dokümanlar ve düzenlemeler sağlamaktadır (129). FDA'nin rehberliğine ek olarak, Amerikan Kan Bankaları Birliği (American Association of Blood Banks, AABB) ve Hücresel Tedavi Akreditasyonu Vakfı (the Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy, FACT) da standartlar oluşturmuştur (130, 131). Avrupa'da ise hücresel tedaviler ile ilgili düzenlemeler European Medicines Agency (EMA) tarafından yapılmış ve ilgili aktiviteler bu kuruluş tarafından kontrol edilmektedir(132).

Phinney ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ABD’nde GMP koşulları altında MKH üretimi yapan akademik merkezlerden bir anket aracılığıyla bilgi toplanmıştır. Sterilite testi ve hücre yüzeyi fenotip analizi ile ürün tanımlaması yaygın olarak bildirilen uygulamalar iken, başlangıç ve çalışma hücre ekim yoğunlukları, kültür süresi, ürün formülasyonu ve MKH ürününün kullanım amacı merkezler arasında oldukça değişken olarak bulunmuştur (133). Bu nedenle MKH *in vitro* çoğaltılması ve kullanım için hazırlanması sürecinde etkisi olabilecek tüm faktörlerin gözden geçirilmesi gereklidir.

Tipik bir MKH üretim süreci aşağıdaki adımlardan oluşmaktadır:

- MNH fraksiyonunun Ki’nden veya diğer kaynak dokudan izolasyonu
- MKH üretimi, çoğaltılması
- MKH dondurarak saklanması
- Kriyoprezervasyondan önce veya sonra son formülasyon, kalite kontrol testleri

Mezenkimal kök hücreleri dondurarak saklamak için prosedürler, hücrelerin taşınması ve nakil için hazırlanması için koşullar değerlendirilmiştir (134, 135). İyi tanımlanmış ve yeniden üretilebilir üretim prosedürlerinin geliştirilmesine ek olarak, üretilen MKH’leri karakterize etmek ve değerlendirmek için kalite kontrol test yöntemleri oluşturulmuştur.

Kalite Kontrol (QC) Testleri

Kalite kontrol testleri, klinik üretim programının kritik bir bileşenidir. Kalite kontrol testleri üretimden önce (donör materyali, ham madde), hücre kaynağı, işlem içi numuneler ve son ürün serbest bırakma testleri dahil olmak üzere üretim işleminin birçok basamağında uygulanır.

Tablo 2.1 Klinik kullanım için hazırlanan MKH için kalite kontrol testleri

Uygulanacak test	Yöntem	Hedeflenen ürün özellikleri
Canlı hücre sayısı	*Tripan Mavisi veya *7-amino-aktinomisin D (7-AAD) ile sayım	> %70
Mikrobiyal ve mantar bulaşı	Bakteri ve funguslar için sterilite testi	Kontaminasyon olmamalı
Mikoplazma	FDA belgeli, <i>in vitro</i> hücre kültürü ile tutarlı yöntem	Kontaminasyon olmamalı
Endotoksin	Kinetik türbidometrik yöntem (Limulus amebocyte lysate, LAL testi)	<5 EU / kg / doz
MKH Antijen Ekspresyonu	MKH markırları için akım sitometri: *Pozitif: CD105, CD73, CD90 **Negatif: CD34, CD45, CD14, CD19, HLA-DR	*> %95 ekspresyon **< %2 ekspresyon
Karyotip	G-bandı, 20 metafaz yayılımı	Klonal anomali olmamalı
Rezidü FBS	ELISA (artık sığır proteinleri için; örneğin, BSA, transferrin)	6-log seviye azalmalı
Sığır patojenleri	Sığır patojenleri için test	Kontaminasyon olmamalı
Domuz patojenleri	Domuz patojenleri için test	Kontaminasyon olmamalı
İnsan patojenleri	PCR insan patojenleri için PCR veya diğer uygun analizler: HIV-1 ve HIV-2, HTLV-1 ve HTLV-2, HBV, HCV, CMV, EBV	Kontaminasyon olmamalı
Etkinlik testleri	Amaçlanan klinik endikasyona dayalı test	Spesifiye edilmeli

Klinik kullanım için hazırlanan MKH için kalite kontrol testleri (136). Hematti P, 2013. Mesenchymal Stromal Cells Biology and Clinical Applications adlı kitaptan uyarlanmıştır.

Serbest Bırakma Testleri:

Her son MKH ürünü, klinik kullanım için sunulmadan önce, önceden belirlenmiş spesifikasyonları karşıladığını göstermek için testlerden geçirecektir. Kalite güvencesi, son ürünün piyasaya sürülmesinden önce kalite kontrol testleri de dahil olmak üzere tüm üretim kayıtlarının incelenmesini içermelidir. Üretilen MKH'lere uygulanması gereken kalite kontrol testleri yukarıdaki Tablo 2.1'de verilmiştir.

Etkinlik Testleri:

FDA, biyolojik ürünlerin, biyolojik lisans başvuru onayında güvenlik, saflık ve etki gereksinimlerini karşılamasını gerektirir. Etkinlik, FDA tarafından "ürünün

kendine özgü yeteneği veya kapasitesinin uygun laboratuvar testleri ile belirtilmesi veya ürünün uygulanması yoluyla belirli bir sonucu etkileyecek kontrollü klinik verilerin elde edilmesi'' olarak tanımlanır. Tablo 2.2'de MKH'ler için etkinlik testleri örnekleri verilmiştir.

Tablo 2.2 MKH'ler için etkinlik testlerinden örnekler

MKH uygulaması	Etkinlik Testi	Referans
GVHH tedavisi	Mikst lenfosit reaksiyonu testleri, sitokine dayalı analizler	(137)
Akut akciğer hasarı	Ex vivo akciğer modeli ve sitokine dayalı testler	(138)
Crohn hastalığı	Mikst lenfosit reaksiyonu testleri	(139)
Bağ dokusu onarımı	Çok yönlü (üçlü) farklılaşma potansiyelinin gösterilmesi PCR analizleri	(140)
KİT sonrası engrafman	CFU (koloni oluşturan fibroblastlar) / Uzun süreli kültür-Long term culture initiating cells (LTCIC) bazlı deneyler	(141)
Kardiyak rejenerasyon	Kardiyak öncül hücre proliferasyonunun <i>in vitro</i> desteği	(142)

MKH'ler için etkinlik testlerinden örnekler (136). Hematti P, 2013. Mesenchymal Stromal Cells Biology and Clinical Applications, Humana Press adlı kitaptan uyarlanmıştır.

2.6. MKH Üretimine Etkili Faktörler

2.6.1. Biyolojik materyal, hammadde özellikleri:

Klinik kullanım amaçlı MKH üretiminde GMP üretim işlemlerinde kullanılan tüm hammaddeler, GMP veya kalite standartlarına uygunluk açısından denetlenmiş satıcılardan alınmalıdır. Her hammadde için kalite kontrol test ve dokümantasyonu muhafaza edilmeli ve her bir üretim lotu için son MKH ürününün tüm hammaddelerine kadar izlenebilirlik sağlanmalıdır. Hammadde kullanımıyla ortaya çıkabilecek potansiyel riskler belirlenmelidir. Üretimde kullanılacak tüm faktörler, biyolojik materyal, kimyasallar, besiyeri, serum eklentileri, kaynak hücrelere ait tüm özellikler, ilgili kalite kontrol testleri ve risk oluşturabilecek faktörler değerlendirilmeli, dokümantasyonlar yapılmalı ve tüm süreç için standart uygulama yöntemleri oluşturulmalıdır (Tablo 2.3).

Tablo 2.3 MKH üretiminde yaygın olarak kullanılan biyolojik materyal ve faktörler

Materyal	Kullanım alanı	Kalite kontrol için gerekenler	Risk azaltma
Kemik iliği	Başlangıç materyali	*Bilgilendirilmiş onam *Tıbbi özgeçmiş *Verici testleri	
Fetal buzağı serumu (FBS)	Besiyeri komponenti (serum eklentisi)	*Sığır patojen testi *Kaynak ülke sertifikası *Düşük riskli ülkeden gelen sığır kaynağı	*Işınlama veya viral filtrasyon *Serumsuz ortama geçilmesi
Büyüme faktörleri (Fibroblast growth factor-2 (FGF-2), Transforming growth factor beta (TGF-β), PDGF vb)	Besiyeri komponenti	Memeli hücre hatları ve hayvansal kaynaklı materyallerden kaynaklanan riski değerlendirmek için rekombinant proteinlerin kullanımı	Mikrobiyal ekspresyon sistemlerinde veya iyi karakterize edilmiş memeli hücre hatlarında üretilen büyüme faktörleri kullanımı
Domuz tripsini	Hücrelerin kültür kabından kaldırılması/pasajlama	Domuz patojenleri için test	Rekombinant enzim kullanılması
İnsan serum albümini	Son formülasyon	Testleri yapılmış vericilerden toplanan insan serumundan türetilmiş olması nedeniyle yönetmeliğe uygundur	Rekombinant insan serum albumini
Son içerik	Ürün depolama	*Sterilite *Endotoksin uzaklaştırma	

MKH üretiminde yaygın olarak kullanılan biyolojik materyal ve faktörler (136). Hematti P, 2013. Mesenchymal Stromal Cells Biology and Clinical Applications, Humana Press adlı kitaptan uyarlanmıştır.

2.6.2. *In vitro* Hücre Kültürü Koşulları:

Araştırma veya klinik kullanım için yeterli hücre sayısına ulaşmak için MKH'ler kültür koşullarında çoğaltılmaktadır. Kemik iliğinde klonojenik (CFU-F - koloni oluşturan birim-fibroblast) MKH'lerin sıklığının, 10^4 - 10^5 kemik iliği hücresi başına 1 gibi oldukça düşük olduğu tahmin edilmekte iken, rejeneratif tıp ve doku mühendisliği için yeterli hücre elde etmek için gerekli olan MKH sayısı $\sim 10^7$ - 10^8 kadardır (1). Klinik uygulamalarda genellikle kilogram başına yaklaşık 10^6 MKH kullanılmaktadır. Çok sayıda klonojenik MKH üretebilmek için; başlangıçta sınırlı sayıda olan MKH'lerin *in vitro* koşullarda çoğaltılmaları gerekmektedir.

Mezenkimal kök hücreler standart doku kültürü T-flask şişelerinde yapışan hücreler olarak büyütülürler. Klinik amaçlı uygulamalar için besiyeri tek kullanımlık kaplarda hazırlanır ve tüm besleme ve hücre toplama aşamaları tek kullanımlık, kapalı bir sisteme izin verecek torbalar ve boru setleri aracılığıyla yapılır. Bu format, kontaminasyon riskini azaltarak, çok kullanımlı biyoreaktörler için gerekli olduğu gibi temizleme validasyonu yapma ihtiyacını ortadan kaldırır. Donör özellikleri, MNH izolasyon yöntemi, besi yeri seçimi, ekim yoğunluğu son MKH ürününün özelliklerini etkiler. Düşük ekim yoğunluklarının, MKH'lerin erken progenitörleri temsil eden bir alt popülasyonunun büyümesini arttırdığı gösterilmiştir (143). Hücre kültürü değişkenleri arasında hücre izolasyon yöntemlerinin (plastığe yapışan veya prospektif/seçici izolasyonun farklı metotları) yanısıra; besiyeri formülleri (temel besiyeri/medyum ve eklentiler), kültür ekstrasellüler matriks desteği, hücre ekim yoğunluğu ve fiziksel çevre (çözünmüş oksijen ve karbondiyoksit konsantrasyonları, sıcaklık, pH, osmolalite ve tampon sistemleri) de yer almaktadır. Bunlara ek olarak, MKH kaynaklarının farklılığına ve hayvan/insan serum ürünlerinin veya serumsuz besiyeri eklentilerinin kullanımına bağlı olarak, *ex vivo* MKH ekspansiyonu net bir şekilde değişiklik göstermektedir.

2.6.3. Besiyeri ve serum / plazma eklentileri

Halen, herhangi bir kaynaktan MKH'lerin izolasyonu ve kültürlenmesi için standart bir yöntem ve araştırmacılar arasında fikir birliği yoktur. Ancak, farklı akademik merkezlerde üretilen MKH'lerin kullanımına dayanan klinik araştırmaların tümü, bu hücrelerin infüzyonunun güvenli ve potansiyel olarak etkili olduğunu göstermiştir. Mezenkimal kök hücre üretimi için en yaygın kullanılan ortam, FBS/Alfa-minimum essential medium (MEM) veya Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low glucose (DMEM-LG) gibi görünmektedir.

FBS genellikle glutaminle takviye edilmiş alfa-MEM ortamına eklenir. FBS üretiminde görülen partiden partiye değişkenlik, MKH kalitesi ve potansiyeli üzerine etkilidir. Klinik uygulamalar için olan MKH kültürü için en uygun koşulları belirlemek

amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır (144). Bu çalışmalarda yeni besiyeri formülasyonlarında genellikle FBS gibi hayvan kaynaklı faktörlerin yerine geçecek alternatif kaynaklar üzerinde durulmaktadır (145, 146). FBS'un hücresele tedavilerin üretiminde kullanılması, zoonotik ajanların, sığır süngerimsi ensefalopatinin (BSE) bulaşması riskini ve hücreye dahil edilebilecek hayvansal kökenli antijenlerin girişini içeren çeşitli potansiyel kaygılar doğurur (147). Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı (Office International des Epizooties, OIE) tarafından BSE riski ihmal edilebilir veya coğrafi olarak düşük riskli olarak sınıflandırılan ülkelerden FBS kaynağının seçilmesiyle, BSE bulaşmasına ilişkin risk azaltılabilir (148). Sığır patojen transmisyonu potansiyel riski, sığır patojenleri için taramadan geçen ve ayrıca gama ışınlama gibi viral bir inaktivasyon aşaması geçirmiş olan FBS kullanılarak hafifletilebilir.

Klinikte kullanılacak hücrelerin, *in vitro* çoğaltılma protokollerinde, büyüme faktörü kaynağı olarak %10-30'a kadar oranlarda seçilen, spesifik bir lot numarasına sahip olan fetal buzağı serumları kullanılabilir. FBS, bağlanma ve büyüme faktörleri yönünden yüksek bir içeriğe sahip olması yanısıra, hücre büyümesi ve devamlılığı için gerekli olan besin ve fizyokimyasal bileşikleri de içerir (2). Ancak FBS virüsler, prionlara bağlı hastalıklar ve zoonotik kontaminasyonlar gibi istenmeyen ksenojenik patojenlerin kaynağı olduğu gibi, immün-aracılı reaksiyonlara zıt yönde hızla etki edecek ve hatta anafilaktik şoka sebep olabilecek antijenleri ve immünoglobulinleri de içerebilmektedir (149). FBS, kimyasal olarak tam tanımlanmamış bir kültür eklentisidir. Ayrıca farklı kaynaklardan elde edilen FBS'ları arasında nitelik ve nicelik açısından farklılıklar bulunmaktadır. Bu da doku kültürü koşullarını ve deney sonuçlarını etkilemektedir. Dolayısıyla pahalı ve zahmetli bir süreç olan serum-grup testinin yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bakımdan FBS'a alternatif olarak hayvan ürünü içermeyen replasmanlar da kullanılabilir. Bu olası ürünler arasında; insan kaynaklı eklentiler, otolog serum, allojenik serum, platelet lizat, yıkanmış platelet lizat, göbek kordonu serumu ve plazması yer almaktadır. Ayrıca serum içermeyen, serum replasman faktörleri (örn: kimyasal olarak belirlenmiş ekspansiyon besiyeri) içeren besiyeri ortamları da geliştirilmiştir.

Araştırmalar, bu eklentilerle çoğu zaman FBS ile elde edilen verime ulaşılmasında güçlük olduğunu ortaya koymakta, FBS alternatifleri ile optimal verim elde edilmesine yönelik kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Serumsuz besiyeri

MKH büyümesini desteklemek amacıyla tamamen serum-free (serum içermeyen) besiyerleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu zamana kadar yapılan çoğu çalışmada ancak sınırlı sayıda başarı elde edilmiştir (65). Hücrelere destek verecek olan en uygun besiyerinin kimyasal içeriğinin belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca bu besiyeri, MKH kültürlerinin tutunmasını ve büyümesini destekleyici nitelikte olmalıdır. Bu konuda birçok firma tarafından serum içermeyen ve MKH oğaltılması için gerekli büyüme faktörlerini içeren çok sayıda besiyeri geliştirilmiştir (3, 145, 150). Yakın geçmişte, insan MKH izolasyonu ve ekspansiyonunda kullanılmak üzere, bir serum-free besiyeri olan "PPRF-msc6" besiyeri tanımlanmıştır. İnsülin, transferrin ve serum albumin gibi supplementler az miktarda da olsa serum komponentlerini içerebilmektedir. (2). Chase ve arkadaşları FGF-2, TGF-β ve PDGF ile desteklenen serum içermeyen bir besiyerinin, FBS / aMEM'e göre MKH büyümesini daha da iyi desteklediğini açıklamıştır (151). Hayvansal kaynaklı bileşenler içeren bu ilk besiyeri sürümünün yeni bir xeno-free versiyonu piyasada bulunmaktadır (152). Serumsuz ortam kullanımının MKH'lerin *in vivo* etkinliği üzerinde önemli bir etkisinin olup olmayacağını göstermek için ilave *in vitro* etkinlik çalışmaları ve hayvan çalışmaları yapılması gereklidir. Ek olarak, bu ortamlar açıklanmayan bileşenleri içeren özel formlasyonlardır. Büyüme faktörleri veya diğer hayvan kaynaklı bileşenler gibi içeriklerden kaynaklanan potansiyel riskler belirlenmelidir. Örneğin, bazı büyüme faktörleri, kemirgen hücre hatları gibi memeli hücre hatları kullanılarak üretilir. Bu da retrovirüs kontaminasyon riskini doğurur (153). Bu Şekilde üretilen büyüme faktörleri, test edilmiş hücre hatları kullanılarak ve viral saflaştırma işlemleri uygulanarak oluşturulmalıdır. Serum içermeyen besiyeri ortamları kullanılarak klinik kullanıma uygun MKH retimi konusunda çok fazla araştırma gerekmektedir. Ticari

hazırlanmış besiyerlerinin sınırlı etkileri ve içeriklerinin tam olarak bilinmemesi önemli dezavantajlardır.

İnsan kaynaklı serum / plazma ürünleri

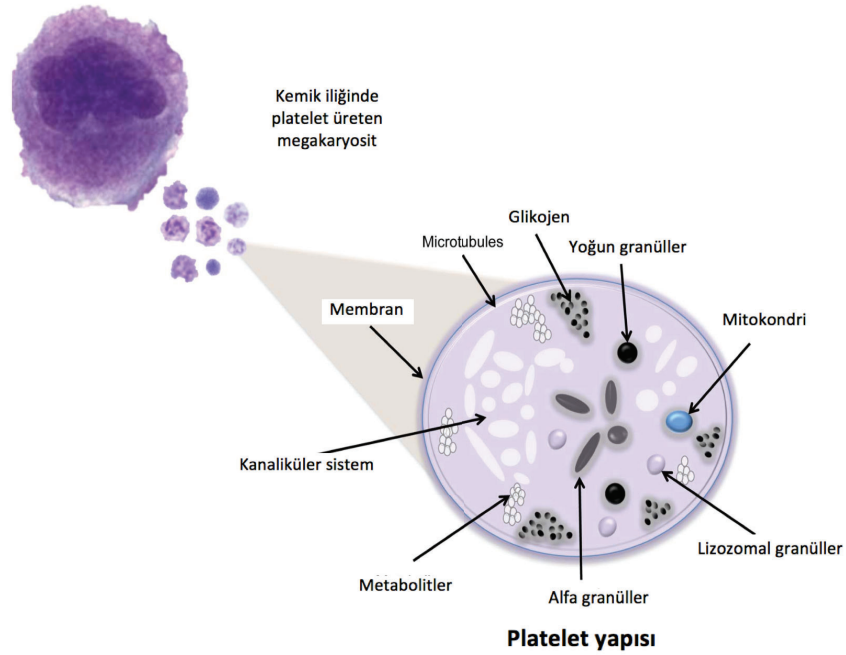
Klinik uygulamalarda kullanılacak olan insan MKH kültürlerinden FBS'yi elimine etmek ve yerine otolog veya heterolog serum veya plazma kullanmak için çeşitli girişimler yapılmıştır. Plazma antikoagülan madde eklenerek pıhtılaşması engellenen kanın hücresel kısımlarının çöktürülmesinden sonra üstte kalan sıvı kısmıdır. Serum ise kana herhangi bir antikoagülan madde ilave etmeksizin hücresel kısmı pıhtılaştıktan ve çöktürüldükten sonra oluşan sıvı kısmıdır. Serumun plazmadan farkı, serum içerisinde fibrinojenin bulunmamasıdır. Otolog serum içeren besiyerinde üretilen MKH'ler FBS'a kıyasla daha hızlı çoğalır ve özellikle erken pasajlardaki bu hücreler, *in vitro* tipik fenotipini, motilitesini ve farklılaşma yeteneğini korumaktadırlar (154). Ancak, kültür için gerekli olan otolog serum miktarı genellikle donörün verebileceği serum miktarından daha fazla olmaktadır. Ayrıca sağlıklı donör otolog serumu MKH çoğalmasını sağlasa da, yaşlı hastaların, onkolojik, genetik veya metabolik hastalığa sahip kişilerin otolog serumu aynı etkiyi göstermemektedir. Otolog serum yerine havuz oluşturulmuş allojenik insan serumu kullanıldığında çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin; bazı çalışmalar insan MKH'lerinde büyümenin durduğunu ve hücrelerin ölüme gittiğini gösterirken (155), bazı çalışmalar sonucunda FBS ilave edilen kültür koşullarına benzer veya daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (156).

Bu yüzden, allojenik veya otolog insan serumu kullanılması FBS'nun yerini alabilecek bir eklenti olarak kabul edilmemektedir. Gerekli büyüme faktörleri ilave edilmiş tamamen serumsuz besiyeri ve serumun yerine geçebilecek ürünlerin kullanımı daha yararlı görülmektedir. Serum, plazmaya kıyasla kültüre edilen hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını uyarmaktadır (157). Serum içerisindeki asıl mitojenik faktörlerin kaynağı, pıhtıların içinde yer alan aktifleşmiş trombositlerdir

(158). Bu bakımdan, trombosit lizatları hayvan serumlarının yerini alabilecek değerli bir eklentidir.

2.7. Plateletler ve platelet kaynaklı ürünlerin hazırlanması

Trombosit olarak da bilinen plateletler, kemik iliğinde bulunan geniş stoplazmalı (100 μm) megakaryositlerin sitoplazmasından köken alan, küçük 2-3 μm çaplı çekirdeklenmiş hücre parçalarıdır. Periferik kanda eritrositlerden sonra en çok bulunan hücrelerdir. Trombositlerde birçok yüzey reseptörü, kanaliküler sistem, mikrotüpler, mitokondri, üç tip granül (lizozomal, alfa ve yoğun) ve glikojen gibi küçük faktörlerin birikimleri bulunur (Şekil 2.4). Yoğun granüller trombosit aktivasyonunu kuvvetlendiren faktörler içerirken, alfa-granüller, hemostaza katkıda bulunan büyüme faktörlerini ve pıhtılaşma proteinlerini içerirler.

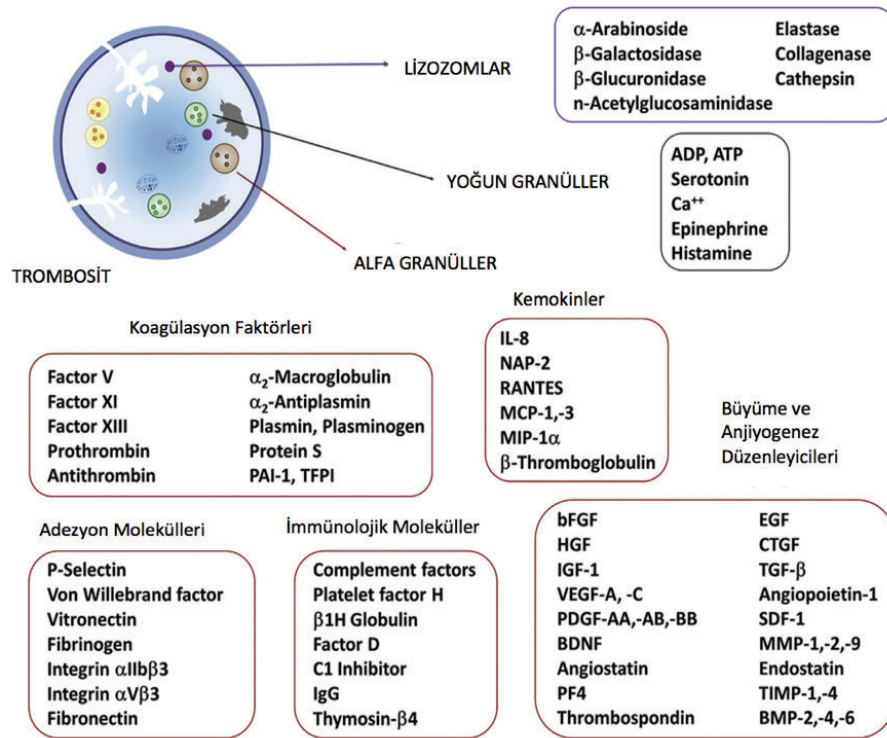


Şekil 2.4. Trombosit yapısı. Zapata JC, 2014 (159) makalesinden uyarlanmıştır.

Trombositlerin en bilinen işlevi vasküler sistemin bütünlüğünü korumaktır. Doku hasarı gibi spesifik uyarıcılar altında trombositler, kollajen ve von Willebrand faktör (vWF) gibi hücre dışı matris proteinleri tarafından aktive edilirler. Glikoprotein reseptörleri içeren çıkıntılar ile birbirlerine ve yara bölgelerindeki hücelere

tutunarak, düzensiz şekilleri şişkinleşerek kompakt küresel bir forma dönüşürler (160). Aktivasyondan sonra trombositler, aktivasyonlarını ve hücre bağlanmalarını daha da arttıran granül içeriklerini ve pıhtılaşma faktörlerini serbest bırakırlar (Şekil 2.5). Bu süreç, yaralanma bölgesinde bir fibrin ağının oluşumunu destekleyen ve kanamayı durduran etkili bir tıkaç oluşumu ile sonuçlanır.

Trombositlerin membran glikoproteinleri arasında GPIa (Glukoprotein Ia), GPIIb/IIIa (aIIb3) veya VLA-5 (very late antigen-5, fibrinojen reseptörü), GPIb/IX/V (vW ve Mac-1 reseptörü), GPIIa veya VLA-6 (laminin reseptörü) ve A2b1 GPVI (Kollajen reseptörü) bulunur. Alfa granülleri P-selektin, PF4 (platelet factor 4), transforming factor- β 1, kemokinler, proteoglikan, PDGF, α 2-plazmin inhibitörü, vitronektin, laminin, CD63, TGF β , CLEC-2 (C-type lectin receptor-2), trombospondin, fibronektin, B-tromboglobülin, vWF, fibrinojen, pıhtılaşma faktörleri V, XI ve XIII, integrinler, proteazlar, trombin, protrombin, kininojenler, immünoglobulin ailesi reseptörleri, lösin tekrarı bakımından zengin aile reseptörleri ve diğer proinflamatuvar ve bağışıklık düzenleyici faktörler içerir. Yoğun granüller ADP, ATP, kalsiyum, serotonin, histamin, dopamin, fosfat, eikosanoidler içerir. Trombosit metabolitleri arasında TXA2 (Tromboksan A2), sfingosin-1-fosfat, PAF (Platelet activating factor), glikojen, PF-4 (trombosit faktörü 4), RANTES (Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted), CTAP-3 (connective tissue activating peptide 3, bağ dokusu aktifleştirici peptid 3), platelet basic protein, Tb-4 (thymosin b-4), FP-B (fibrinopeptid B) ve FP-A bulunmaktadır (159) (Şekil 2.5). Plateletler pıhtılaşma faktörleri, büyüme faktörleri; PDGF, TGF β 1, IGF1, HGF1, VEGF, FGF2 ve interlökinler; IL1, IL4, IL6, IL10, IL13 açısından da zengindirler (161).



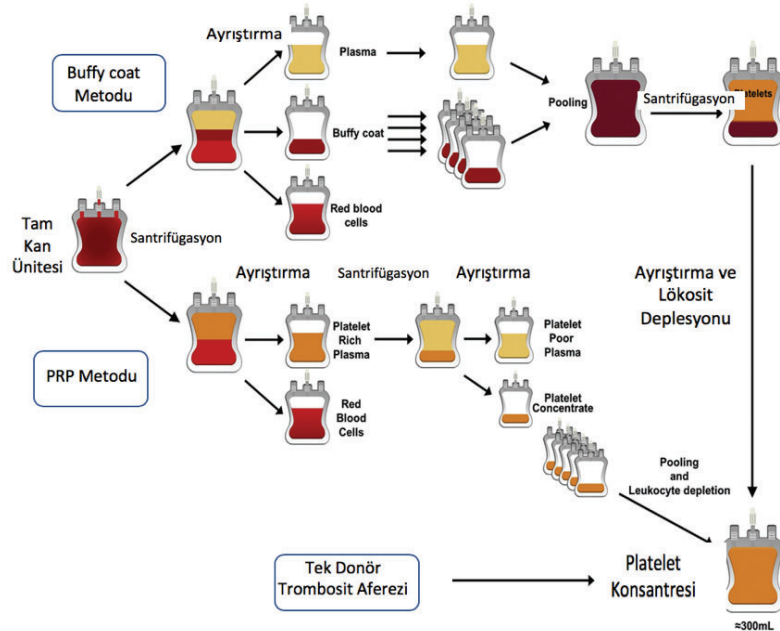
Şekil 2.5. Trombosit içeriği. Burnouf T, 2016 (162) makaleden uyarlanmıştır.

Trombositler hemostazdaki rollerinin yanısıra inflamasyon ve doğuştan immünitinin önemli araçlarıdır. Mikroorganizmalar trombositleri trombin ile aktive oldukları ve endotel hücrelerine ve lökositlere bağlandıkları enfeksiyon veya yaralanma bölgesine çekebilir. Trombositler ayrıca doğrudan Toll-like reseptörler (TLR'ler) ile patojenleri de bağlayabilirler (163). Salgıladıkları PF-4, RANTES, CTAP-3, trombosit bazik proteini, Tb-4, fibrinopeptid B (FP-B), süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil serbest radikalleri gibi antimikrobiyal faktörler ile ve mikrobiyal patojenlere karşı antikora bağlı hücrel sitotoksiteye katılarak enfeksiyona karşı immün yanıtı da etkilerler (164).

Trombosit kaynaklı büyüme faktörlerinin bu uyarıcı etkisi, hasarlı dokuyu onarmak ve çoğaltmanın yanısıra, in vitro hücre çoğaltılması için de kullanılabilir (165). Trombositten zengin plazma (PRP, platelet rich plazma) preparatlarının kullanımı rejeneratif tıbbın odak noktalarındandır (166). Farklı metodlarla hazırlanan PRP, PL, platelet jel gibi trombosit ürünlerinin içerdiği büyüme faktörleri hazırlama

metoduna göre değişir (167). Trombosit konsantreleri hazırlamanın teknik detayları için çeşitli kılavuzlar vardır. Avrupa için Guide of the Council of Europe (168), Amerika Birleşik Devletleri'nde AABB, Technical Manual (169), ülkemizde ise Ulusal Kan ve Kan Bileşenleri Hazırlama Kullanım ve Kalite Güvencesi Rehberi (170) kullanılmaktadır.

Klinik uygulamalar için GMP uyumlu terapötik hücresel tedaviler için üretilen insan trombosit konsantreleri "buffy coat"tan, PRP metodu ile veya tek donör aferezindeki trombosit konsantrasyonlarından hazırlanabilir (162, 171). Trombosit konsantreleri i) antikoagüle edilmiş tam kandan "buffy coat" metodu ile tam kanın santrifüjenip dört ünite "buffy coat" kısmının bir ünite plazma ile birleştirilmesi ile hazırlanır. İkinci bir santrifügasyon basamağından sonra trombosit konsantresi lökosit azaltma filtresi ile ürün torbasına aktarılır. ii) PRP metodunda ilk santrifügasyonla eritrosit konsantresi ve PRP ayrılmakta, PRP'nın ikinci santrifügasyonu ile PPP ve platelet konsantresi oluşturulmaktadır. Dört veya 5 ünitenin aseptik şartlarda birleştirilmesi ile yaklaşık 200 mL hacimde bir terapötik doz oluşturulur. iii) Tek donörden trombosit aferez donasyonu ile 200-300 mL ürün elde edilir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Trombosit konsantresi hazırlamada farklı yöntemler. Burnouf T, 2016 (162) makaleden uyarlanmıştır.

Büyüme faktörleri ve diğer biyoaktif molekülleri salgılatmak üzere PL oluşturmak için dört metod vardır. i) Tekrarlayan dondurma/eritme döngüleri; trombosit konsantrelerini $-30\text{ C}'$ nin altına hızla/şok dondurma ve izleyen $37\text{ C}'$ de eritme işlemleri ile yapılır. Optimum dondurma/eritme döngüleri sayısı ve koşullarını belirleyen sistematik bir analiz mevcut değildir (172). ii) Direkt trombosit aktivasyonu; endojen trombin ve fibrin oluşumunu, trombosit degranülasyonunu indüklemek için kalsiyum tuzu çözeltisinin (genellikle CaCl_2) eklenmesini içerir (173). Ayrıca insan veya rekombinant trombin ile doğrudan aktivasyon yapılabilir (174), ancak bu yabancı maddeler hücre tedavisi için PL kullanımının yasal onayını zorlaştırabilir. iii) Sonikasyon; 20 kHz frekansta 30 dakikaya kadar sonikasyon etkilidir (175). iv) Solvent (Çözücü)/deterjan muamelesi; hem trombosit lizisi, hem de lipid zarflı virüslerin inaktivasyonunu sağlar.

Platelet lizatlar, genellikle plateletlerin tekrarlayan dondurma ve çözündürme işlemleri ile hazırlanır. Bu şekilde trombosit içerikleri plazmaya salınır. Santrifügasyon sonrası üstte kalan plazma kısmı ayrılıp hücresel artıkların uzaklaştırılmasından sonra kalan kısım kültür besiyeri eklentisi olarak kullanılır (4, 176, 177). Dondurma-çözündürme döngü optimal sayıları için bir görüş birliği yoktur ve literatürde farklı sayıda dondurma-çözündürme döngüleri için geniş bir büyüme faktör skalası mevcuttur (162). Sıfır, 1, 3, 5, 10, 30 dondurma-çözündürme döngüleri ile yapılan bir çalışmada, 3-5 döngü ile hazırlanan PL'larda istenen büyüme faktörleri konsantrasyonlarına ulaşılmış ve daha fazla sayıda döngünün kısıtlanması önerilmiştir (176).

Trombosit konsantreleri ünite başına Avrupa'da ve ülkemizde asgari $0,6 \times 10^{11}$ (168, 178), Amerika Birleşik Devletleri'nde $0,55 \times 10^{11}$ trombosit içerir (169). Donör trombositlerinin yarı ömrü, terapötik amaçlı kullanım için 5 gündür ancak, zamanla hemostatik ajan olarak rolü azalsa da trombositlerin α granülleri içinde yer alan büyüme faktörleri üç haftaya kadar stabil kalabilmektedir (179). Raf ömrünün 0-3. günlerindeki trombositlerin metabolomik analizinde glikoliz, pentoz fosfat yolu ve glutatyon metabolizmasının artıp, trikarboksilik asit (TCA) döngüsünün azaldığı gösterilmiştir. 4-6. günlerdeki trombositlerin analizinde aktif pürin metabolizmasının

yanı sıra daha aktif bir TCA döngüsü görülmüştür. Artık klinik kullanıma sunulmayan 7-10. günlerindeki trombositlerde ise hücrel metabolizmanın daha hızlı bozulduğu görülmüştür. Depolanan trombositlerde monoton bir bozulma yaşanmamış, ancak art arda metabolik değişimler meydana gelmiştir (180). Raf ömürlerinin birinci gününde ve son kullanma tarihleri geldiğinde dondurularak karşılaştırılan trombositlerden son kullanma tarihi gelmiş olan grubun eritme sonrası geri kazanma durumu daha iyi bulunmuştur. Kryoprezervasyon ile donmamış trombositlere kıyasla, yüzey glikoproteinlerinin (GPIIb, GPIIb, GPVI) azaldığı, aktivasyon işaretleyicilerinde (fosfatidilserin ve P-selektin) ve mikropartikül salınımında artış olduğu gösterilmiştir. Ancak kryoprezervasyona bağlı bu değişiklikler raf ömürlerinin birinci ve sonuncu gününde dondurulan trombositlerde eşit bulunmuştur (181). Trombositlerin -80 °C'nin altında kryoprezervasyonu raf ömürlerini 2 yıla uzatmaktadır (182, 183).

Platelet lizatların FBS ile karşılaştırılmalarında genel olarak kültürde MKH proliferasyonunu artırmada FBS ile benzer, hatta doz bağımlı olarak FBS'den daha iyi olduğunu gösteren çalışmalar vardır (4). Bazı raporlar, insan PL kullanımında MKH yüzey ekspresyonunun etkilenmediğini söylese de (184), PL varlığında bazı MKH yüzey ve adezyon molekülleri ifadelerinin değiştiğini, T ve NK hücre proliferasyonu ve sitotoksite kapasitesinde değişiklikler olduğunu, dolayısıyla MKH kültüründe immün fenotip ve immün modülasyon özelliklerinin değişebileceğini gösteren yayınlar da vardır (185).

Phinney ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ABD'nde klinik kullanım amaçlı MKH üretimi yapan akademik merkezlerin çoğunun KI kökenli MKH'leri havuzlanmış insan trombosit lizatı ile desteklenmiş besiyerinde çoğalttıkları bildirilmiş, ancak farklı merkezler arasında hücre ekim yoğunlukları, kültür süresi, ürün formülasyonu ve MKH ürününün kullanım amacı konusunda standard uygulama olmayıp çok değişken koşullar altında üretim yapıldığı rapor edilmiştir (133). Platelet lizatın hücre kültürlerinde etkisi farklı hücrelerle de araştırılmıştır. Eklem kondrositleri (186), dendritik hücreler (187), endotel progenitör hücreleri (188), osteoblastlar (189) ile yapılan hücre kültürlerinde PL'in hücre büyümesini artırdığı gösterilmiştir.

Platelet lizatin MKH proliferasyonunu destekleyebildiği, in vitro kültür sırasında koloni oluşturan birimin fibroblastik içeriğini koruyabildiği ve bazı durumlarda FBS'den daha iyi kromozomal stabilite sağlayabildiğini gösteren çalışmalar vardır (162, 190). Bazı çalışmalara göre PL'ta çoğaltılan MKH'ler, artmış osteoblastik farklılaşma potansiyeli (191, 192) ve azalmış adipogenik farklılaşma kapasitesi (192) gösterebilmektedir. Bu da kemik rejenerasyonu için hazırlanan MKH kültüründe PL kullanımının daha iyi bir seçenek olabileceğini gösterir. Bununla birlikte, PL ve FBS ile çoğaltılmış MKH'lerin karşılaştırıldığı çalışmalarda azalmış, benzer veya artmış immünomodülatör MKH aktiviteleri bildirilmiştir (185, 193, 194).

Mezenkimal kök hücrelerin köken aldığı hücre türüne göre, hücreler kültürde besiyeri eklentilerinin farklı bileşimlerini tercih edebilmektedir. Örneğin yağ dokusu kökenli MKH'ler, PL kullanıldığında sadece ilk pasajda artmış proliferasyon göstermiştir. Ancak izleyen pasajlarda MKH proliferasyonu, FBS ile karşılaştırıldığına göre azalmıştır. İnsan serumu veya trombinlerle aktive edilen trombositlerin kullanıldığı MKH kültürlerinde ise, yağ dokusu kökenli MKH'lerin gelişimi sürekli desteklenmiştir. Bununla birlikte, kemik iliğinden elde edilen MKH'ler PL ile güçlü bir şekilde çoğaltılmış, ancak insan serumu ve trombinlerle aktive edilen trombositlerin kullanıldığı MKH kültürlerinde FBS kullanımına göre azalmış proliferasyon görülmüştür (195).

Yine farklı hücrelerin (kemik iliği stromal hücreleri, yağ doku kökenli yetişkin kök hücreler, osteoblastlar, kondrositler, göbek kordonu mezenkimal stromal hücreleri, lenfositler) kültürlerinde PL takviyesi, standart FBS kültürüne göre hücre çoğalmasını, kültür boyunca hücre işlevselliğini, klonojenitesini, fenotip ve farklılaşma özelliklerini koruyarak doza bağlı bir şekilde artırmıştır (196).

Ayrıca, farklı koşullar altında ve farklı eklentilerle elde edilen MKH'lerin biyolojik özellikleri henüz tam anlamıyla belirlenmemiş, farklı büyüme faktörleri kaynaklarının ve FBS'un diğer eklentilerle ayrıntılı karşılaştırması henüz çalışılmamış,

kültür ortamının nihai durumunun belirlenmesinde en önemli belirteç olan metabolik özelliklerinin detaylı incelenmesi yapılmamıştır.

2.8. MKH uygulamalarında etkinliğin artırılması ve güvenli uygulamaya yönelik MKH kültür aşamasında üzerinde durulması gereken konular

Sayıları giderek artmakta olan MKH klinik uygulama sonuçlarına göre (87, 108-116) bu hücrelerin uygulanması genel olarak güvenli kabul edilmekte, ancak FBS ile hazırlanmış olan MKH'lerin uzun dönemde xenobiotik mikroorganizmalar yönünden yol açabileceği hastalıklar bilinmemektedir. Bu nedenle güvenlik konusunda yapılması gereken en önemli adım FBS yerine geçebilecek ve en az onun kadar etkili serum / plazma alternatiflerinin bulunmasıdır. Günümüzde MKH klinik uygulamalarında temel sorun, hedeflenen etkinliğin elde edilememesidir. 'MKH'lerin klinikte kullanımı' kısmında belirtildiği üzere MKH'ler klinikte çok farklı patolojiler, hastalıklar nedeniyle kullanılmakta, hemen her organ hasarının iyileşme sürecine katkı sağladığı, özellikle inflamatuvar hastalıklarda antiinflamatuvar ve immünmodulatuvar etkisinin öne çıktığı bilinmektedir. Bununla birlikte, en sık kullanıldığı GVHH dahil olmak üzere çoğu zaman tam cevap elde edilememekte, uygulamalarda ya sübjektif düzelmeler ya da kliniğe yansımayan ancak testlerde minimal değişiklikler bildirilmektedir (197-199). MKH etkinliğinin artırılması için in-vivo mikroçevreyi taklit edecek şekilde doku mühendisliği yaklaşımlarının, 3 boyutlu dinamik ortam, ko-kültürler ve organoid teknolojilerinin kullanımı, ayrıca moleküler ve/veya nanoteknolojik yöntemler, kontrollü salınım sistemleri ile istenilen sekretuar ortamın oluşturulması gerekmektedir. Esasen, MKH uygulamalarında etkinliğin artırılması için temel ihtiyaç hastadaki patolojinin iyi bilinmesi ve in-vivo mikroçevre göz önünde bulundurularak hücre hazırlanmasıdır. Bu amaçla son yıllarda MKH'lerin IFN- γ ile uyarıldırdıktan (primed MKH) sonra hastaya verilmesi durumunda daha etkin bir immunomodulasyon ve inflamasyon kontrolü sağlandığı bildirilmiştir (126, 200).

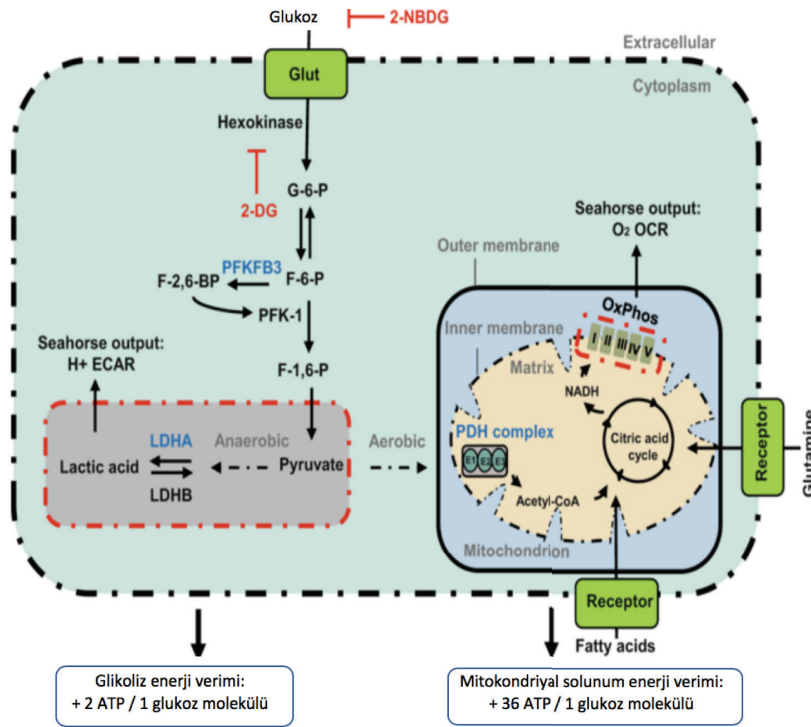
Diğer taraftan, *in vitro* uzun süren kültür ortamında hücrelerin detaylı özellikleri bilinmemektedir. Genel olarak MKH karakterizasyonunda kullanılan yöntemler, adezyon özelliği, stromal fenotipi yansıtan yüzey belirteç özellikleri ve *in vitro* en azından adiposit ve osteoblast yönünde farklılaşma kapasitesi göstermeleridir. Bu özellikler, MKH'lerin çok genel özelliklerini yansıtmaktadır. Hangi dokudan elde edilirse edilsin bu özellikler tüm MKH'lerde benzer bulunmakta, hücrelerin fonksiyonel özellikleri hakkında fikir vermemektedir. Oysa, göbek kordonu kaynaklı hücrelerin daha fazla immüsupresif özelliğe sahip olduğu, kemik iliği kaynaklı olanların daha çok kemik / kırık hasarlarının tamirinde etkin olduğu, genel olarak MKH'nin hangi dokudan elde edildiyse o dokuya ait hücre tiplerine farklılaşma kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (201, 202). Ortak özellikleri paylaşımlarına rağmen, farklı dokulardan ve farklı şekillerde çoğaltılan MKH popülasyonları arasındaki biyolojik farklılıklar hakkında çok az şey bilinmektedir. Bir çalışmada, kemik iliğinden, yağ dokusundan, periodontal ligamentlerden ve tükürük bezlerinden köken alan insan MKH'lerinde Kütle Spektrometre (Mass Spectrometers / MS) yöntemi ile endojen metabolit seviyeleri ölçülmüştür. Optimize edilmiş bir metabolomik teknik kullanarak MKH'lerin köken aldığı dokuya ve farklılaşma kapasitelerine göre 5 lizofosfatidilkolin ve 3 lizofosfatidiletanolaminin belirteç olarak kullanılabilmesi önerilmiştir (203). Bununla birlikte kültür ortamının hücreler üzerindeki detaylı etkileri araştırılmamış, farklı ortamların hücrelerin metabolik özelliklerine olan etkileri konusunda çok kısıtlı çalışma yapılmıştır.

Bu tez çalışması, bu eksikliklerden yola çıkarak planlanmıştır. Daha güvenli uygulama amacıyla FBS'nin yerine geçebilecek platelet lizat kullanımında MKH'lerin ve ortamın metabolik profilinin metabolom analizleriyle detaylı ortaya konulması, ayrıca inflamatuvar ortamda metabolik değişimlerin gözlenebilmesi amacıyla da MKH'lerin LPS ile uyarımı planlanmıştır. MKH kültürlerinde standart olarak kullanılan %10'luk FBS ile yine aynı oranda platelet lizat kullanılması, ayrıca oluşan metabolik ortamdaki değişikliklerin platelet kaynaklı olduğunun gözlenmesi amacıyla kontrol olarak plateletten fakir plazma, ayrıca kemik iliği mikroçevresini yansıtmak üzere yine

%10 konsantrasyonunda insan kemik iliği plazması içeren besiyeri ortamının MKH'lerin biyolojik özelliklerine ve metabolik profiline etkilerinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi amaçlanmıştır. MKH'lerin değişen çevre şartlarına yanıt olarak, kendi metabolizmalarını ve salgı profillerini adapte edebilmesi ve değiştirebilmesi, MKH kültüründe değişik eklentilerin kullanımı ile farklı klinik uygulamalar için farklı özellikte MKH'ler elde edilmesini sağlayacağı düşünülmüştür. Bu çalışmada MKH'lerin metabolik özellikleri yanında metabolitler yönünden sekretuar profili de ayrıntılı ortaya konmuş olacak, farklı ortamlarda geliştirilmiş hücrelerin hangi tip hasar veya patolojide kullanılabileceğine yönelik fikir edinilebilecektir. FBS içermeyen ve ideal olarak kimyasal içeriği belirlenmiş MKH üretme ortamı, zoonotik riskleri ve yan etkileri mümkün olduğunca azaltılmış ve aynı zamanda tedavide hasar tipi veya patolojiye yönelik iyi tanımlanmış MKH üretimini sağlamasına katkı vermesi bakımından, klinik translasyonu olabilecek bir konudur.

2.9. Kök hücrelerin Metabolik Özellikleri

Metabolizma, oksijen varlığında veya yokluğunda fonksiyon gösteren birbiri ile bağlantılı çok sayıda yoldan ve kimyasal reaksiyonlardan oluşur. Aerobik metabolizma ile bir glikoz molekülünden 30-32 molekül ATP oluşur. Anaerobik metabolizma daha az etkindir. Glikoliz, dinlenme safhasındaki normal hücrelerin metabolik özelliklerini, homeostatik dengelerini ATP üretimi ile karşılamaya yöneliktir. Buna karşın proliferen olan hücreler sadece hücre replikasyonu için yeterli enerjiyi üretmemeli, bununla birlikte makro moleküllerin biyosentez ihtiyacını karşılamalı ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine cevap olarak hücrel redoks dengesini korumalıdır. Normal hücreler oksijen varlığında glikozu, pirüvata glikoliz yoluyla parçalar ve daha sonra oluşan pirüvatin büyük çoğunluğunu oksidatif fosforilasyon yoluyla mitokondride tamamen okside edip CO₂'e dönüştürür. Glikoliz ardından sitrik asit siklusu ve elektron transport zinciri ile yüksek oranda ATP sağlanır. Anaerobik koşullarda ise, normal hücreler glikoliz sonucu elde edilen pirüvati mitokondrial oksidasyona yönlendirmeyip, onun yerine büyük ölçüde laktata indirger (204).



Şekil 2.7. Glikoliz ve mitokondriyal solunumun şeması. Yetkin-Arik B, 2019 (205) makaleden uyarlanmıştır.

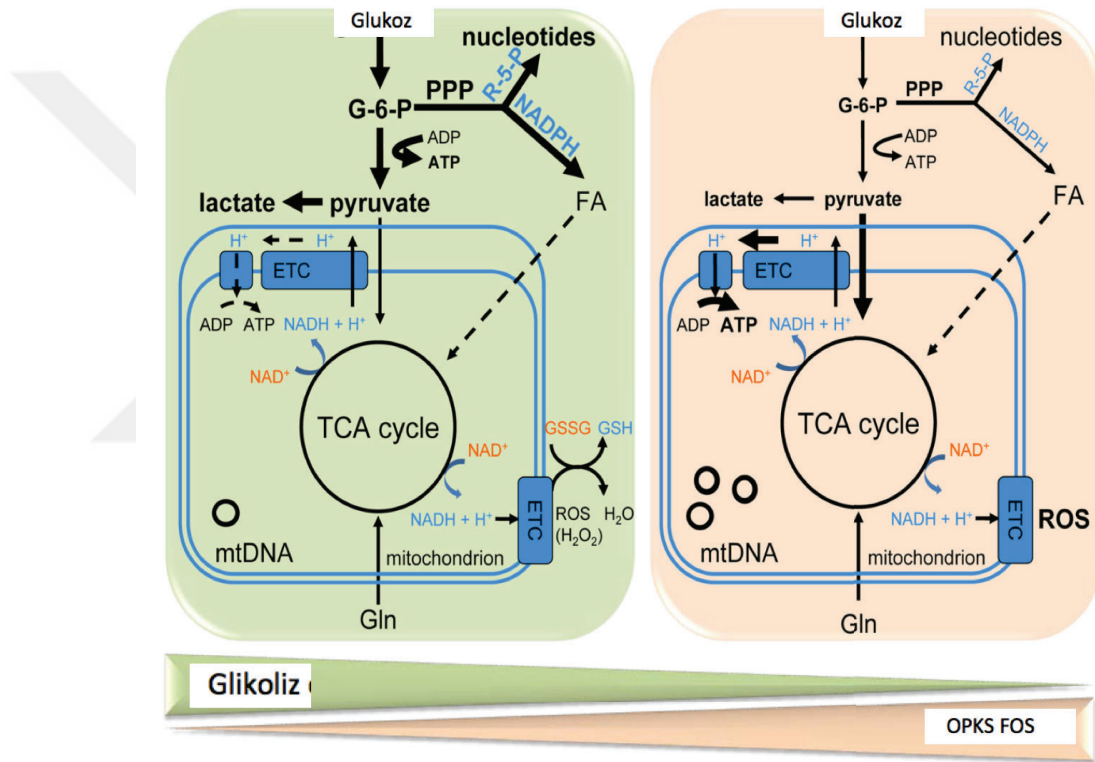
(2-NBDG; 2-[N-(7-nitobenz-2-oksa-1,3-diazol-4-il)-amino] -2-deoksi-D glukoz, 2-DG; 2-deoksiglukoz, Glut; glikoz taşıyıcıları, G-6-P; glikoz-6-fosfat, F-6-P; fruktoz-6-fosfat, PFKFB3; 6-fosfosfrukto-2-kinaz / fruktoz-2,6-bifosfataz 3, F-2,6-BP; früktoz-2,6-bifosfat, F-1,6-p; früktoz-1,6-fosfat, LDHA; laktat dehidrojenaz A, LDHB; laktat dehidrojenaz B, PDH; piruvat dehidrojenaz, NADH; nikotinamid adenin dinükleotid, FADH₂; flavin adenin dinükleotidi, H +; proton, OksFos; Oksidatif fosforilizasyon, ECAR; hücre dışı asitleşme oranları, OCR; oksijen tüketim oranları, ADP; adenosin 5'-difosfat, ATP; adenozin 5'-trifosfat).

Glikoliz ve mitokondriyal solunum iki ana enerji veren yoldur. Glukoz, glikolitik yolda piruvata dönüştürülür. Piruvatın kaderi, oksijen kullanılabilirliğinin önemli olduğu birçok faktöre bağlıdır. Anaerobik koşullarda, piruvat sitoplazmada LDHA tarafından laktata dönüştürülür, LDHB de, laktatı piruvata dönüştürür. PFKFB3 enzimleri, glikolizin hız sınırlayıcı adımlarından birinde rol oynayan ve fruktoz-6-fosfatın, fruktoz-1,6-bifosfata dönüştürülmesinde, fruktoz-2,6-bifosfat (F2,6P2)

üreten PFK-1'in allosterik bir aktivatörüdür. ECAR, anaerobik glikoliz ile üretilen laktik asit seviyelerinin bir ölçüsüdür. Aerobik koşullarda piruvat, PDH kompleksi aracılığıyla sitrik asit döngüsüne girer ve oksidatif fosforilasyon ile katabolize edilir ve ATP sentaz (kompleks V) ile ATP üretilir. OCR, hücrelerde oksijen kullanımının bir ölçüsüdür ve mitokondriyal fonksiyonun bir göstergesidir. Glikozun laktata dönüşümü ile glikoz molekülü başına 2 ATP üretilirken, oksidatif fosforilasyon kullanıldığında glikoz molekülü başına 36 ATP üretilir .

Son yıllarda, hücrelerin metabolik özelliklerine göre tanımlanmalarının önemi üzerinde durulmaktadır. Metabolomiks ve "computational" analiz teknikleri ile (205) spesifik metabolik yollar ortaya çıkarılmış, bu yolların hücre kaderinde belirleyici rolünü göstermiş, hücrenin sessiz kalması, proliferasyon veya farklılaşmasına eşlik eden metabolik özellikler tanımlanmaya başlanmıştır. Hücrede metabolik faktörlerin belirleyici rolü en başta embriyo gelişimi ve kanser alanında büyük ilgi uyandırmıştır. Zigottan çok hücreli organizma gelişimi sırasında farklı aşamalarda embriyonun metabolik gereksinimlerinde farklılıklar vardır. Kanser hücresi metabolizmasının incelenmesiyle bu hücrelerin Krebs döngüsü ve oksidatif fosforilasyon ile bağlantılı normal glikoliz yerine aerobik glikolizi (Warburg etkisi) kullanmasının, hızlı hücre proliferasyonuna yol açtığı ortaya çıkmış ve yeni ilaç hedefleri için umut olmuştur. Kök hücre alanında en önemli gelişmelerden birisi, kök hücrelerin başlıca özellikleri olan kendini yenileme ve farklılaşmalarındaki belirleyici rolün, metabolik farklılıklarından kaynaklandığının anlaşılmasıdır. Daha primitif aşamada olan ve köklülük özelliği daha fazla olan hücrelerin enerji kaynağı olarak oksidatif metabolizma yerine glikolitik metabolizmayı kullandıkları gösterilmiştir. Erişkin kök hücrelerin maturasyon aşamalarında ve somatik hücrelerin pluripotentliğe yeniden programlanmasında glikoliz, mitokondrial oksidatif fosforilasyon ve oksidatif stres dengesinde değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Bu durum, hücrelerin metabolik profillenmesi yoluyla detaylı karakterizasyonunun mümkün olabileceğini düşündürmüştür. Bu gelişmeler kök hücrelerin istenen doku hücresi yönünde farklılaştırılabilmesi ve rejenerasyonun desteklenmesi için yeni tedavi stratejilerinin gelişimine katkı sağlama potansiyeli açısından önemlidir (206).

In vitro yüksek CFU ve uzun yaşam kapasitesi olan (klonojenik) MHK'lerin enerji kaynağı olarak oksidatif metabolizmayı daha az kullandıkları, düşük mitokondriyal membran potansiyeli, düşük mitokondriyal aktivite, daha az reaktif oksijen türevleri ürettikleri gösterilmiş, bu MKH'lerin azalmış mitokondriyal biyogenez özelliklerine sahip oldukları bildirilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin düşük oksidatif durum gösterenlerinin hücre temelli terapiler için daha uygun adaylar olduğu ileri sürülmektedir (207).

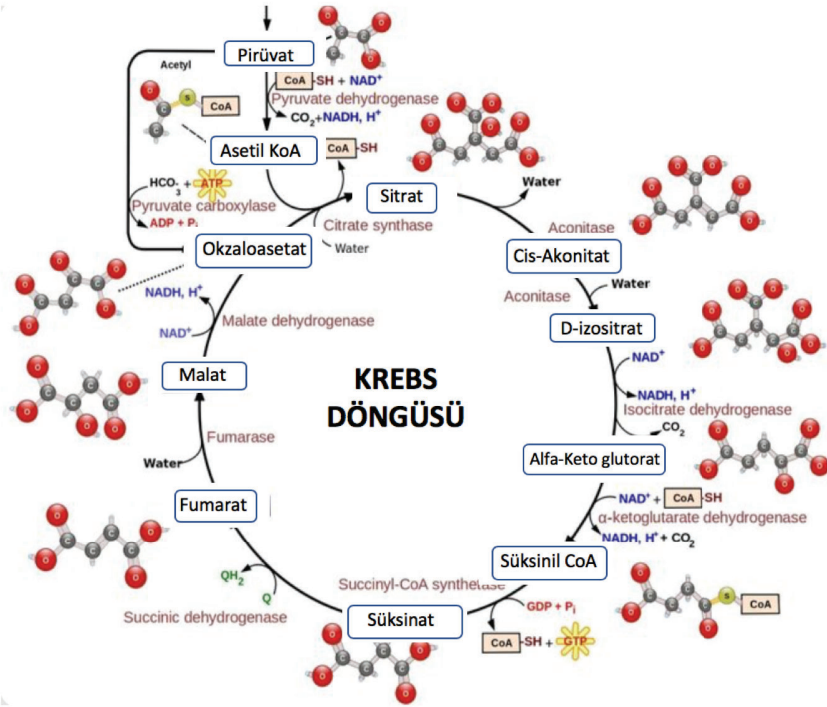


Şekil 2.8. Pluripotent KH ve farklılaşmış hücre enerji metabolizması. Zhang J, 2012 (208) makaleden uyarlanmıştır.

(ETZ, elektron taşıma zinciri; YA, yağ asidi; G-6-P: glikoz-6-fosfat; GSH; Glutasyon; GSSG, glutasyon disülfür; mtDNA, mitokondriyal DNA; NAD: nikotinamid adenin dinükleotid; NADP: nikotinamid adenin dinükleotid fosfat; PPP, pentoz fosfat yolu; R-5-P, riboz-5-fosfat; ROS, reaktif oksijen türleri; TCA, trikarboksilik asit döngüsü. Artmış metabolik yollar kalın harflerle ve oklarla gösterilmiştir). Pluripotent KH'lerde nükleotit ve lipid biyosentezi için pentoz fosfat yolu aracılığıyla ATP ve ara

metabolitleri sağlamak üzere glikoliz baskın iken (soldaki şekil), hücreler farklılaştıkça (sağdaki şekil) enerji metabolizması glikolizden oksidatif fosforilasyona kayar. Tersine nükleer yeniden programlama ile pluripotensi özellikleri kazandırılan hücrelerde de, oksidatif fosforilasyondan glikolize geçiş olur (208).

Piruvat ve kök hücre fonksiyonu arasındaki ilişki 30 yıldan fazla bir süre önce önerilmiştir. Piruvatın laktat üretimine veya mitokondriyal metabolizmaya doğru metabolik akıbeti, kök hücre havuzunun düzenlenmesinde kilit önemdedir; çünkü hücrenin kendini yenileme veya klonal genişleme ve farklılaşma arasındaki kararda yer alır (209). Proliferatif hücre, glikozu daha fazla getirisi olan ve dinlenme aşamasında olan hücrelerin kullandığı oksidatif fosforilasyon yerine, aerobik glikoliz (Warburg Etkisi) ile metabolize etmektedir. Pluripotent kök hücrelerde laktat dehidrojenaz ve heksokinaz gibi glikolizi düzenleyen enzimler yüksek oranda eksprese edilir ve fonksiyonel bir elektron taşıma zinciri yoluyla oksijen tüketilir. Pluripotent kök hücreler, farklılaşmış hücrelere göre oksidatif solunumları daha düşük, enerji üretimine daha az bağlı olduklarından enerji için glikoliz daha baskındır. Mitokondriye piruvat girişi, inaktif bir piruvat dehidrojenaz kompleksi ile sınırlanır. Mitokondriyal membran potansiyeli, ATP sentazın kompleks V'inde ATP'nin hidrolizi ile kısmen korunur. Kök hücrelerde düşük solunum ve yüksek antioksidan enzimlerden dolayı daha az reaktif oksijen türü vardır. Bu özellikler kök hücrelerde redoks ortamını azaltırken, kök hücreler farklılaştıkça daha oksidatif olurlar. Ayrıca KH'lerdeki trikarboksilik asit döngüsü, lipit ve amino asit biyosentezi için gereken sitrat ve a-ketoglutarat gibi ara metabolitleri sağlar (208). Krebs döngüsünün genel şeması Şekil 2.9'da sunulmuştur.



Şekil 2.9 Krebs döngüsü. Osiezagha K, 2013 (210) makaleden uyarlanmıştır.

Kök hücrelerin köklülük derecesi ve farklılaşma özellikleri ile yakın ilgili olan metabolik özelliklerin detaylı ortaya konabilmesi amacıyla bu tez çalışmasında farklı besiyeri ortamlarına maruz bırakılmış MKH'lerin metabolomik analizlerinin yapılması planlanmıştır.

2.10. Metabolomik Analizler

Bir hücrenin/organizmanın fenotipi ve fonksiyonu, bir arada olan ve etkileşen genler, transkriptler, proteinler ve metabolitler ile tanımlanır. Günümüzde yenilikçi teknolojiler sayesinde genom, transkriptom, proteom ve metabolom detaylı tarama analizleri yapılabilmektedir (12). Güçlü bir analiz tekniği olarak kullanılan metabolomik, 'omik' teknolojilerinin içinde en yenilerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğer omik teknolojilerine göre en büyük üstünlüğü yaşayan organizmada ne olduğunu gösteren anlık fotoğrafı yani fenotipi yansıttığıdır (13). Metabolomik; belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda

küçük molekülü metabolitlerin (moleküler ağırlığı <1000 Da) tanımlaması ve miktarının belirlenmesidir.

Metabolik analizler, kök hücre sınıflarının metabolik profilindeki farklılıklar ile hücrelerin köklülük derecesi ve biyolojik fonksiyonlarının ilişkisini ortaya koymak için kullanılmıştır. Örneğin HKH'lerin, çoğunlukla sessiz kaldıkları hipoksik niş ortamında aerobik solunum yerine anaerobik glikoliz kullandıkları gösterilmiştir (211). Uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH) de metabolomik testleri ile EKH'lerden ve köken aldıkları somatik hücrelerden ayrılmaktadır. Bu hücreler EKH'lere göre daha az doymamış metabolitler içerir. Matür hücrelerin yeniden programlanması ile uPKH'ler oksidatifden glikolitik metabolizmaya geçmiştir (212). Bir çalışmada, EKH kültüründe kullanılmak üzere fibroblastlarla koşullandırılmış kültür besiyerinin metabolik analizinde, laktat ve alanin gibi bazı metabolitler kültür besiyerinde bolca bulunurken, triptofan gibi diğerlerinin azaldığını gösterilmiştir (213). Metabolomik testler, ilaç etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, hücrelerin ilaca geliştirdiği direncin mekanizmasını aydınlatmaya yönelik olarak da yapılabilir. Örneğin yapılan bir çalışmada, EKH'lerin normal kültür koşullarında teratojenik bir ilaç olan valproata metabolik yanıtı araştırılmış, triptofan metabolizmasında bir ara madde olan kynurenine ve glutamat metabolizmasındaki bazı küçük moleküllerin valproata cevaben belirgin şekilde arttığı bulunmuştur. Bu çalışma ile insan EKH'lerinden ve EKH kaynaklı nöral prekürsör hücrelerden salgılanan küçük moleküller ölçülebilmüş ve gösterilmiştir. EKH metabolomik analizi, farmakolojik etkinliği veya toksik yanıtı tahmin etmek veya ölçmek için kullanılacak bir kaynak olabilecektir (214).

Kök hücre kültürlerinde köklülüğün; KH özelliklerinin korunabilmesi için, hücre kültürlerinin yoğunluğu, kullanılan kültür ortamı ve kültür koşulları da dahil olmak üzere bir dizi faktör önemlidir. Mezenkimal kök hücre kültüründe kültür ortamı ve kullanılan besiyeri hücre özelliklerini etkiler. Kök hücrelerin çoğaltılması için yapılan pasajlama ve uzun süreli kültür, popülasyondaki MKH'lerin kültürde kendiliğinden farklılaşmaya uğramasıyla kök hücre sayısını azaltabilir. Bu nedenle çalışmalarda erken pasaj MKH'lerin kullanılması genellikle tavsiye edilir. Bununla birlikte,

uPKH'lerinde, geç pasaj hücrelerin kullanılması avantajlıdır. Erken pasaj uPKH'ler, türetildikleri ana hücre tiplerinin özelliklerini daha fazla koruduğundan, bu özellikleri artan pasaj sayısı ile epigenetik değişikliklerin bir sonucu olarak yavaş yavaş kaybolmaktadır (215). Seçilen ekim yoğunluğu da hücre kaderini etkileyebilmektedir (216). Tüm bu sorunları önlemek ve kültür koşullarındaki değişimi en aza indirmek için; kimyasal olarak tanımlanmış kültür ortamında, aynı hücre hatları ile metabolik profilin çalışılması önemlidir.

Farklı serum eklentilerinin test edileceği bu tez kapsamında yapılması planlanan metabolom analizleri ile farklı eklentilerin, farklı besiyerlerinin, hücre içeren ortamların ve hücrelerin metabolik profilinin ortaya konması, karşılaştırmalı analizinin yapılması planlanmıştır. Elde edilen sonuçlarla, farklı serum eklentileri içeren ortamlarda geliştirilen MKHlerin çoğalma, farklılaşma, hücre yüzey özelliklerinin ilişkisi araştırılmış, ayrıca farklı mikroçevre ortamında bu etkinin değerlendirilmesi amacıyla da kültürlerde inflamasyon ortamının taklit edilmesi amacıyla LPS ile uyarım yapılmıştır.

Çalışmamızda 4 grup karşılaştırılmış, serum eklentileri (FBS, PL, PPP, KİP) dışında tüm koşullar aynı tutulmuş, hepsi için standart besiyeri ve aynı konsantrasyonda eklenti (%10) kullanılmıştır. Her 4 eklenti içeren besiyerinde ayrıca inflamatuvar ortam oluşturmak amacıyla LPS uyarısı yapılmıştır. MKH karakterizasyonu için stromal belirteçlerin gösterilmesi amacıyla akım sitometri yöntemi kullanılmış, adezyon ve farklılaşma özellikleri her değişken için ayrı ayrı gösterilmiştir. Tüm gruplar için (FBS, PL, KİP, PPP, FBS-LPS, PL-LPS, KİP-LPS, PPP-LPS) aynı lot numaralı besiyerleri, L-glutamin ve antibiyotikler kullanılmıştır. Tüm çalışmalar aynı vericiye ait MKH'ler ile yapılmış, çoğaltılan MKH'ler aynı gün tripsin edilip kültürü sonlandırılmış ve metabolomik testleri uygulanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyeri ve Eklentiler

- DMEM-LG Gibco, 1735186, NY, USA
- MCDB Sigma, M6770-1L lot; 041M8309, USA
- Penisilin/Streptomisin Biochrom, A-2213, Berlin, Almanya
- L-glutamin Biochrom, K-0283, Berlin, Almanya
- LPS Fluka, 62326, USA
- FBS Gibco, 41G4641K, USA
- Dexametasone Sigma, D2915, USA
- İndomethacin Sigma, 17378, USA
- İnsülin Sigma, 10908, USA
- IBMX AppliChem, A0695,0001, Almanya
- β -gliserofosfat AppliChem, A2253, 0500, Almanya
- L-askorbikasit Sigma, A8960, USA
- DMSO (Dimethyl sulfoxide) Chemcruz, SC, 202581, Hollanda
- PRP 10 donör, grup
- PPP 10 donör, grup
- KİP 10 donör, grup
- Tripsin/EDTA Capricorn, TRY-1B, Almanya
- PBS tablet VWR, E404-100TB, Leuven, Belçika
- PBS 10x hücre kültürü için Ambion, AM9625, USA
- Formalin Sigma, HT501320, USA
- Isopropanol (isopropyl alcohol) Sigma, W292912, USA

3.1.2. İmmunfenotipleme İçin Kullanılan Antikorlar

- CD105-FITC Biolegend, 323204, CA, USA
- CD90-PE BD, Bioscience 555596, USA
- CD73-FITC BD, Pharmingen 561254, USA
- CD29-APC BD, Pharmingen 559883, USA
- CD44-PECy7 BD, Pharmingen 560533, USA
- CD34-PE Biolegend, 343606, CA, USA
- CD45-APC Biolegend, 368512, CA, USA

3.1.3. Karakterizasyonda Kullanılan Boyalar ve Kitler

- Tripan mavisi Applichem, 02L6323, Almanya
- Wright boyası
- ARS (Alirazin red) Sigma, A5533, USA
- ORO (Oil red O) Sigma, 06525, USA
- WST test kiti Roche 11 644 807 001, Almanya
- Mikoplazma saptama kiti Lonza LT07 710, USA

3.1.4. Gen Ekspresyon Analizinde Kullanılan Kit ve baz çiftleri

- Qiazol Qiagen, 56003740, İtalya
- cDNA Sentez Kiti BIO-RAD, iScript c DNA Synthesis Kit, 170-8891, Almanya
- RUN-X F-GCGGTGCAAACCTTTCTCCAG
R-GACTCTGTTGGTCTCGGTGG
- ALP F-GAGATACAAGCACTCCCACT
R-GAGACCCAATAGGTAGTCCA
- PPAR Gamma F-ACAGACAAATCAACCGCCCA
R-AGGGCTTG TAGCAGGTTGTC

- LPL-lipoprotein lipaz F-CCGCCGACCAAAGAAGAGAT
R-GCTACTCCGGGAATGAGGTG
- Adiponektin F-CTGATTCCATACCAGAGGGGCTC
R-GAGTCGTGGTTTCCTGGTCAT
- Actin-b L-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC
R-CGTGGATGCCACAGGACT
- Enzim BIO-RAD, iTaq SYBR Green Supermix,
720001651. Almanya

3.1.5. Metabolomiks Deneylelerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Asetik asit Merck, Kanada
- Asetonitril (MeCN) Merck, Kanada
- Fosforik asit Merck, Kanada
- Hidroklorik asit Merck, Kanada
- Metanol (MeOH) Lab-Scan, Almanya
- Sitrik asit J.R. Baker, USA
- Sodyum hidroksit Merck, Kanada
- Amonyum format Merck, Kanada
- Formalin Sigma, HT501320, USA

3.1.6. Kullanılan Cihazlar

- Laminar akışlı kültür kabini Meti Safe, Türkiye
- Akım Sitometre Accuri C6 plus, BD Biosciences; USA
- Santrifüj 5814, Eppendorf, USA
Beckman Coulter, 5810R, USA
- Görüntüleme sistemli mikroskop CKX41, Olympus, Inverted Mikrosko, USA
- +4 °C lik buzdolabı Arçelik, Türkiye
- Vorteks DragonLab MX-S, Çin
- CO2 li İnkubator HeraCell 150, Hollanda

- NanoDrop ND100, Çin
- micPCR mic M0001088, Hindistan
- Microphuge Beckman Coulter, USA
- -80 °C derin dondurucu RS Biotech, İngiltere
- -40 °C derin dondurucu Sanyo, MDF-US186S, Japonya
- Sıvı nitrojen tankı (-196 °C) MVE810, USA
- GC-MS Shimadzu QP2010 Ultra, Japonya
- LC- qTOF-MS Agilent 6530, USA
- Hassas terazi Mettler Toledo AG 285, İsveç
- Milli-Q su cihazı Barnstead NanoPure Diamond, USA
- Otomatik mikropipet Eppendorf 10-100 µl ve 100-1000 µl, USA
- pH metre Mettler Toledo MA 235, İngiltere
- Santrifüj Beckman Coulter, 5810R, USA
- Hassas terazi Mettler Toledo AG 285, İngiltere
- Terazi Shimadzu, AUW220D, Japonya
- Ultrasonik banyo Bandelin Sonorex RK 514 BH, Almanya
- Vorteks karıştırıcı BIOSAN, LB-BISN-VIP, İngiltere
- Manifold Macherey-Nagel, İngiltere
- Pompa Millipore, WP6122050, USA
- İnkübatör (karbondioksitli) Panasonic, MCO-18AC
- Otoklav Sanyo, MLS-3780, Japonya
- Su banyosu (shaking water bath) GFL, 1086, Almanya
- Sonikasyon yapan su banyosu Becton Dickinson, 440689, USA
- Mikroplate okuyucu Tecan, Avustralya
- Mikroplate okuyucu Analiz Sunrise, Tecan, Avustralya
- 100-1000 µ pipet Eppendorf, USA
- 10-100 µ pipet Eppendorf, USA
- 0,5-20 µ pipet Eppendorf, USA

3.1.7. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler

- Cam pipet 1-10 mL'lik, pyreks®
- Balon jöje 5-1000 mL'lik, pyreks®
- Beher Çeşitli hacimlerde
- Kültür flakları(T25, T75, T125) Corning, USA
- 6, 12, 96 kuyulu plakalar Eppendorf, 0030720113, USA
- 0,22 ve 0,45 um enjektör filtre Millex, SLGPO33RS, Kanada
- Kriovial (2 mL) Greiner, Bio-One, 122278, USA
- Hücre dondurma muhafaza kabı Thermo Fisher Scientific, 5100-0001, USA
- Lökosit filtresi Fresenius Kabi, Bio P 10 plus, 940-2254, Almanya
- Şırınga Genject, 2292, Türkiye
- Hemositometre (burker) Fisher Scientific, 40 02-672-5, USA
- 15 ml santrifüj tüpü Eppendorf, 0030122151, USA
- 50 ml santrifüj tüpü Eppendorf, 0030122178, USA
- 1,5 ml ependorf Axgen, MCT, 150-C, USA
- Eldiven, pudrasız, steril değil Helmed, 20160831, Türkiye
- Serolojik pipet (5, 10, 25 mL) Eppendorf, USA
- Pipet ucu (filtreli) VWR, USA
- Sterile pastör pipet LP, Italiana SPA, 135138 VWR, 612-1756, USA
- Hücre kazıyıcı Corning, 3010, USA
- Hücre süzücü (cell strainer/70 µm) Falcon, 352350, USA
- FACS test tüpü Elkay, 2052-004, İngiltere
- GC kolon DB5-MS kolon, USA
- LC kolon Merck ZIC pHILIC, Kanada

3.1.8. Boya ve Çözeltilerin Hazırlanması

- **Oil red O (ORO):** Oil red boyasından 0,42 gram tartılarak üzerine 120 mL eklenmiş, 1 gece oda ısısında bekletilip 0,45 µ filtreden geçirildikten sonra üzerine 90 mL distile su eklenmiştir.
- **Alizarin Red (ARS):** Alirazin red boyasından 2 gram tartılarak üzerine 100 mL distile su eklenmiştir. Karışımın pH değeri 4,1-4,3 olacak şekilde, pH metre ile ölçülerek üzerine %0,5 amonyum hidroksit damlatılarak ayarlama yapılmıştır.
- **%0.1 formik asit içeren su:** Derişik formik asit (% 86) çözeltisinden 1 mL alınarak içinde bir miktar distile su bulunan bir litrelik balon jöjeye aktarılmış ve bir litreye distile su ile seyreltilmiştir.
- **%0.1 formik asit içeren asetonitril:** Derişik formik asit (% 86) çözeltisinden 1 mL alınarak içinde bir miktar asetonitril bulunan bir litrelik balon jöjeye aktarılmış ve bir litreye asetonitril ile seyreltilmiştir.
- **Wright boyası:** 1 gr toz Wright boyası, 1 mL gliserin, 395 mL Metil alkol birleştirilip, Whatman filtre kağıdından süzülerek kullanılmıştır.
- **Eritrosit Lizis Solusyonu:** 8,29 gr amonyum klorid, 1gr potastum hidrojen karbonat, 0,037 gr Na₂EDTA.H₂O, 100 mL ddH₂O ile hazırlanmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. MKH Kültür Besiyeri ve Serum/Plazma Eklentilerinin Hazırlığı

Çalışmamızda kullandığımız bütün MKH kültür besiyerleri, tüm pasajlar boyunca aynı lot numaralı malzemeler ile ve aynı standartlarda laminar akışlı kültür kabini içerisinde hazırlanmıştır ve temel olarak % 52,8 oranında DMEM-LG (Gibco, 1735186), % 35,2 oranında MCDB-201 (Sigma, 041M8309), ayrıca % 1 oranında L-glutamin (Gibco, 1632639) ve % 1 oranında penisilin/streptomisin (P/S, Gibco, 1631434) kullanılmıştır. Bunların yanısıra % 10 oranında FBS (Gibco, 41G4641K) standart kültür eklentisidir. Çalışmamızda kullandığımız diğer besiyerlerinde de aynı

lot numaralı malzemeler, aynı oranlarda kullanılmış olup, eklenen serum eklentileri (PL, KİP, PPP) yine % 10 oranında kullanılmıştır.

MKH kültüründe inflamatuvar uyarım oluşturmak için tüm besiyerleri 100 ve/veya 50 ng/mL LPS içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 3.1 MKH kültür besiyerleri içerikleri

	DMEM-LG	MCDB	L-glutamin	P/S	Serum Eklentisi	LPS
DMF10	% 52,8	% 35,2	% 1	% 1	% 10 FBS	-
DMPL10	% 52,8	% 35,2	% 1	% 1	% 10 PL	-
DMKİP10	% 52,8	% 35,2	% 1	% 1	% 10 KİP	-
DMPPP10	% 52,8	% 35,2	% 1	% 1	% 10 PPP	-
DMF10-LPS100	% 52,8	% 35,2	% 1	% 1	% 10 FBS	100 ng/mL
DMPL10-LPS100	% 52,8	% 35,2	% 1	% 1	% 10 PL	100 ng/mL
DMKİP10-LPS100	% 52,8	% 35,2	% 1	% 1	% 10 KİP	100 ng/mL
DMPPP10-LPS100	% 52,8	% 35,2	% 1	% 1	% 10 PPP	100 ng/mL

Hazırlanan kültür besiyerleri 0,22 µm filtreden geçirilmiş, +4 °C buzdolabında saklanmıştır. Tüm deneylerde taze besiyeri kullanılmış, 10 gün sonunda kullanılmayan besiyerleri imha edilmiştir.

FBS

Çalışmamızda kullandığımız FBS ticari olarak temin edilmiştir. Tüm çalışma boyunca aynı üretim serili (Gibco, 41G4641K) olanlar kullanılmıştır. Besiyeri hazırlığı öncesi alikotlanan FBS'lar -20 °C'de saklanmıştır.

Platelet lizat (PL) hazırlanması

Çalışmamızda kullandığımız trombosit ürünleri "Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 3 Mayıs 2018 tarih ve 16969557-744 numaralı kararı" kapsamında, son kullanma tarihi gelmiş Kan Merkezi random trombosit konsantreleri arasından seçilerek çalışmaya alınmıştır. Kan Bankamızda hazırlanan trombosit konsantreleri platelet rich plazma (PRP) metodu ile hazırlanmaktadır. Donörler arası farklılıkların kültüre etkilerini azaltmak için, havuzlanmış donör trombositleri kullanılmıştır. On donörden elde edilen trombosit

konsantrelerinden hazırlanan PL, FBS kullanımında olduğu gibi kültür besiyerinde %10 konsantrasyonunda kullanılmıştır.

Trombosit konsantrelerinin hazırlanması için uluslararası standart bir protokol yoktur. Hazırlama metodu kullanılan santrifüje, kullanıcıya, kanın alındığı torbaya, kullanılan antikoagülana göre değişkenlik gösterir.

Kan hücrelerinin çökme özelliği, bu hücrelerin boyutları kadar ortam sıvısı ile aralarındaki yoğunluk farkıyla da ilişkilidir. Ortam sıcaklığına bağlı olan viskozite ve esneklikleri de diğer etkenlerdir. Bu etkenler açısından santrifügasyon için en uygun sıcaklık 20°C ve üzeridir.

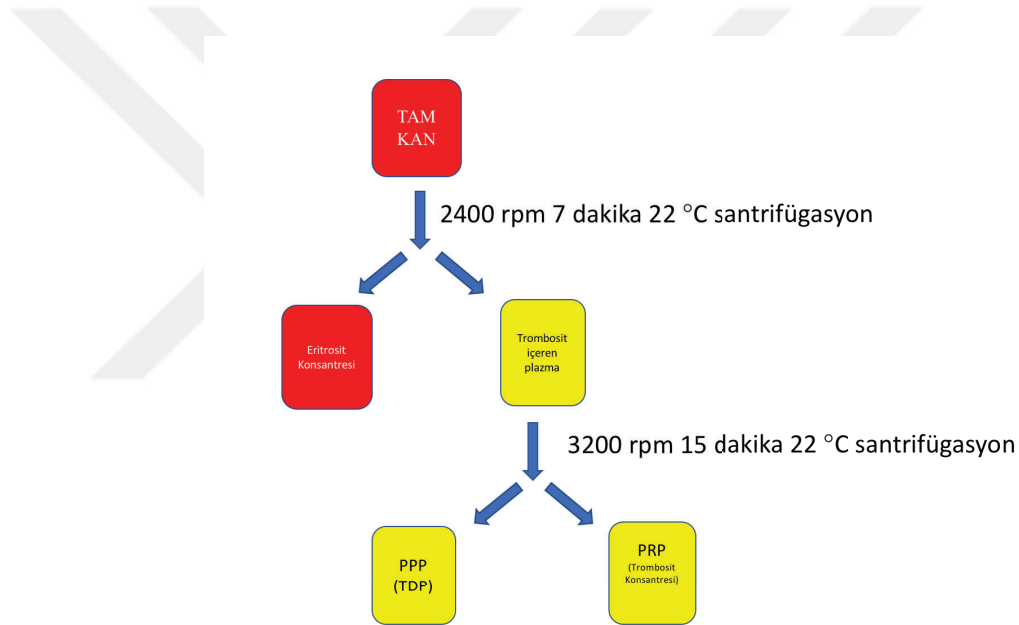
Tablo 3.2 Kanın Temel İçeriğinin Hacim ve Yoğunlukları

	<i>Ortalama Yoğunluk (g/mL)</i>	<i>Ortalama Kan Hücresi Hacmi (10⁻¹⁵ litre)</i>
<i>Plazma</i>	1.026	
<i>Trombosit</i>	1.058	9
<i>Monosit</i>	1.062	470
<i>Lenfosit</i>	1.070	230
<i>Nötrofil</i>	1.082	450
<i>Eritrosit</i>	1.100	87

Santrifügasyonun ilk evresinde ortamdaki sıvı, antikoagülan solüsyon ve plazmadır. Bu aşamada lökositler ve eritrositler, çok daha büyük boyutta olduklarından trombositlerden daha hızlı çökerler. Sonraki evrede, santrifügasyon süresine ve hızına bağlı olarak lökositlerin ve eritrositlerin çoğu torbanın alt yarısında toplanırken torbanın üst yarısında trombositten zengin plazma yer alır. Daha uzun süreli santrifügasyon, dakikadaki dönüş sayısının karesi ve her bir hücrenin rotor merkezine uzaklığı ile doğru orantılı bir güçle trombositlerin çökmesini sağlarken lökositler çok daha yoğun bir ortamda (eritrosit kütlesi vb.) olduklarından üst kısımda kalırlar. Santrifügasyonun sonunda torbanın üst kısmında hücresiz plazma, dibinde ise eritrositler kalır.

Tüm bunlara bağlı olarak son ürün Platelet Konsantresi (PK)'nin gereklilikleri en az 40 mL hacimde olması, en az 60x10⁹/ünite sayıda trombosit (217), en fazla 0.2x10⁹/ünite lökosit içermesi ve kontrol sıklığının da ayda en az 10 ünite olmak üzere

oluşturulan ürün sayısının %1'inin ölçülmesidir (170). Hacettepe Üniversitesi Kan Merkezinde Ulusal Kan ve Kan Bileşenleri Hazırlama Kullanım ve Kalite Güvencesi Rehberi'ne uygun olarak sağlıklı ve gönüllü kan bağışlayıcılarından alınan kanlar komponentlerine ayrılarak uygun koşullarda saklanmakta ve hastalarımıza kullandırılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan trombosit ürünleri Heraeus Cryofuge 6000i santrifüjde çift aşamalı santrifügasyonla elde edilmiştir. İlk aşamada 2400 rpm 7 dakika (dk) 22 °C'de santrifügasyonla eritrosit konsantresi ayrılmakta, bir saatlik bekleme süresi sonrası ikinci aşamada ise 3200 rpm 15 dakika 22 °C'de santrifügasyonla PRP ve PPP birbirinden ayrılmaktadır (Şekil 3.1)



Şekil 3.1 Kanbankası bileşen hazırlama aşamaları (TDP, Taze donmuş plazma)

Platelet konsantresi +20°C ile +24°C arasındaki oda ısısında, ajitatörde çalkalama hareketi ile sallanarak 5 gün boyunca saklanabilmektedir. Beşinci gün sonunda kullanılmayan PK'leri klinik kullanıma sunulmamaktadır. Bunun nedeni trombosit yarılanma ömrünün kısa olması ve oda ısısında saklanması sebebiyle olası kontaminasyon riskinin varlığıdır. Ancak; trombositlerin α granülleri içinde yer alan büyüme faktörleri üç haftaya kadar stabil kalabilmektedir (179). Bu nedenle beşinci günün sonundaki PRP kültür için kullanılacak uygun bir kaynaktır. Çalışmamızda

“Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 03 Mayıs 2018 tarih ve 16969557-744 numaralı kararı kapsamında bu trombosit ürünleri kullanılmıştır. (Tablo 3.3 ve Tablo 3.4) Platelet lizatlar hazırlanmadan önce PK’leri lökosit filtresi ile filtrelenmiştir.

Tablo 3.3 PK grup 1 (10 x 50 mL, 1 x 40 mL)

<i>Donör</i>	<i>Kan Grubu</i>	<i>Örnek (ünite)</i>	<i>Örnek hacmi (mL)</i>
<i>Donör 1</i>	B(-)	1	55
<i>Donör 2</i>	B(-)	1	50
<i>Donör 3</i>	B(-)	1	52
<i>Donör 4</i>	AB (+)	1	55
<i>Donör 5</i>	AB (+)	1	48
<i>Donör 6</i>	AB (+)	1	57
<i>Donör 7</i>	AB (-)	1	56
<i>Donör 8</i>	B(-)	1	59
<i>Donör 9</i>	B(-)	1	53
<i>Donör 10</i>	B(-)	1	55

Tablo 3.4 PK grup 2 (12 x 47,16 mL)

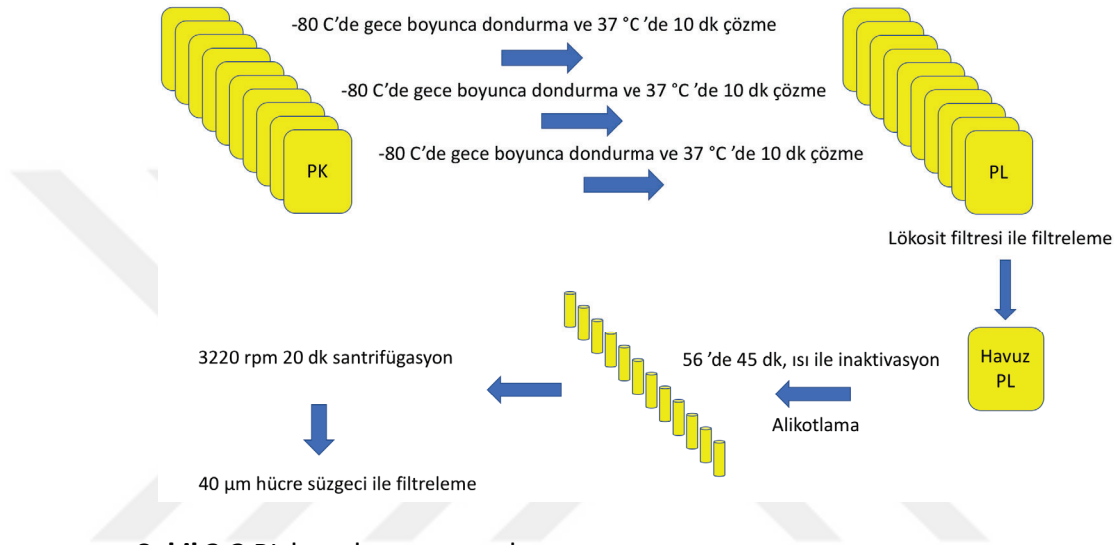
<i>Donör</i>	<i>Kan Grubu</i>	<i>Örnek (ünite)</i>	<i>Örnek (mL)</i>
<i>Donör 1</i>	A (-)	1	57
<i>Donör 2</i>	A (-)	1	50
<i>Donör 3</i>	A (-)	1	56
<i>Donör 4</i>	A (-)	1	55
<i>Donör 5</i>	A (-)	1	54
<i>Donör 6</i>	A (-)	1	58
<i>Donör 7</i>	A (-)	1	56
<i>Donör 8</i>	A (-)	1	59
<i>Donör 9</i>	AB (-)	1	63
<i>Donör 10</i>	AB (+)	1	58

PPP, PRP ayrıldıktan sonra kalan plazma kısmıdır ve mümkün olan en kısa zamanda (1 saati aşmayacak şekilde) -80 °C derin donduruculara alınarak dondurulur (218).

Platelet lizat, PK’lerinin üç kez -80 °C’de gece boyunca dondurma ve 37 °C’de 10 dk çözündürme işlemi ile hazırlanmıştır (176). Bu şekilde trombositler patlatılır ve

içerikleri plazmaya salınır. 3220 rpm 20 dakika santrifügasyon sonrası üstte kalan plazma kısmı alınıp, 40 µm hücre süzgeci ile filtrelenerek hücresel artıkların uzaklaştırılmasından sonra kalan kısım kullanılmıştır (184) (Şekil 3.2).

Tüm trombosit ürünleri 10'ar donörden havuzlanmış ve kültür besiyerinde kullanılmıştır (219). Besiyeri hazırlığı öncesi alikotlanan PL'lar -20 °C'de saklanmıştır.



Trombosit Fakir Plazma (platelet poor plazma, PPP) Hazırlanması

PPP, PK ayrıldıktan sonra kalan plazma kısmıdır ve mümkün olan en kısa zamanda (1 saati aşmayacak şekilde) -80 °C derin donduruculara alınarak dondurulur (218). Dondurma işlemi, plazmadaki labil koagülasyon faktörlerinin (Faktör-8'in) korunmasında önemli bir basamaktır. Faktör-8'i en yüksek oranda elde etmek için plazma -30 °C ya da daha düşük ısıda dondurulur. Dondurma işlemi sırasında plazmanın katı hale geçişi bir saati aşarsa Faktör-8'de azalma olur.

Plazma dondurulurken soğutma mümkün olduğu kadar hızlı olmalı ve optimum 60 dakika içinde torba merkezindeki ısı -30 °C veya altına düşürülmelidir. Şok dondurma cihazı uygulanmadan bu ısıya erişmek ancak birkaç saatte gerçekleşir. Plazmanın çok düşük sıcaklıktaki bir ortama konması ve soğuğa maksimum düzeyde maruz kalacak şekilde düzenli bir yapıda (örneğin torbalar düz yatırılmalı ya da

tutucularda dik tutulmalı) dondurulması ile bu süre kısmen kısaltılabilir (170). Çalışmamızda kullanılan PPP'lar Kanbankasında Ulusal Kan ve Kan Bileşenleri Hazırlama Kullanım ve Kalite Güvencesi Rehberi'ne uygun standart olarak hazırlanan antikor içermeyen IDC (indirek coombs testi) testi negatif TDP'lardır. Bu ürünler hazırlanırken tam kanın ikinci santrifügasyonu sonrası 1 saat içinde -80 °C'de hızla dondurularak saklanmış, kullanılırken de 37 °C plazma eritme cihazında 15 dakika çalkalama hareketi ile eritildikten sonra laminar akışlı kültür kabini içerisine steril koşullarda alikotlanmıştır. MKH'lerin kan grup izohemaglütininlerine maruziyetinden kaçınmak için AB Rh (+) kangrubu plazmalar kullanılmıştır (220). Besiyeri hazırlığı öncesi alikotlanan PPP'lar -20 °C'de saklanmıştır.

Tablo 3.5 PPP grup (10 x 46,2 mL)

<i>Donör</i>	<i>Kan Grubu</i>	<i>Örnek (ünite)</i>	<i>Örnek hacmi (mL)</i>
<i>Donör 1</i>	AB(+)	1	49
<i>Donör 2</i>	AB(+)	1	50
<i>Donör 3</i>	AB(+)	1	50
<i>Donör 4</i>	AB(+)	1	40
<i>Donör 5</i>	AB(+)	1	50
<i>Donör 6</i>	AB(+)	1	42
<i>Donör 7</i>	AB(+)	1	50
<i>Donör 8</i>	AB(+)	1	50
<i>Donör 9</i>	AB(+)	1	41
<i>Donör 10</i>	AB(+)	1	40

Kemik iliği plazma (KİP)'lerinin hazırlanması

HÜ İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Kemik İliği Transplantasyon Ünitesinde çeşitli hastalıklarda hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) yapılmaktadır. Kemik iliği nakli için sağlıklı vericilerden kemik iliği (Kİ) toplanmaktadır. Hasta ile donör arasında minör kan grubu uyumsuzluğu olduğunda toplanan Kİ'nin plazmaları kullanılmamakta ve atılmaktadır. Çalışmamızda bu arşiv materyali kullanılmıştır. Kullandığımız kemik iliği plazmaları 6969557-53 numaralı karar kapsamında biyobanka genişletilmiş onam

formu imzalanmış olan kemik iliği donörlerinin örneklerinden seçilerek çalışmaya alınmıştır (Tablo 3.6).

Tablo 3.6 KİP grup (10 x 49,8 mL)

<i>Donör</i>	<i>Kan Grubu</i>	<i>Örnek (mL)</i>	<i>Ürün Trombosit (x10³/µL)</i>	<i>Ürün Trombosit (ünite)</i>
<i>Donör 1</i>	A(+)	1x50	1	0,00047
<i>Donör 2</i>	B(+)	4x12	-	-
<i>Donör 3</i>	O(+)	1x50	19	0,00893
<i>Donör 4</i>	A(+)	1x50	19	0,00893
<i>Donör 5</i>	O(-)	1x50	13	0,00611
<i>Donör 6</i>	O(+)	1x50	23	0,01081
<i>Donör 7</i>	A(+)	1x50	17	0,00799
<i>Donör 8</i>	O(+)	1x50	18	0,00846
<i>Donör 9</i>	B(+)	1x50	8	0,00376
<i>Donör 10</i>	A(-)	1x50	19	0,00893

Kültür besiyerinin tüm eklentilerine (FBS, PPP, PL, KİP) kompleman faktör inaktivasyonu için 56 °C 45 dakika ısı inaktivasyonu uygulanmış (221), kullanılana kadar -20 °C derin dondurucuda saklanmışlardır. PL, PPP ve KİP'larına tam kan sayımı, mikoplazma testi ve kan kültürü testleri de çalışılmıştır.

3.2.2. Mezenkimal kök hücre (MKH)'lerin izolasyonu ve kültürü

Kİ'nden MKH eldesi

HÜ İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Kemik İliği Transplantasyon Ünitesinde çeşitli hastalıklarda hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) yapılmaktadır. Kemik iliği nakli için sağlıklı vericilerden kemik iliği (Kİ) toplanmaktadır. Kİ örnekleri 500 ve 200 µm lik filtreler ile süzülerek süzülme sonrası filtre atılmaktadır. Çalışmamızda filtreye yapışan hücreler kullanılmıştır. Bu hücreler "Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 16969557-53 numaralı" kararı kapsamında biyobanka onam formu imzalanarak alınmış ve saklanmış örnekleri arasından seçilmiştir. Kemik iliği filtreleri içerisine steril koşullarda eritrosit lizis solüsyonu eklenmiştir. Torbalar çalkalanarak yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması fiziksel olarak sağlanmıştır. Eritrosit lizis solüsyonu torbalar içerisinden alınarak 50 ml.lik falkon tüplere aktarılmıştır. Falkon tüpler 37 °C de, 20-30 dakika inkube edilerek,

eritrositlerin patlayarak uzaklaştırılması sağlanmıştır. İnkübasyon sonunda 1600 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. 2 kez PBS ile yıkama sonrası hücre sayımı yapılmıştır.

Mikoplazma Testleri

Mikoplazma testleri hem kültürde kullanılan hücrelere (Kİ örnekleri), hem de kültür besiyeri eklentilerine (PRP, PPP, KİP) yapılmıştır. Mikoplazma belirleme testine (MycoAlert, Lonza) başlamadan önce bütün reaktifler oda ısısına getirilmiştir. Hücre kültürü süpernatantları 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatandan 100 µL alınarak lüminometre tüpüne eklenmiştir. Üzerine 100 µL MycoAlert™ Reagent eklenerek 5 dk inkübe edildikten sonra tüp lüminometreye yerleştirilerek ilgili programda okuma yapılmıştır (Program A). Örneklere 100 µL MycoAlert™ Substratı eklenerek (Program B) 10 dk inkübasyon sonrasında okuma yapılmıştır. Bu iki değerin cihaz tarafından birbirine oranlanması ile sonuçlar elde edilmiştir. B/A oranı <0,9 ise sonuç negatif, >1,2 ise sonuç pozitif olarak kabul edilmiştir.

MKH'lerin Çoğaltılması

Kullandığımız MKH kültür besiyeri temel olarak %52,8 DMEM-LG / %35,2 MCDB-201 (Sigma), ayrıca %1 glutamin ve %1 penisilin/streptomisin (P/S) içerir. Besiyeri eklentisi ise; FBS, PL, KİP, PPP %10 oranında kullanılmıştır. 75 cm²'lik flasklara konan hücreler, besiyeri içerisinde, 37°C ve %5 CO₂ içeren nemli inkübatörde kültüre konulup, 3-4 günde bir besiyeri değiştirilerek ve hücreler flask yüzeyini %70-80 oranında kapladıklarında, %0.25 oranında hazırlanmış Trypsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılarak, gerektiğinde tekrar ekim yapılmıştır. MKH karakterizasyonu üçüncü pasajda yapılmıştır. Metabolomik analizler için MKH'ler de 3. pasajda toplanmıştır.

Kültürde İnflamatuar Uyarım Oluşturulması

İnflamatuar ortamda MKH davranışını inceleyebilmek için MKH'ler LPS ile uyarılmıştır. Lipopolisakkarit, gram negatif bakterilerin hücre duvarını oluşturur ve bir endotoksindir. İnflamatuar ortam oluşturulmasında sıklıkla kullanılan bir

moleküldür. Hücre kültüründe MKH'ler kültürün sonlandırılması öncesi son 24 saat boyunca 100 ng/mL LPS ile 37 °C, %5 CO2 ve nemli inkübatörde muamele edilmiş, metabolomik analizler yapılmıştır. Farklılaşma deneylerinde ise, kültürün ilk 72 saatinde 100 ng/mL LPS, sonraki 72 saatinde ise 50 ng/mL LPS ile inflamatuvar uyarım oluşturulmuştur (222-224). Çalışmamızda LPS seçilmesinin nedeni, MKH'lerin klinikte en fazla kullanıldığı inflamatuvar hastalık olan GVHH patogenezinde barsak kaynaklı LPS'in başlatıcı ve kritik rolü olmasıdır.

Süpernatantların Saklanması

Tripsinizasyon öncesi flasklarda bulunan "*conditioned medium*" (süpernatant) enjektör yardımıyla çekilip ayrılıp, 1500 rpm 5 dakika santrifüf edilip hücre içermeyen üst kısmı alınarak ependorflara konulup ilk önce -20°C'de dondurulmuş ve daha sonra -80°C de saklanmıştır. Tüm süpernatantlar standart bir şekilde Pasaj 3 (P3) MKH'lerden, hücreler flask yüzeyini tam olarak kapladıklarında toplanmıştır. Metabolomik analizleri yapılmıştır.

Hücrelerin Yedeklenmesi Amacıyla Dondurularak (Kryoprezervasyon) Sıvı Azotta Saklanması

Her pasaj sonunda flaskların diplerinde yapışık olan hücreler ilk önce PBS ile yıkanıp, daha sonra Tripsin-EDTA ile kaldırılıp, 15 dk, 37°C, %5 CO2 koşullarında inkübe edilmiştir. Kaldırılan hücreler toplanıp DMEM-low glucose ve dondurma medium (10% DMSO, 20% FBS) eklenip, kültür besi yeri içinde %70 hücre süspansiyonu olacak şekilde kriovialler içine alınarak ve -80 °C'lik dolaba (kriovialler Mr. Frosty içinde) konmuştur. Mr. Frosty içindeki hücreler, ısı -80 °C'ye düştükten sonra sıvı nitrojen içinde saklanmak üzere nitrojen tankına konmuştur.

3.2.3. MKH'lerin akım sitometri ile karakterizasyonu

İnsan kemik iliğinden elde edilen MKH'lerin hücre yüzeyi molekülleri, akım sitometri cihazında antikorlar ile tanımlanmıştır. Antikor panelinde bulunan

belirteçlerle stromal kökenli, mezenkimal kökenli yüzey belirteçleri bakılmıştır. Flask yüzeyine yapışan P3 hücreler %70-80 yoğunluğa ulaşıncaya, %0.25 tripsin/1mM EDTA ile kaldırılmış ve tek hücre süspansiyonları hazırlanarak, floresan işaretli antikolar içeren %2 insan AB serumu ve PBS/BSA/Sodyum Azid ortamında inkübasyonu yapılmış ve akım sitometri cihazı ile okutulmuştur. İmmünofenotiplendirmede stromal belirteçlerin (CD105-FITC, CD90-PE, CD73-FITC, CD29-APC, CD44-PECy7) pozitifliği ve hematopoetik belirteçlerin (CD34-PE, CD45-APC) negatifliği MKH tanımlanmasında kullanılmıştır.

3.2.4. MKH'lerin osteojenik ve adipojenik farklılaşma özelliklerinin saptanması

Adiposit farklılaşma

Pasaj 2 (P2) 100000 (3000 hücre/cm² yoğunlukta) MKH, 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek % 10 oranında FBS / PL / KİP / PPP eklentisi içeren besiyerleri ile çoğaltılmıştır. Hücreler % 90 - 100 konfluent olduklarında DMEM-LG içerisinde % 10 FBS / PL / KİP / PPP, % 1 P/S, 1 µM deksametazon, 60 µM indometazin, 500 µM izobutimetilksantin (IBMX), 5 µg/mL insülin içeren adipojenik farklılaşma besiyeri ile farklılaşmaları uyarılmıştır. Ayrıca her dört grup için de, farklılaşma başlatıldıktan sonra kültürün ilk 72 saatinde 100 ng/mL LPS, sonraki 72 saatinde ise 50 ng/mL LPS ile inflamatuvar uyarım oluşturulmuştur. 21 gün süresince 3-4 gün aralıklarla farklılaşma besiyeri değiştirilerek 21. günde %10'luk formalinde fikse edilmiş ve Oil red O (ORO) boyası ile boyanarak farklılaşma potansiyeli mikroskopta görüntülenmiştir. Ayrıca gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile adipojenik fenotipe özgü marker genlerin (PPAR γ , Adiponektin, LPL) ekspresyonlarına bakılmıştır (225).

Osteojenik farklılaşma

P2 100000 (3000 hücre/cm² yoğunlukta) MKH, 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek % 10 oranında FBS / PL / KİP / PPP eklentisi içeren besiyerleri ile çoğaltılmıştır. Hücreler % 50-60 konfluent olduklarında DMEM-LG içerisinde % 10 FBS / PL / KİP /

PPP, % 1 P/S, 100 nM deksametazon, 10mM beta gliserofosfat ve 0,2 mM askorbik asit içeren osteojenik farklılaşma besiyeri eklenmiştir. Ayrıca her dört grup için de, farklılaşma başlatıldıktan sonra kültürün ilk 72 saatinde 100 ng/mL LPS, sonraki 72 saatinde ise 50 ng/mL LPS ile inflamatuvar uyaram oluşturulmuştur. 21 gün süresince 3–4 gün aralıklarla farklılaşma besiyeri değiştirilerek 21. günde %10'luk formalinde fikse edilmiş ve Alizarin Red S (ARS) (pH:4,2) ile boyanarak mikroskopta kalsiyum fosfat depositleri görüntülenerek, ekstraselüler matriks kalsifikasyonu yönünden değerlendirilmiştir. Ayrıca gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile RUNX2 ve ALP ekspresyonlarına bakılmıştır (225).

Farklılaşmaların Moleküler Karakterizasyonu, Adipojenik ve Osteojenik Genlerin (PPAR, LPL, Adiponektin, RUNX, ALP) Ekspresyon Analizi, PCR

Farklılaşması yapılan hücrelerin mRNA ayrılması için qiazol'de saklanması:

Çalışmamızda 3 sağlıklı donör MKH'lerin 8 farklı koşulda adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları 2 tekrarlı olarak yapılmıştır. Adipojenik ve osteojenik olarak farklılaştırılmış MKH'ler soğuk PBS ile iki defa yıkandıktan sonra, 500 µL qiazol (Qiagen, 56003740) ile 5 dk 37 °C'de inkübe edilmişlerdir. Hücreler cells scraping ile buldukları flasklardan kazınarak toplamış ve -80°C de ependorf içinde saklanmıştır. Gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile adipojenik ve osteojenik fenotipe özgü marker genlerin (PPARgamma, Adiponektin, LPL, RUNX2, ALP) ekspresyonlarına bakılmıştır.

RNA izolasyonu: Farklılaştırılmış hücreler 500 µL RNA koruyucu (Qiazol, Qiagen, 56003740) içinde -80 °C'de saklanmıştır. Tüm örnekler tamamlandığında RNA izolasyonuna geçilmiştir.

RNA izolasyonu için -80 °C'den çıkartılan örnekler oda sıcaklığında çözdürülüp homojen hale getirilmiştir. Her bir tüpe 100 µL kloroform eklenip tüpler hızlıca 15 sn çalkalanıp, oda sıcaklığında 2-3 dk bekletilmiştir. Örnekler 12000 rpm de 15 dk +4 °C de santrifuj edildikten sonra 3 faz oluştuğu gözlenmiştir. En üstteki sıvı faz toplanarak yeni bir ependorfa aktarılmış ve üzerlerine 375 µL -20 °C'de soğutulmuş % 100 etanol

eklenerek nazikçe karıştırılmıştır. -20 °C'de 45 dk inkübasyondan sonra örnekler 12.000 rpm de 15 dk +4 °C de santrifuj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine %75 lik 750 µL -20 °C'de soğutulmuş ethanol eklenerek tüpler vorteks ile karıştırılmıştır. 7500 rpm de 15 dk +4 °C de santifuj edilen örneklerin süpernatantı uzaklaştırılmıştır. Tüpler ağızları açık bırakılarak etüvde 10-15 dk kurutulmuştur. Pelletler üzerine 20 µL RNase free su ekleyerek homojenize edilmiştir. RNA'ların miktar ve saflığı nanodrop cihazı (ND100) ile ölçülmüştür. Programdan nükleik asit ve sonrasında RNA-40 seçildikten sonra cihaza 1 µL su konup blank yapılmıştır. RNA örneklerinden 1'er µL eklenerek ölçüm yapılmıştır. A260/280 ve A260/230 ng/µL RNA konsantrasyonları elde edilmiştir. RNA örnekleri -20 °C de muhafaza edilmiştir.

cDNA Sentezi: İzole edilen RNA'lardan BIO-RAD iScript cDNA sentez kiti kullanılarak standart protokol takip edilmiş ve cDNA sentezi yapılmıştır. Her bir cDNA sentezi için tüm 5 µL RNA kullanılmıştır. 5X Trans Amp bufferdan 4 µL, Revers Transkriptazdan 1 µL alınarak DNAase/RNAase free su ile toplamda 20 µL olacak şekilde mastermix hazırlanmıştır. Hazırlanan mastermix vortekslenerek, santrifüj yapılmış ve her bir RNA örneği üzerine 15 µL eklenerek pipetlenmiştir. Sentez aşması için 25 °C'de 5 dk, 42 °C'de 30 dk ve reverse transkriptazın inaktivasyonu içinde 85 °C'de 5 dk ve 12 °C'de 1 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonucunda 20 µL cDNA sentezlenmiştir. Elde edilen cDNA lar micPCR (bio molecular system) cihazında real time qPCR ile rölatif hedef gen ifadenmesinin saptanması için kullanılmıştır.

qRT-PCR: İzole edilen örneklerin (n=120) PPAR gamma, LPL, Adiponektin, RUNX ve ALP genlerinin ifade profilleri gerçek zamanlı olarak PCR yöntemi ile incelenmiştir. Real time qPCR için valide edilmiş primer-hidroliz prob çiftleri kullanılmıştır (Tablo 3.7). Bütün örneklerle ait her bir gen aynı şartlar altında üçer kez çalışılmış ve ANOVA testi ile analizler yapılmıştır. Housekeeping gen olarak ACTB (Beta-actin) kullanılmıştır. Bunun nedeni MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşmalarında beta-actin'in ekspresyon stabilitesinin yüksek olmasıdır (226). 'Threshold cycle' (CT) olarak bilinen 'Cross point' (CP) değerleri her örneğin hedef ve referans genleri için 'Second Derivative Maximum Method'una göre micPCR cihazı

kullanılarak saptanmıştır. Bütün değerlere ait amplifikasyon eğrileri ve bütün verilerde yine micPCR yazılımı ile elde edilmiştir. Verilen istatistiksel analiz 2-way ANOVA ve Graphpad prism yazılımında yapılmıştır. PPAR gamma, LPL, Adiponektin, RUNX ve ALP genlerinin verileri ACTB ile normalize edilerek, $-\Delta CT$ ve ortalama $-\Delta CT$ değerleri hesaplanarak istatistiksel analizler yapılmıştır.

Tablo 3.7 qRT-PCR de kullanılan primerlerin dizileri

<i>Gen</i>	<i>Baz Dizisi</i>	<i>Baz sayısı</i>
<i>ADİPONEKTİN-F</i>	CTGATTCCATACCAGAGGGGCTC	23
<i>ADİPONEKTİN-R</i>	GAGTCGTGGTTTCTGGTCAT	21
<i>LPL-Lipoprotein lipase-F</i>	CCGCCGACCAAGAAGAGAT	20
<i>LPL-Lipoprotein lipase-R</i>	GCTACTCCGGGAATGAGGTG	20
<i>RUNX2-F</i>	GCGGTGCAAACCTTCTCCAG	20
<i>RUNX2-R</i>	GACTCTGTTGGTCTCGGTGG	20
<i>PPAR GAMMA-F</i>	ACAGACAAATCAACCGCCCA	20
<i>PPAR GAMMA-R</i>	AGGGCTTGTAGCAGGTTGTC	20
<i>ALPL-F</i>	GAGATACAAGCACTCCCACT	20
<i>ALPL-R</i>	GAGACCCAATAGGTAGTCCA	20

qRT-PCR için 2 μ L moleküler grade su, 5 μ L enzim, 1 μ L primer karıştırılmıştır. Toplam hacim 8 μ L dir. Bu karışım micPCR kuyucuklarına eklendikten sonra 2 μ L dilüe edilen cDNA örnekleri eklenmiştir. Kuyucuklar cihaz içerisine yerleştirilmiştir. PCR termal döngüsünün koşulları 45 döngü; 95 $^{\circ}$ C 5 sn (pre-inkubasyon), 60 $^{\circ}$ C 10 sn (denatürasyon) ve 72 $^{\circ}$ C 20 sn (primer bağlanması) şeklinde yapılmıştır.

3.2.5. WST deneyi

Sitotoksik etki ve metabolik aktivitenin belirlenmesi için yapılan WST-1 testi canlı hücrelerden tetrazolium tuzlarının ayrıştırılmasına dayanan non-radyoaktif, spektrofotometrik, kolorimetrik bir testtir. Tetrazolium tuzları hücresel enzimler tarafından formazan tuzlarına dönüştürülmektedir. Canlı hücre sayısındaki artış örneklerdeki mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesinde artmaya yol açmaktadır. Enzim aktivitesinin güçlenmesiyle birlikte kültürdeki hücrelerde metabolik olarak aktif halde bulunan hücrelerin miktarı ile doğrudan korele olarak formazan ile

boyanan hücre formunda artış olmaktadır. Formazan boya metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından üretilmekte olup, spektrofotometre ile belirtilen dalga boyunda boyanan hücrelerin absorbanası ölçülmektedir (227). Tripsin/EDTA ile kaldırılan MKH'ler 96 kuyulu plakalara cm² başına 2000 MKH olacak şekilde ekilip PPP, PL, FBS, KİP içeren ve ayrıca inflamatuvar uyarım da yapılmış besiyerleri ile her grup için 3 tekrarlı olarak 37° C, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. WST-1 ile analiz yapılacağı gün herbir kuyucukta bulunan kültür besiyerinin %10 u kadar (10 µL) WST-1 solüsyonu (Roche, Aliquatlanan solüsyon -20 C de saklanır, işlemde hemen öncesi eritilerek kullanıma hazır hale getirilir) kuyulara eklenmiştir. Plakalar 2 saat 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildikten sonra spektrofotometre ile 450 nm'de ölçüm yapılmıştır. Metabolik aktivitenin belirlenmesinde aşağıdaki formülasyon kullanılmıştır:

$$\% \text{ Canlı hücre oranı} : \frac{\text{Çalışma grupU (OD)}}{\text{Kontrol (OD)}} \times 100$$

Değerlendirmeler 3, 6 ve 9. günlerde yapılmış, Two-Way ANOVA ile istatistik analiz yapılmıştır.

3.2.6. Metabolomik Analizler

Ekstrasellüler Metabolitler İçin Örnek Hazırlama

Kültürde MKH'ler yoğunlaşıp yüzeyi kapladıklarında, kültür besiyeri süpernatantları (conditioned medyum) toplanmış, santrifügasyon ile kontaminantlar çöktürülüp üstteki kısımdan 1'er mL.lik üç adet örnek -20 °C'de saklanmıştır.

Hücre İçi Metabolitler İçin Örnek Hazırlama

Oda ısısına getirilen flasklardaki kültür besiyeri süpernatantları toplandıktan sonra, hücreler iki kez 10'ar mL.lik fosfat tamponlu salin (PBS) ile hızla yıkanmıştır. 1 ml internal standart içeren (1 µL 1 mg/mL d27-myristik asit mL) soğuk metanol-su çözeltisi (9: 1 hacim: hacim) ekleyerek metabolizma söndürülmüş ve flasttaki

hücreler sıvı nitrojen içinde dondurulmuştur. Ardından hücreler hücre kazıyıcı ile kazılmıştır. Flasklar 10 dakika boyunca buz üzerinde tutulup, başka bir 1 ml soğuk metanol-su solüsyonu eklenerek anlatılan adımlar tekrarlanmıştır. Örnekleri birleştirilmiş ve +4 ° C'de 10 dakika boyunca 14.000 g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar toplanıp, üç adet 0,5 mL alikotlara ayrılarak - 80 ° C'de saklanmıştır.

LC-qTOF-MS (liquid chromatography in combination with hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry) sistemleri, sıvı kromatografinin fiziksel ayırma gücü ile kütle spektrometresinin kütle analiz gücünün kombinasyonundan oluşmuş sistemlerdir. Örnek, fiziksel özelliklerine göre ayrılır, iyonlaştırılarak hem quadropol hem de uçuş zamanlı dedektörler ile çok küçük derişimlerde bile teşhis ve miktar tayini ($\mu\text{g/L}$ ve ng/L düzeyde) yapılabilir. GC-MS (gas chromatography–mass spectrometer) adından da anlaşıldığı gibi iki farklı tekniğin birleşiminden oluşmaktadır. Bu cihazda analiz edilen maddeler önce GC kolonunda ayrılmakta ve bir ara aktarım hattı ile MS cihazına gelmektedir. Her iki cihazın şartları ayrı ayrı ayarlanmalıdır. Kromatografi, içinde iki veya daha fazla bileşen içeren bir numunenin bir kolon içinde bulunan iki faz arasına dağıtarak birbirinden ayırma işlemi olarak algılanmaktadır. Bu fazlar; hareketli faz ve durgun fazdır. Numune hareketli ve durgun faz arasında dağılıma uğrar. Gaz kromatografi hareketli fazı gaz olan kromatografidir. Gaz kromatografisi karışımdaki bileşenleri ayırmayı sağlarken, kütle spektroskopisi her bir bileşenin yapısal olarak tanımlanmasını sağlar.

3.2.7. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Profil Analizleri

Numuneler -80 °C'den çıkarılıp vakumlu santrifüjde tamamen kuruluğa kadar uçurulmuş ve su:asetonitril (50:50, h/h) karışımı ile tekrar çözündürülmüştür. Metabolitlerin analizleri C18 (150 mm x 3 mm, 3 μm) kolon kullanılarak ve hareketli faz olarak % 0.1 formik asit içeren su içeren (Hareketli faz A) ve % 0.1 formik asit içeren asetonitril (Hareketli faz B) kullanılarak gradient elüsyon ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.8). Analizler negatif ve pozitif iyonizasyon modunda qTOF-MS sistemi kullanılarak yapılmıştır (Tablo 3.9). Analizler gradient elüsyon uygulanarak 30 dak'da gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kompleks kromatogramlar MSDIAL yazılımı kullanarak

pikler ayrıştırılmış ve piklerin alıkonma zamanları düzeltilerek veri matrisleri oluşturulmuştur. Oluşan veri matrisindeki piklerin tanımlanması için havuz edilerek oluşturulan kalite kontrol numunelerine farklı enerji (10, 20 ve 40 eV) düzeyleri uygulanarak MS/MS spektrumları elde edilmiş ve spektrumlar METLIN veri bankası taranarak pikler tanımlanmıştır.

Tablo 3.8 LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizler gradient elüsyon programı

Zaman (dk)	% Hareketli faz B*
0	10
1	10
10	90
11	90
15	10
25	10

*% 0.1 formik asit içeren asetonitril

Tablo 3.9 LC-qTOF-MS cihaz parametreleri

	Pozitif iyonizasyon	Negatif iyonizasyon
Kütle aralığı	50-1700 amu	50-1700 amu
Tarama hızı (spektrum/sn)	2	2
Sprey voltajı (kV)	3500	3500
Skimmer voltajı (V)	65	65
Gaz sıcaklığı (oC)	325	325
Gaz akışı (L/dak)	10	10
Nebulizer (psig)	45	45

3.2.8. GC-MS Temelli Metabolomik Profil Analizleri

Numuneler saklandıkları -80°C derin dondurucudan çıkarılmış oda sıcaklığına getirildikten sonra vakumlu santrifüjde kuruluğa kadar uçurulmuştur. Kurumuş numuneler 20 µL metoksiamin hidroklorür (piridin içinde, 20 mg/mL) ile etüvde 30°C'de 90 dak tutularak metoksillendirilmişlerdir. Daha sonra oda sıcaklığına getirilen numuneler üzerine 80 µL N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamit +trimetil-klorosilan (MSTFA + %1 TMCS) eklenmiş ve etüvde 37°C'de 30 dak bekletilerek türevlendirilmiştir. Türevlendirilen numuneler silillenmiş GC-MS viallerine aktarılmış ve sonrasında DB5-MS kolon kullanılarak GC-MS sistemiyle analizleri Tablo 3.10'da

belirtilen optimize edilmiş koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kompleks kromatogramlar ayrıştırıldıktan sonra piklerin alıkonma zamanları *SpectConnect* yazılımı kullanılarak düzeltilmiş ve veri matrisleri oluşturulmuştur. Metabolitlere ait pikler alıkonma indeksli Fiehn ve Golm Database kütüphaneleri kullanılarak aydınlatılmıştır.

Tablo 3.10 GC-MS analiz koşulları ve cihaz parametreleri

<i>Kolon</i>	<i>DB5-MS Kolon (30 M+10 M Ön Kolon; 0.25 Mm İç Çap Ve 0.25 µm Film Kalınlığı)</i>
<i>Fırın Sıcaklık Programı</i>	Fırın Sıcaklığı Artışı 60°C'den (1 dk) 325°C'ye 10°C /dk Artışla (10 dk)
<i>Analiz Süresi</i>	37.5 dk
<i>Enjeksiyon Hacmi</i>	1 µl
<i>Taşıyıcı Gaz</i>	Helyum 1 ml/dk
<i>MSD Geçiş Sıcaklığı</i>	290°C
<i>Çözücü Gecikme Süresi</i>	5.90 dk
<i>Kütle Aralığı</i>	50-650 Lton

3.2.9. Metabolomik Analiz Profillerinin Yorumlanması

Elde edilen metabolomik analizlerin sonucu bir arada değerlendirilerek değişen/farklılaşan metabolitler ve ilgili yolaklar belirlenmiştir. Elde edilen verilerin çokluğu düşünüldüğünde veriler çok değişkenli istatistik teknikleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla temel bileşenler analizi (principal component analysis/PCA) ve en küçük kareler farklılaştırma analizi (partial least squares discriminant analysis/PLS-DA) yöntemleri ile grupların ayrılmasında önemli olan metabolitler ve regresyon katsayıları bulunur. PCA analizler veri setinde herhangi bir sistemik hata ve aykırı bir veri olup olmadığını görselleştirmek için kullanılır. Eğer veride herhangi bir problem yoksa PLS-DA analizlerle veri grupları birbirinden ayrılarak veriler hakkında daha detaylı bilgiler alınır. PLS-DA analizlerindeki farklılığa neden olan metabolitlerin bulunması için projede önemli değişken (variable important in project/VIP) grafiklerinden yararlanılır. En yüksek VIP değerine sahip metabolit ayırimda en büyük etkiye sahip metabolittir. Dolayısıyla belirlenen gruplar arasında istatistiksel olarak en çok farklılık gösteren metabolittir ve bu metabolitler belirteç olarak değerlendirilir. VIP grafiklerinden önemli olan metabolitler

bulunmasına rağmen hangi grup içinde hangi metabolitin derişiminin arttığı veya azaldığını bulmak regresyon analizi sonucunda elde edilen katsayılarla verilir. Pozitif olan kontrol grubunda yüksek derişimde iken negatif olan ise kontrol grubunda azalmıştır. Elde edilen metabolitler ile en son olarak yolak analizleri yapılarak, fenotiple en çok hangi yolağın değıştığı bulunur. Farklı bireylerden alınan bileşenlerden gelen maddeler metabolomik analizlerde heterojeniteye neden olabilir. Bu durumu görebilmek için yapılan metabolomik testinde hücrel örneklerin intrasellüler metabolitlerinin yanısıra ekstrasellüler metabolitleri de incelenmiş, ayrıca kültür koşullarında kullanılan besiyerleri negatif kontrol olarak test edilmiştir.

Veri analizi:

Büyük ölçekli hedeflenmemiş metabolomik analizler de yaşanan en büyük problemlerden biri ise numune hazırlama ve cihazdan gelen varyasyonlardır. Bu varyasyonlar farklı normalizasyon teknikleri kullanılarak ortadan kaldırılabilir. Tez çalışmamızda normalizasyon etkisi özellikle varyasyonun çok yüksek olduğu GC-MS verilerinde denenerek optimize edilmiştir.

Otomatik Ölçeklendirme:

Formülde gösterildiği şekilde hesaplanmıştır. Korelasyonlara bağılı olarak metabolitler karşılaştırılır. Bu ölçeklendirmede tüm metabolitler eşit derecede önem kazanır, fakat buradaki dezavantaj ölçüm hatalarının daha fazla etkin hale gelmesidir.

$$\tilde{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{S_i}$$

(\tilde{x}_{ij} : Normalize edilmiş değer, x_{ij} : Metabolit pik alanı, \bar{x}_i : Metabolit ortalama pik alanı, S_i : Standart sapma)

Yolak analizi:

FBS, PL, KİP ve PPP varlığında ve inflamatuvar koşullar altında çoğaltılmış MKH'ler istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve anlamlı değişen metabolitler kullanılarak ($p < 0.05$) yolak analizleri (MetaboAnalyst, Kanada) gerçekleştirilmiştir.

3.2.10. İstatistiksel Yöntem

Veriler ortalama \pm ortalamanın standart sapması (SD) olarak verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılıkların değerlendirilmesinde Windows için üretilmiş GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) programı kullanılarak One-Way ANOVA ve Two-Way ANOVA testleri uygulanmıştır. Bunları izleyerek Tukey's multiple comparisons test (WST-1; günler arası analiz, PCR; FBS ile diğer gruplar arası analiz, Two-Way ANOVA), Sidak's multiple comparisons test (PCR; inflamatuvar uyarım varlığı ve yokluğunun analizi, Two-Way ANOVA) ve Dunnett's multiple comparisons test (PCR; farklı besiyerleri ile MKH'lerin farklılaşma genlerinin tümünün gruplar arası analizi, One-Way ANOVA) yapılmıştır. p değerinin < 0.05 olması anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Kültür Besiyeri Eklentileri Özellikleri

Besiyerinin tüm eklentilerine (FBS, PPP, PL, KİP) kompleman faktör inaktivasyonu için 56 °C'de 45 dakika ısı inaktivasyonu uygulanmış (221), kullanılabilecek kadar -20 °C derin dondurucuda saklanmışlardır. PRP, PPP ve KİP'larına ait platelet sayımı, mikoplazma testi ve mikrobiyal kültür sonuçları tablodadır (Tablo 4.1).

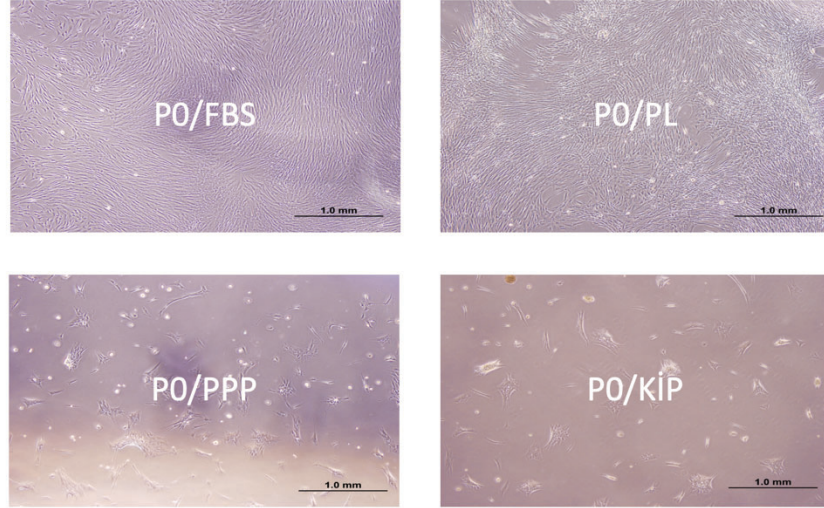
Tablo 4.1 Kültür besiyeri eklentilerinin kalite test sonuçları ortalama değerler verilmiştir

Ürün Adı	Volüm	Total platelet sayısı/L	Platelet (ünite)	Mikoplazma testi (MycoAlert antijen)	Mikrobiyal kültür (Kan kültürü ve aerob kültür)
PRP grup1	10 x 50 mL 1 x 40 mL	2,65 x 10 ¹¹	4,82	Negatif	Negatif
PRP grup 2	12 x 47,16 mL	5,46 x 10 ¹¹	9,93	Negatif	Negatif
PPP	10 x 46,2 mL	-	-	Negatif	Negatif
KİP	10 x 49,8 mL	0,13 x 10 ¹¹	0,00715444	Negatif	Negatif

4.2. Mezenkimal kök hücre (MKH)'lerin izolasyonu ve kültürü, Farklı besiyeri eklentileri ortamında çoğaltılan MKH'lerin morfolojik özellikleri

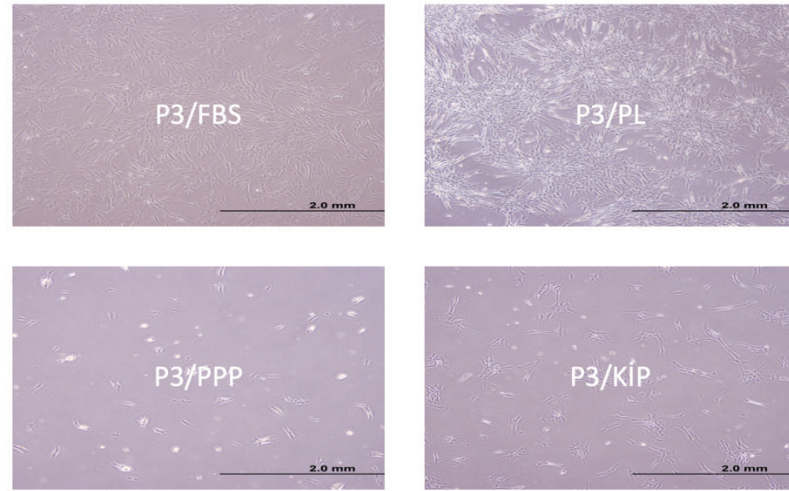
Çalışmamızda HKH nakli amaçlı sağlıklı vericilerden alınan kemik iliğinin toplandığı torbaya ve filtreye yapışan hücreler (atık torba ve atık filtre) laboratuvarında yıkama/eritrosit lizis yapılarak ayrılmış ve kültüre edilmiştir. Kültür besiyeri eklentilerine göre 4 grup incelenmiştir. Kültür kabına yapışan MKH'lerin morfolojik özellikleri ters ışık mikroskopunda incelenmiştir (Şekil 4.1). PL, KİP ve PPP ile çoğaltılan MKH'ler kontrol grubuna (FBS) benzer morfolojik özellikler göstermişlerdir. Hücreler tipik iğsi şekil gösteren fibroblastik yapıda bulunmuştur. FBS ve PL içeren besiyerinde geliştirilen hücreler belirgin yoğunluğa (konfluent) ulaşmalarına rağmen, PPP ve KİP eklentileri içeren ortamda hücreler adeziv yapıda olsa da hedeflenen yoğunluğa ulaşmadıkları ve tipik fibroblastoid yapıda olan hücreler yanında büyük, açılı (üçgen, dörtgen, hegzagonal) bulunduğu ve daha granüler oldukları gözlenmiştir. Ayrıca PL

içeren kültür besiyerinde hücrelerin koloni oluşturmaya meyil gösterir şekilde toplandıkları gözlenmiştir.

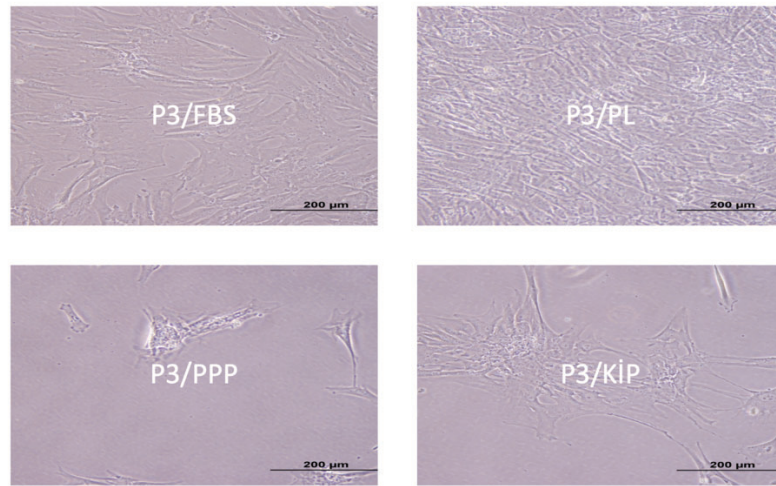


Şekil 4.1 Dört farklı eklenti içeren besiyeri ortamlarında üretilen 0. Pasaj (P0) MKH'lere ait görüntü (Ölçek çizgisi 1.0 mm).

MKH'lerin karakterizasyonu P3'te yapılmıştır. P3 MKH'lerin fibroblastoid yapı gösterdikleri, FBS ve PL ortamında koloni oluşturmaya meyilli toplanma gösterdikleri, bu durumun PL içeren ortamda daha belirgin olduğu, PPP ve KİP eklentileri içeren ortamda ise düşük yoğunlukta gelişim gösterdikleri, ancak P0'da gözlenen morfolojilerinin biraz daha fibroblastoid, iğsi yapıya benzediği gözlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.2 Dört farklı eklenti içeren besiyeri ortamında üretilen MKH'lerin P3 görüntüsü (Ölçek çizgisi 2.0 mm).



Şekil 4.3 Dört farklı medyumda üretilen MKH'lerin P3 görüntüsü (Ölçek çizgisi 200 µm).

PO kültür tüm gruplarda 11. gün sonlandırılmış iken, ilerleyen pasajlarda PPP grubunda MKH çoğaltmak oldukça zorlaşmıştır. PPP grubunda flasklara yapışan MKH'lerin sayıca daha az, daha büyük, uzantılı, şişkin ve kalkmaya eğilimli oldukları gözlenmiştir.

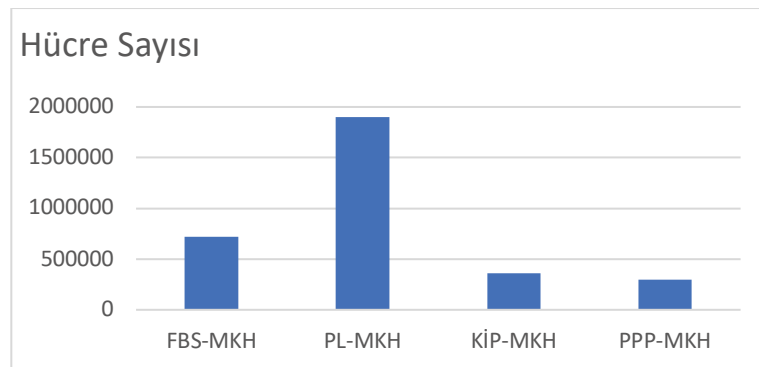
4.3. Farklı koşullarda çoğaltılan MKH'lerin proliferasyon hızları

4.3.1. Hücre sayımı analizi:

MKH'lerin proliferasyon hızını görebilmek amacıyla, P0 MKH'lerin tümü aynı gün tripsin ile kaldırılmıştır. Tüm gruplarda flasklara ekilen mononükleer hücre sayısı aynı tutulmuş, $7,45 \times 10^6$ MNH/T25 flask ($2,98 \times 10^5$ MNH/cm²) olarak ekim yapılmıştır. Aynı zamanda ve sürede ve de aynı koşullarda kültüre edilen MKH'ler arasında en iyi proliferasyon PL-MKH (PL'lı besiyerinde çoğaltılan MKH) grubunda görülmüştür. İlk ekimden sonra 11. günde, en hızlı çoğalan PL-MKH'lerin %70-80 yoğunluğa ulaştığı zaman hücreler toplanmıştır. Buna göre FBS-MKH (FBS'li besiyerinde çoğaltılan MKH) sayısı = 720.000, PL-MKH sayısı = 1.900.000, PPP-MKH (PPP'lı besiyerinde çoğaltılan MKH) sayısı = 300.000, KİP-MKH (KİP'lı besiyerinde çoğaltılan MKH) sayısı=360.000 bulunmuştur. Genel olarak PPP grubunun proliferasyon hızı diğer gruplardan yavaş olarak gözlenmiştir.

Şekillerde görüldüğü gibi proliferasyonlarında belirgin fark vardır. P0 kültür tüm gruplarda 11. gün sonlandırılmış iken, FBS ve PL P3'te 28. gün tam konfluent iken, PPP ve KİP 28. gün tam konfluent olmadan sonlandırılmıştır.

P0'dan sonra MKH'ler yoğunluklarına göre farklı zamanlarda tripsin edilmişlerdir. Pasajlama için hücrelerin %70-80 yoğunluğa ulaşmaları beklenmiş, PPP ve KİP içeren flasklarda bu yoğunluğa ulaşmalarının uzun zaman alması veya ulaşamamaları durumunda daha az yoğunlukta iken tripsinize edilmişlerdir.

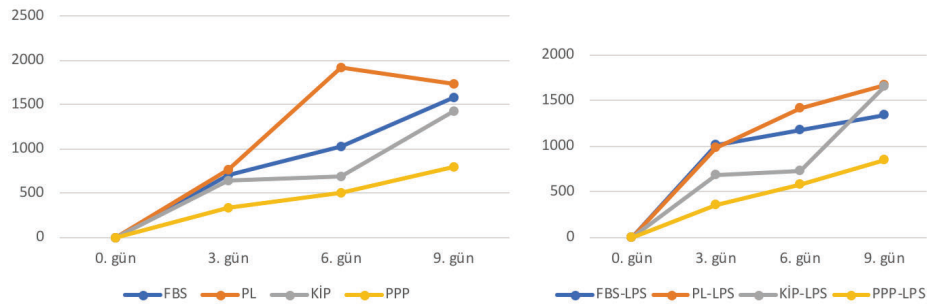


Şekil 4.4 Farklı koşullarda çoğaltılan MKH'lerin pasaj 0 proliferasyon özellikleri

4.3.2. WST analizi sonuçları:

Farklı koşullarda çoğaltılan MKH'lerin proliferasyon ve viabilite özellikleri WST-1 testi ile de hücre sayımı yapılarak gösterilmiştir. Yoğunluğu % 70 - 80 olan P2 MKH'ler Tripsin/EDTA ile kaldırılarak 96 kuyulu plakalara cm^2 başına 2000 MKH olacak şekilde ekilip PPP, PL, KİP, FBS içeren besiyerinde 37°C , % 5 CO_2 içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. İnflamatuvar uyarım 100 ng/mL LPS ile kültürün son 72 saati boyunca yapılmıştır.

WST-1 analizi kültürün 3, 6 ve 9. günlerinde yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5 Farklı besiyeri eklentilerinin MKH proliferasyonuna etkisi (Solda; inflamatuvar uyarım olmadan, sağda; inflamatuvar uyarım varlığında)

Proliferasyon en yüksek PL-MKH grubunun 6. gününde gözlenmiştir. 9. günde azalma olmasının yüzeyi tam kaplayan hücrelerin proliferasyonunun inhibe olması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

İstatistik analizlerinde gruplar arasında One-Way ANOVA, grup içinde günler arasındaki değişimi analiz etmek için de Two-Way ANOVA kullanılmıştır.

FBS varlığında çoğaltılan MKH'ler ile PL varlığında çoğaltılan MKH'lerin aralarında proliferasyon hızları bakımından anlamlı fark olmadığı gözlenmiştir (One-way ANOVA, p: FBS vs PL: 0,95). FBS varlığında çoğaltılan MKH'ler ile KİP varlığında çoğaltılan MKH'ler (One-way ANOVA, p: FBS vs KİP: 1,00) ve PPP varlığında çoğaltılan MKH'ler (One-way ANOVA, p: FBS vs PPP: 0,69) arasında da proliferasyon hızları

bakımından istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır. Ayrıca PL varlığında çoğaltılan MKH'ler ile KİP varlığında çoğaltılan MKH'ler (One-way ANOVA, p: PL-KİP: 0,70) ve PPP varlığında çoğaltılan MKH'ler (One-way ANOVA, p: PL-PPP: 0,17) arasında da proliferasyon hızları bakımından anlamlı fark olmadığı gözlenmiştir. KİP varlığında çoğaltılan MKH'ler ile PPP varlığında çoğaltılan MKH'ler arasında da (One-way ANOVA, p: 0,95) anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 4.2 WST assay One-Way ANOVA analizleri

Tukey's multiple comparisons test	Adjusted p value
FBS vs. PL	0,95
FBS vs. KİP	1,00
FBS vs. PPP	0,69
PL vs. KİP	0,70
PL vs. PPP	0,17
KİP vs. PPP	0,95
FBS vs. FBS-LPS	>0.99
PL vs. PL-LPS	>0.99
KİP vs. KİP-LPS	>0.99
PPP vs. PPP-LPS	>0.99

Genel olarak gruplar arasında farklılıklar gözlenmekle beraber istatistiksel anlamlı bulunmamıştır.

İnflamatuvar uyarım varlığında da MKH'lerin proliferasyon hızları kendi kontrol gruplarına göre anlamlı değişmemiştir ($p > 0.99$) (Tablo 4.2).

Her grup içinde günler arasındaki değişim analiz edildiğinde, yapılan Two-Way ANOVA testlerinde, PPP ile çoğaltılan MKH'lerin 3. ve 9. günleri arasında ($p: 0,03$) proliferasyon hızı bakımından anlamlı fark olduğu bulunmuştur. İnflamatuvar uyarım varlığında KİP ile çoğaltılan MKH'lerin 3. ve 9. günleri arasında ($p: 0,04$) ve 6. ve 9. günleri arasında ($p: 0,04$) proliferasyon hızı bakımından anlamlı fark olduğu, PPP ile çoğaltılan MKH'lerin de 3. ve 9. günleri arasında ($p: 0,03$) proliferasyon hızı bakımından anlamlı fark olduğu bulunmuştur (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 WST assay Two-Way ANOVA analizleri

Tukey's multiple comparisons test	FBS-FBSLPS p value	PL-PLLPS p value	KİP-KİPLPS p value	PPP-PPPLPS p value
3. gün -DM vs. 9. gün -DMLPS	0,87	0,98	1,00	1,00
3. gün -DM vs. 6. gün -DM	0,83	0,28	1,00	0,21
3. gün -DM vs. 9. gün -DM	0,28	0,36	0,06	0,03
3. gün -DM-LPS vs. 6. gün DMLPS	0,98	0,81	1,00	0,14
3. gün -DM-LPS vs. 9. gün DMLPS	0,81	0,56	0,04	0,03
6. gün -DM vs. 6. gün -DM-LPS	0,99	0,74	1,00	0,72
6. gün -DM vs. 9. gün -DM	0,53	0,99	0,07	0,07
6. gün -DM-LPS vs. 9. gün DMLPS	0,98	0,97	0,04	0,09
9. gün -DM vs. 9. gün -DM-LPS	0,92	1,00	0,49	0,94

Hücrelerin proliferasyonunun değerlendirildiği bu deneylerde hücre sayımları ve WST analizleri istatistiksel farklı çıkmamıştır ancak en iyi proliferasyon PL ile FBS grubunda gözlenmiştir. WST deneylerinde buna yakın proliferasyon özellikleri gösteren KİP ve PPP grubunu kültür koşullarında çoğaltmak hem proliferasyon hızı bakımından çok yavaş olmuştur, hem de hücrelerin morfolojik olarak da daha büyük, uzantılı, şişkin ve kalkmaya eğilimli oldukları gözlenmiştir.

4.4. Farklı koşullarda çoğaltılan P3 MKH'lerin akım sitometri ile karakterizasyonu

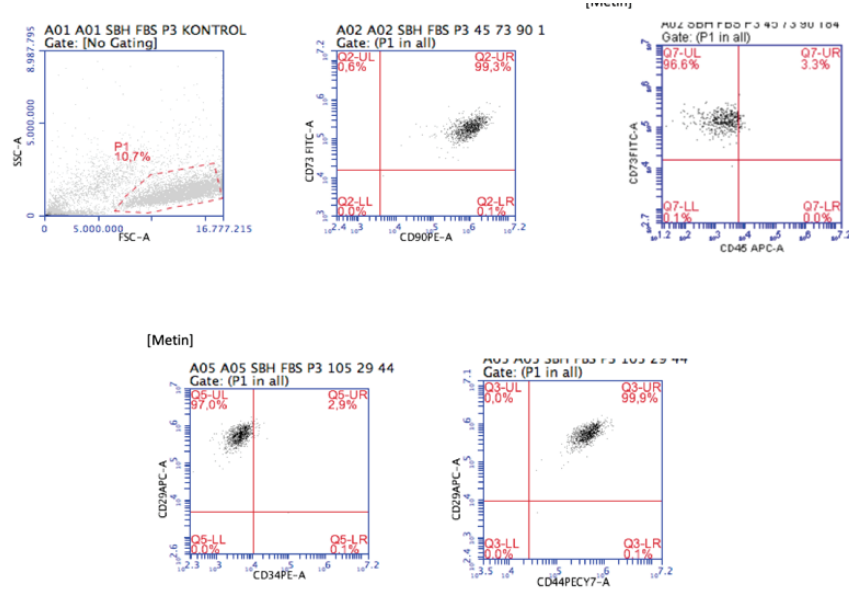
Farklı koşullarda çoğaltılan P3 MKH'ler akım sitometrisi ile tipik MKH fenotipi göstermektedir. Akım sitometri (Accuri C6, BD BIOSCIENCES) cihazında immüno fenotiplendirmesi yapılan P3 MKH'lerin stromal belirteçleri (CD105-FITC, CD90-PE, CD73-FITC, CD29-APC, CD44-PECy7) pozitif, hematopoetik belirteçleri (CD34-PE, CD45-APC) negatif bulunmuştur (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 Dört farklı koşulda çoğaltılan MKH'lerin akım sitometri incelemesi

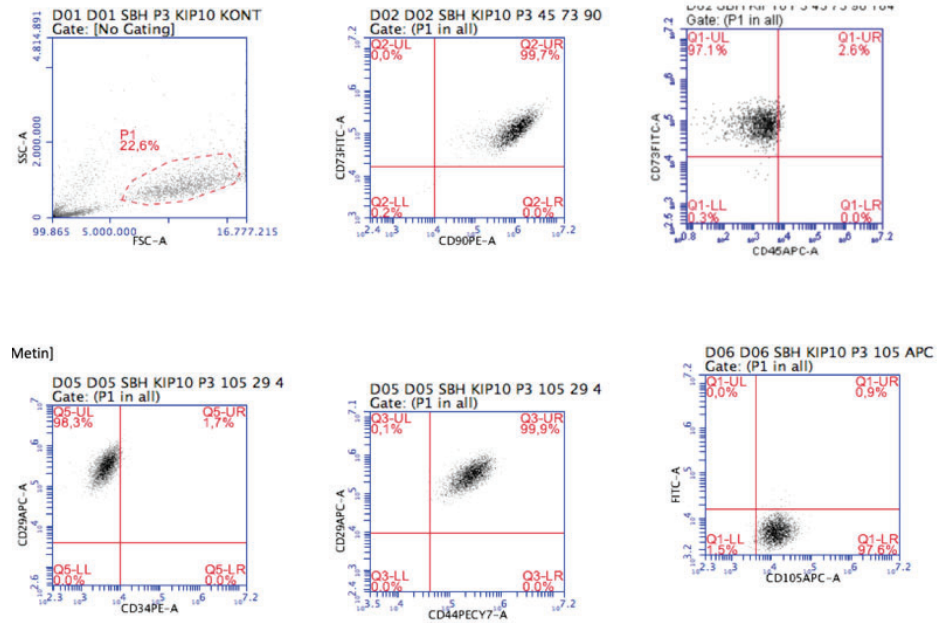
%	FBS-MKH	PL-MKH	KİP-MKH	PPP-MKH
CD73-FITC	99,9	99,0	99,7	100
CD90-PE	99,4	98,1	99,7	99,0
CD105-FITC	-	-	98,5	97,0
CD29-APC	99,9	99,9	100,0	99,9
CD44-PECy7	100,0	99,9	99,9	99,3
CD34-PE	3,0	2,6	1,7	2,0
CD45-APC	3,3	0,7	2,6	1,9

Dört farklı koşulda çoğaltılan MKH'ler akım sitometri incelemesinde benzer sonuçlar göstermiştir. Tüm gruplar tipik MKH yüzey belirteçlerini taşımaktadırlar.

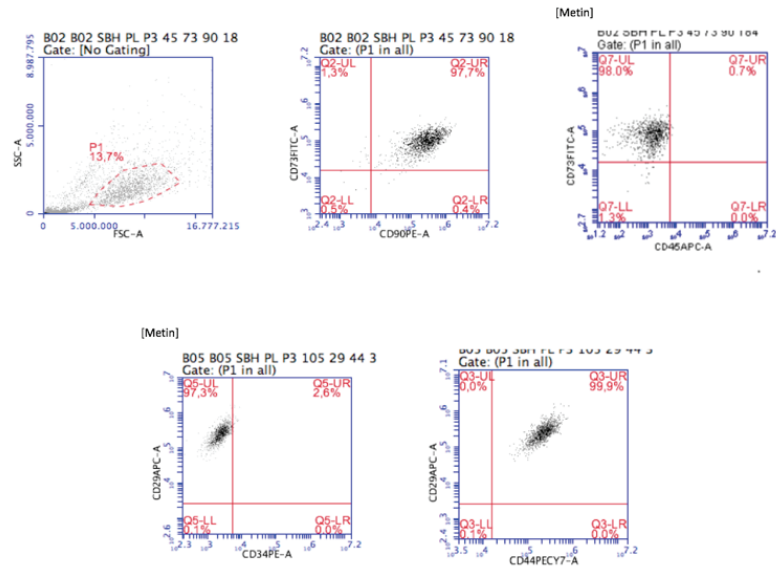
Dört farklı koşulda çoğaltılan P3 MKH'lerin akım sitometre ile alınan dot plot görüntüleri Şekil 4.6-9'da verilmiştir.



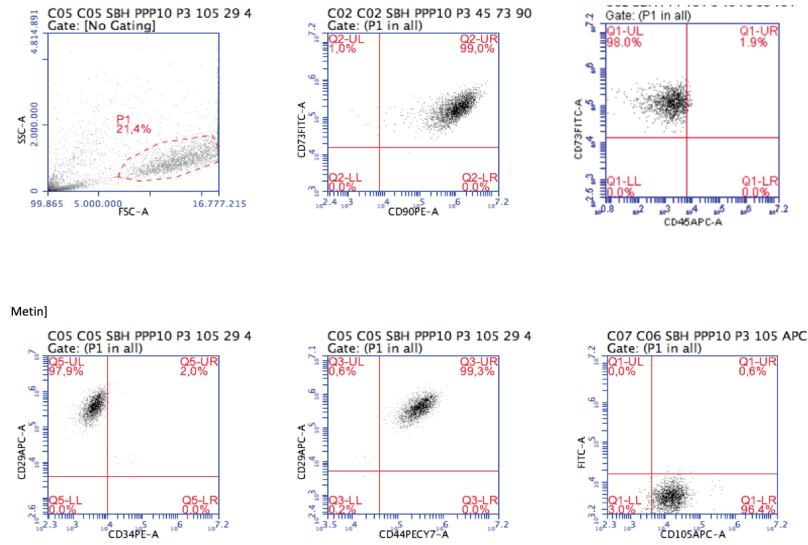
Şekil 4.6 MKH'lerin akım sitometre ile alınan FBS-MKH dot plot görüntüleri.



Şekil 4.7 MKH'lerin akım sitometre ile alınan KİP-MKH dot plot görüntüleri.



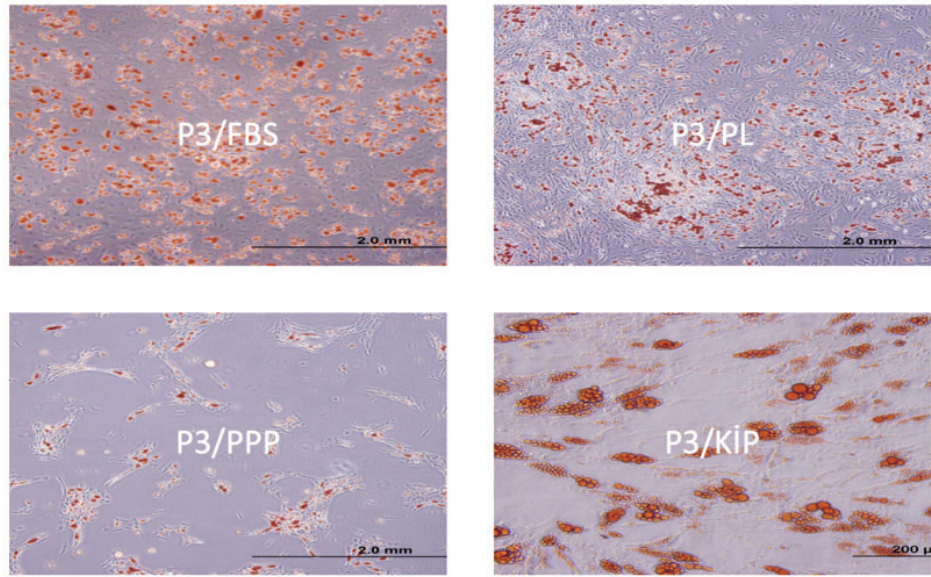
Şekil 4.8 MKH'lerin akım sitometre ile alınan PL-MKH dot plot görüntüleri.



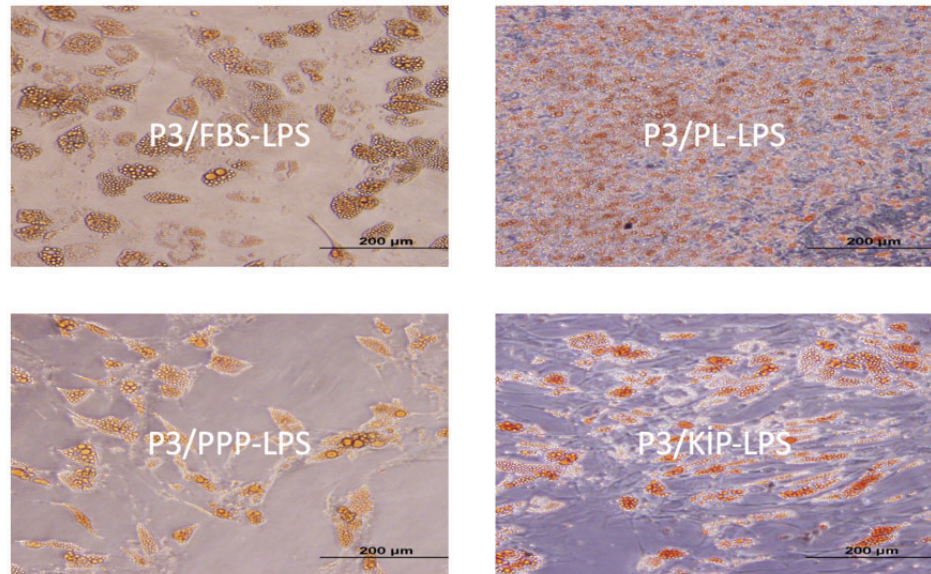
Şekil 4.9 MKH'lerin akım sitometre ile alınan PPP-MKH dot plot görüntüleri.

4.5. Farklı Koşullarda Çoğaltılan MKH'lerin Adipojenik Farklılaşma Özellikleri

Pasaj 2 sonunda tripsinle kaldırılan hücreler 6 plakalı kültür kaplarında 100000 MKH olarak %10 FBS/PL/KİP/PPP, 1 μ M deksametazon, 60 μ M indometazin, 500 μ M izobutylmetilksantin (IBMX), 5 μ g/mL insülin ve DMEM-LG içeren adipojenik farklılaşma besiyeri ile 21 gün boyunca indüklenmiştir (225). İnflamatuvar ortamdaki MKH davranışını gözlemek amacıyla, MKH'ler, farklılaşmanın başlatıldığı ilk 72 saat boyunca 100 ng/mL, ikinci 72 saat boyunca 50 ng/mL inflamatuvar sitokin olan LPS içeren farklılaşma medyumu ile 37 °C, %5 CO₂ ve nemli inkübatörde inkübe edilmişlerdir (228). İzleyen zamanlarda LPS uyarımı olmayan farklılaşma besiyeri ile kültüre devam edilmiştir. İnflamatuvar ortam sepsis/sitokin fırtınasını taklit eder şekilde ilk günler yüksek, sonra azalır şekilde oluşturulmuştur (222-224). Böylece 8 farklı koşuldaki MKH'lerin farklılaşma potansiyelleri 21 gün sonunda Oil red O (ORO) boyası ile boyanarak mikroskopta (Leica) görüntülenmiştir (Şekil 4.10, Şekil 4.11)



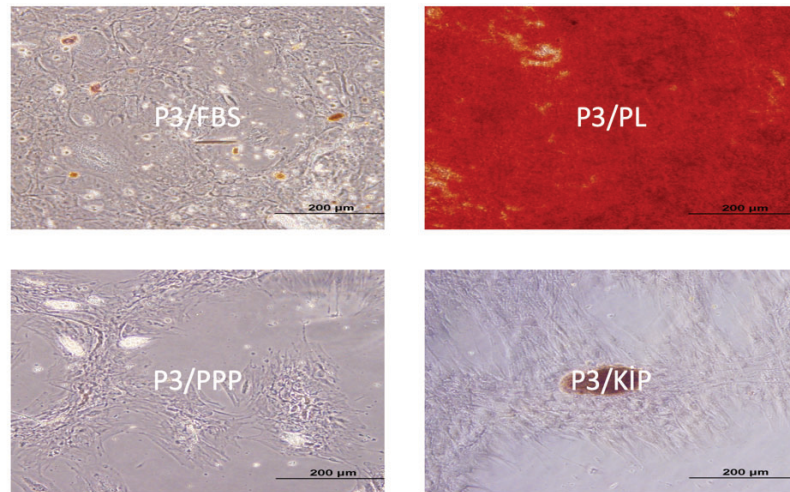
Şekil 4.10 MKH'lerin adipojenik farklılaşmasının Oil red O boyası ile gösterilmesi. MKH'ler FBS, PL, KİP ve PPP eklentileri varlığında adipojenik uyarım sonucu adipojenik farklılaşma göstermiştir.



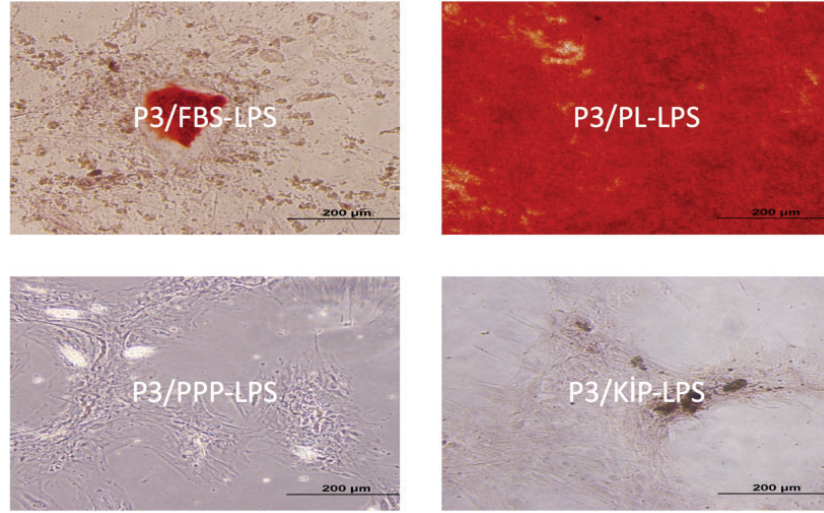
Şekil 4.11 İnflamatuvar uyarım altındaki MKH'lerin adipojenik farklılaşmasının Oil red O boyası ile gösterilmesi. Tüm serum eklentileri (FBS, PL, KİP ve PPP) varlığında adipojenik uyarım sonucu MKH'lerin adipojenik farklılaşma gösterdiği görülmüştür.

4.6. Farklı Koşullarda Çoğaltılan MKH'lerin Osteojenik Farklılaşma Özellikleri

Pasaj 2 sonunda tripsinle kaldırılan 100000 MKH 6 plakalı kültür kaplarında DMEM-LG içerisinde %10 FBS/PL/KİP/PPP, 100 nM deksametazon, 10mM beta gliserofosfat ve 0,2 mM askorbik asit içeren osteoblast farklılaşma medyumunu ile 21 gün boyunca indüklenmiştir. İnflamatuvar ortamdaki MKH davranışını gözlemek amacıyla, MKH'ler, farklılaşmanın başlatıldığı ilk 72 saat boyunca 100 ng/mL, ikinci 72 saat boyunca 50 ng/mL inflamatuvar sitokin olan LPS içeren farklılaşma medyumunu ile 37 °C, %5 CO2 ve nemli inkübatörde inkübe edilmişlerdir (228). İzleyen zamanlarda LPS uyarımı olmayan farklılaşma medyumları ile kültüre devam edilmiştir. İnflamatuvar ortam sepsis/sitokin fırtınasını taklit eder şekilde ilk günler yüksek, sonra azalır şekilde oluşturulmuştur (222-224). Böylece 8 farklı koşuldaki MKH'lerin osteojenik farklılaşma potansiyelleri 21. günde hücreler %10'luk formalinde fikse edilip Alizarin Red S (ARS) (pH:4,2) ile boyanıp mikroskopta kalsiyum fosfat depositleri görüntülenerek ve ekstraselüler matriks kalsifikasyonu gösterilerek saptanmıştır (225). (Şekil 4.12, Şekil 4.13)



Şekil 4.12 MKH'lerin osteojenik farklılaşmasının Alizarin Red boyası ile gösterilmesi. MKH'ler FBS, PL, PPP ve KİP eklentileri içeren osteojenik farklılaşma ortamına maruz bırakıldığında 4 grup arasından en iyi osteojenik farklılaşma PL varlığında indüklenen MKH'lerde gözlenmiştir.



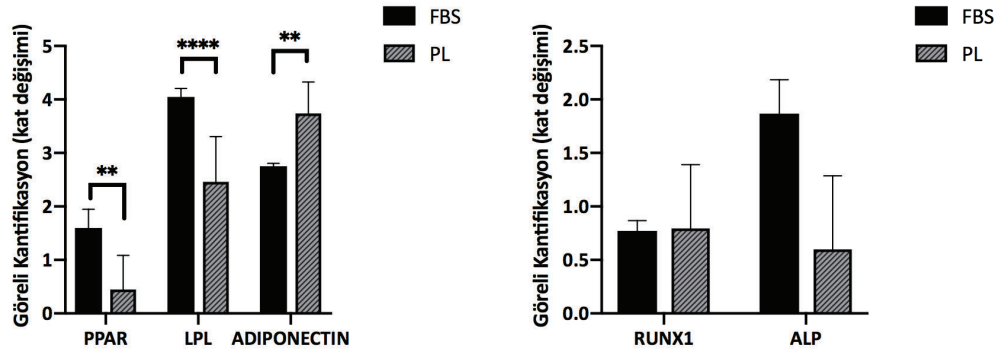
Şekil 4.13 İnflamatuvar uyarım altındaki MKH'lerin osteojenik farklılaşmasının Alizarin Red boyası ile gösterilmesi. Tüm serum eklentileri (FBS, PL, KİP ve PPP) varlığında osteojenik uyarım sonucu en iyi osteojenik farklılaşma PL varlığında gözlenmiştir.

4.7. Adipojenik ve osteojenik genlerin (PPAR, LPL, Adiponektin, RUNX, ALP) ekspresyon analizi, PCR

Adipojenik ve osteojenik gen ifadeleri için uyarımın 21. gününde toplanan üç farklı donöre ait 2 tekrarlı çalışılan hücrelerden RNA ayrılmış ve RT-PCR analizleri de aynı gün toplanan örneklerden yapılmıştır. PL, PPP ve KİP eklentileri ile gen ifadeleri FBS ile elde edilenlerle karşılaştırılarak kat değişimi değerleri ile analizler yapılmıştır.

4.7.1. FBS ve PL eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşmaları uyarılan MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma gen ekspresyonlarının karşılaştırmalı analizi:

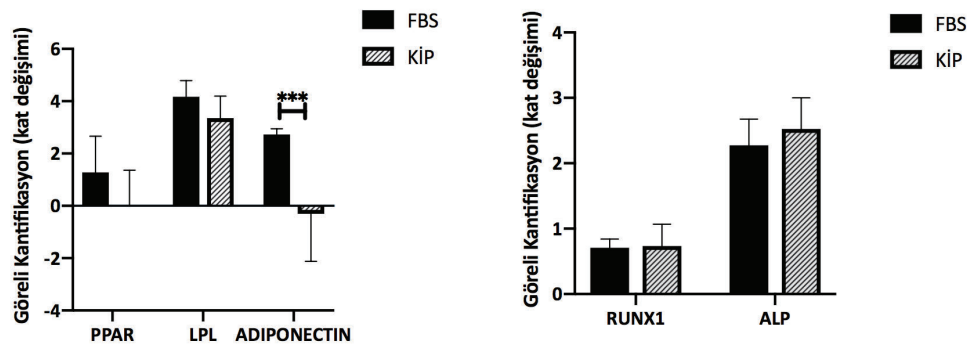
FBS eklentisi ile karşılaştırıldığında PL varlığında çoğaltılan MKH'lerin adipojenik genlerinden PPAR ve LPL ekspresyonunda istatistiksel anlamlı azaldığı (sırasıyla, $p:0.0024$, $p:<0.0001$), adiponektin ekspresyonunun ise istatistiksel anlamlı arttığı ($p:0,0089$) bulunmuştur. PL varlığında çoğaltılan MKH'lerin osteojenik farklılaşmasında da kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı değişiklik bulunmamıştır (RUNX1; $p:0,99$ ALP; $p:0,11$).



Şekil 4.14 Besiyerine PL eklentisi ile çoğaltılan ve adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları uyarılan MKH'lerin kontrol grubuna (FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lere) göre değişen adipojenik (solda) ve osteojenik (sağda) farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi

4.7.2. FBS ve KİP eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma gen ekspresyonlarının karşılaştırmalı analizi:

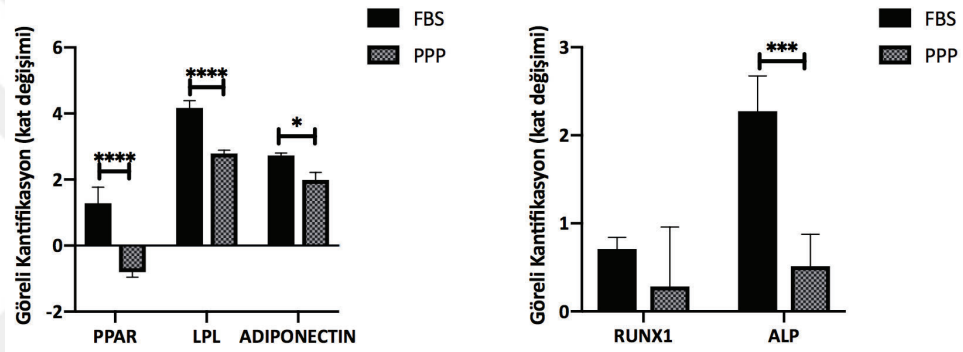
KİP varlığında çoğaltılan MKH'lerin adipojenik farklılaşması FBS ile elde edilenlere göre azalma göstermiştir. Adiponectin gen ekspresyonu KİP varlığında istatistiksel anlamlı azalmıştır ($p: 0,0001$). Osteojenik farklılaşmanın ise kontrol grubu olan FBS ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı bir değişiklik olmasa da arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.15 Besiyerine KİP eklentisi ile çoğaltılan ve adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları uyarılan MKH'lerin kontrol grubuna (FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lere) göre değişen adipojenik (solda) ve osteojenik (sağda) farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi

4.7.3. FBS ve PPP eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma gen ekspresyonlarının karşılaştırmalı analizi:

PPP varlığında çoğaltılan MKH'lerin adipojenik farklılaşmasında FBS ile karşılaştırıldığında her 3 adipojenik gen ifadesinde de istatistiksel anlamlı azalma tespit edilmiştir (PPAR ve LPL; $p < 0,0001$, Adiponectin; $p: 0,001$). PPP varlığında çoğaltılan MKH'lerin osteojenik farklılaşmasının FBS ile kıyaslandığında ALP ifadesinde istatistiksel anlamlı olmak üzere ($p: 0,0001$) azaldığı görülmüştür.

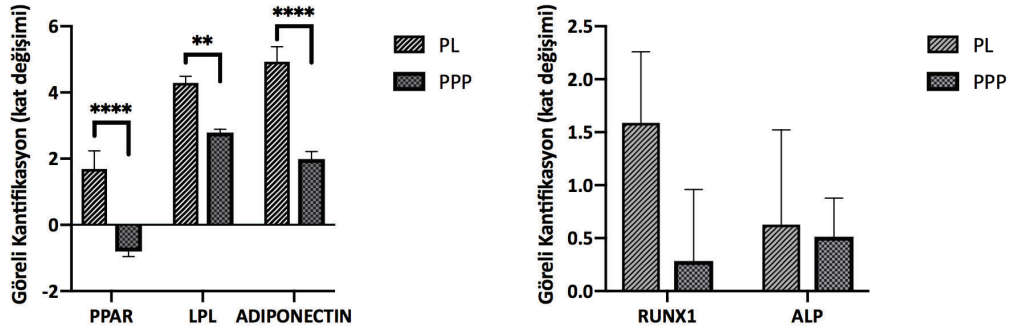


Şekil 4.16 Kültür medyumuna PPP eklentisi ile çoğaltılan ve adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları uyarılan MKH'lerin kontrol grubuna (FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lere) göre değişen adipojenik (solda) ve osteojenik (sağda) farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi

4.7.4. PL ve PPP eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma gen ekspresyonlarının karşılaştırmalı analizi:

Farklılaşma analizlerindeki değişimlerin besiyeri eklentilerindeki trombositlerden kaynaklandığını göstermek için PL ve PPP varlığında çoğaltılan MKH'lerin de farklılaşma özellikleri de incelenmiştir. PPP varlığında çoğaltılan MKH'lerin adipojenik farklılaşmasında, PL varlığında çoğaltılan MKH'lerin adipojenik farklılaşmasına göre her 3 adipojenik gen ifadesinde de istatistiksel anlamlı azalma tespit edilmiştir (PPAR ve Adiponectin; $p < 0,0001$, LPL; $p < 0,001$). PPP varlığında

çoğaltılan MKH'lerin osteojenik farklılaşması da PL ile kıyaslandığında istatistiksel anlamlı olmasa da, her iki gen ifadesi azalmıştır.

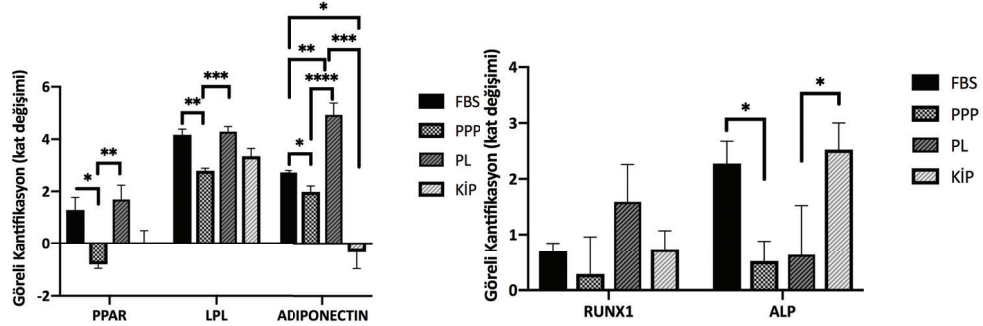


Şekil 4.17 Kültür medyumuna PPP eklentisi ile çoğaltılan ve adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları uyarılan MKH'lerin kontrol grubuna (FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lere) göre değişen adipojenik (solda) ve osteojenik (sağda) farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi

4.7.5. Farklı serum eklentileri (FBS, PL, KİP, PPP) ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma gen ifadelerinin toplu değerlendirilmesi:

Gen ifade değişimleri kontrol grubu olarak FBS ile elde edilen değerlerle karşılaştırılarak verilmiştir. FBS ile karşılaştırıldığında PPP eklentisi içeren besiyeri kullanıldığında genel olarak adipojenik ve osteojenik gen ifadelerinde istatistiksel anlamlı azalma dikkati çekmiştir. KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerde sadece adiponektin ifadesi anlamlı azalmıştır. PL eklentisi ile FBS'ye kıyasla adiponektin ifadesinde istatistiksel anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır. RUNX1 osteojenik gen ifadelerinde ise FBS ve diğer gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. PPP grubunda her 3 adipojenik gen ifadesinde de istatistiksel anlamlı azalma tespit edilmiştir. Osteojenik farklılaşmanın Alizarin red ile değerlendirilmesinde farklılaşmanın hiç gözlenmediği PPP grubunda ALP ifadesinde istatistiksel anlamlı olmak üzere azalma görülmüştür. Yine Alizarin red boyama ile en iyi osteojenik farklılaşmanın gözlendiği PL grubunda Runx1 ve Alkalen fosfataz

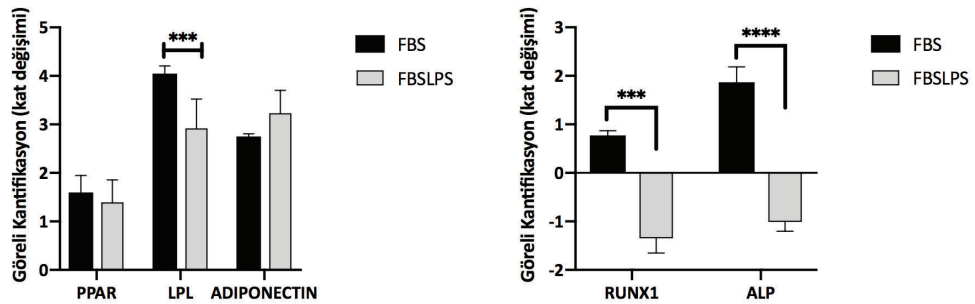
ifadelerinde istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmamış, Alkalin fosfataz ifadesi KİP grubunda hafif yüksek bulunmuştur (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 FBS, PL, KİP, PPP eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin adipojenik (solda) ve osteojenik (sağda) farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi

4.7.6. İnflamatuvar uyarım varlığında FBS eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin farklılaşma gen ifadelerinin analizi:

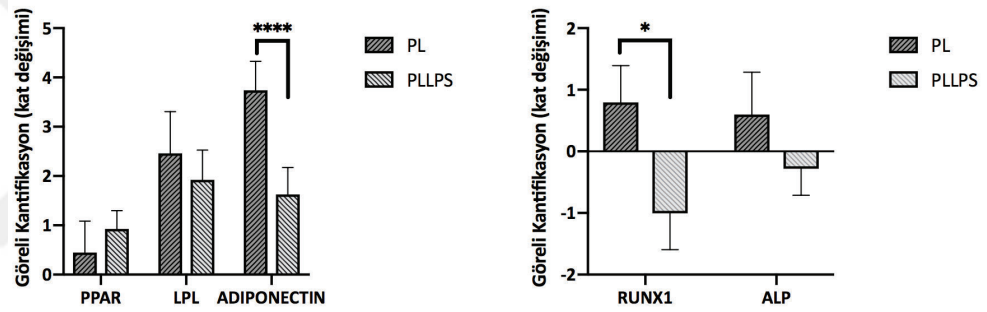
Farklılaşma gen ifade analizleri, tüm gruplarda, inflamatuvar uyarı varlığında da analiz edilmiştir. Lipopolisakkarit ile inflamatuvar uyarım varlığında FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin adipojenik genlerinden PPAR ve LPL ekspresyonu azalmış (**LPL; p:0.0008**), adiponectin ekspresyonu artmıştır. Osteojenik (**RUNX1; p: 0.0001**, **ALP; p: <0.0001**) farklılaşmaları anlamlı olarak azalmıştır.



Şekil 4.19 Besiyerine FBS eklentisi ile çoğaltılan ve adipojenik ve osteojenik farklılaşma uyarılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen adipojenik (solda) ve osteojenik (sağda) farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi

4.7.7. İnflamatuvar uyarım varlığında PL eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin farklılaşma gen ifadelerinin analizi:

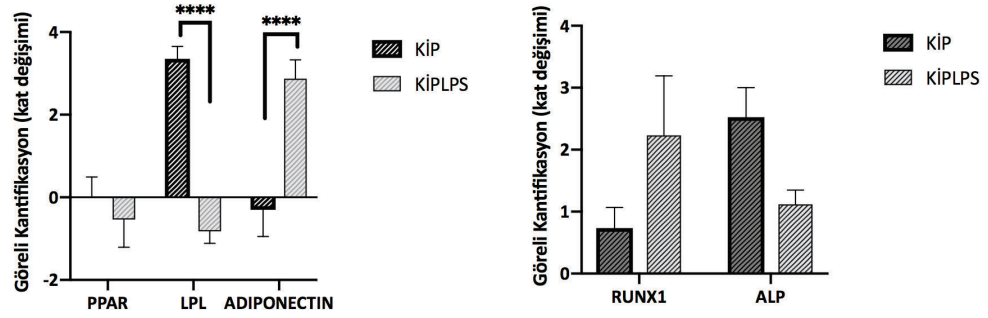
İnflamatuvar uyarım varlığında PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin de adipojenik (PPAR; p: 0,52, LPL; p: 0,42, Adiponectin; **p:<0.0001**) ve osteojenik (RUNX1; **p:0,02**, ALP; p:0,30) farklılaşmaları, inflamasyonsuz ortam ile kıyaslandığında genel olarak azalmış bulunmuş, bu sonuç adiponektin ve RUNX1 için istatistiksel anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.20 Besiyerine PL eklentisi ile çoğaltılan ve adipojenik ve osteojenik farklılaşma uyarılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen adipojenik (solda) ve osteojenik (sağda) farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi

4.7.8. İnflamatuvar uyarım varlığında KİP eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin farklılaşma genlerinin ifade analizi:

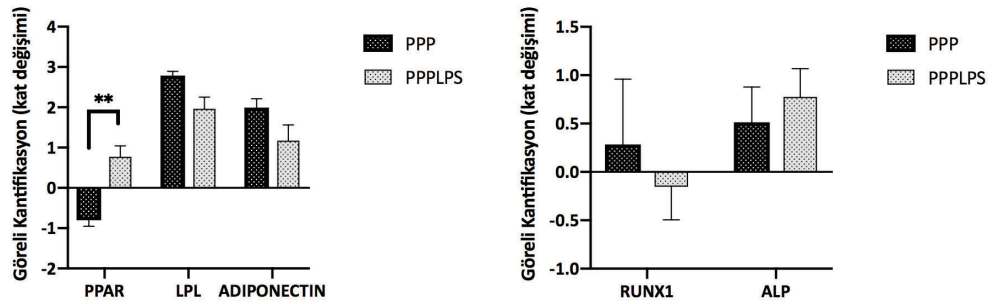
İnflamatuvar uyarım varlığında KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma gen ifadelerinde istatistiksel anlamlı değişiklikler saptanmıştır. Adipojenik PPAR ve LPL gen ifadelerinin azaldığı (LPL; **p: <0.0001**), Adiponectin ifadesinin arttığı (**p:<0.0001**) ve osteojenik RUNX1 ifadesinin artarken, ALP'ın azaldığı bulunmuştur.



Şekil 4.21 Besiyerine KİP eklentisi ile çoğaltılan ve adipojenik ve osteojenik farklılaşma uyarılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen adipojenik (solda) ve osteojenik (sağda) farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi

4.7.9. İnflamatuvar uyarım varlığında PPP eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin farklılaşma gen ifadelerinin analizi:

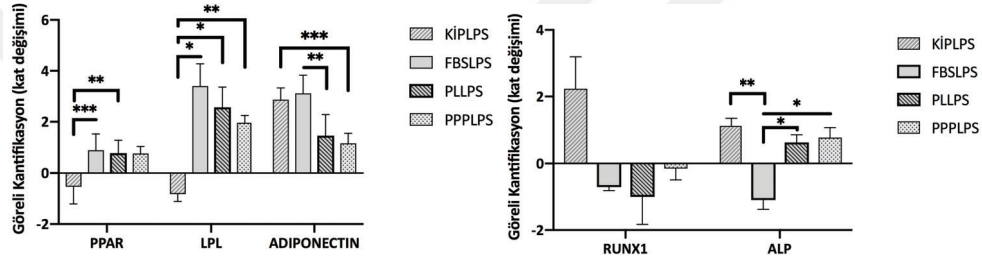
İnflamatuvar uyarım varlığında PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin adipojenik PPAR gen ifadesinin anlamlı arttığı ($p < 0.001$) ve LPL ve ALP gen ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Osteojenik RUNX1 ifadesi azalırken, ALP ifadesi ise artmıştır.



Şekil 4.22 Besiyerine PPP eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen farklılaşma genlerinin RT-PCR analizi

4.7.10. Farklı serum eklentileri (FBS, PL, KİP, PPP) ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin inflamatuvar ortam varlığında adipojenik ve osteojenik farklılaşma gen ifadelerinin toplu değerlendirilmesi:

Gen ifade değişimleri kontrol grubu olarak FBSLPS ile elde edilen değerlerle karşılaştırılarak verilmiştir. FBSLPS ile karşılaştırıldığında PPAR ve LPL gen ifadesi KİPLPS grubunda anlamlı azalmıştır (PPAR; $p < 0.001$ ve LPL; $p < 0.05$). Adiponectin gen ifadesi de PLLPS grubunda anlamlı azalmıştır ($p < 0.01$). Osteojenik genlerden ALP ifadesi KİPLPS ($p < 0.001$), PPPLPS ($p < 0.01$) ve PLLPS ($p < 0.05$) gruplarında FBSLPS grubuna göre anlamlı artmış olarak bulunmuştur (Şekil 4.23).



Şekil 4.23 İnfamatuvar ortam varlığında FBS, PL, KİP, PPP eklentisi ile çoğaltılan ve farklılaşma uyarılan MKH'lerin farklılaşma genlerinin RT-PCR analizinin toplu değerlendirilmesi

4.8. MKH'lerin Metabolik Karakterizasyonu

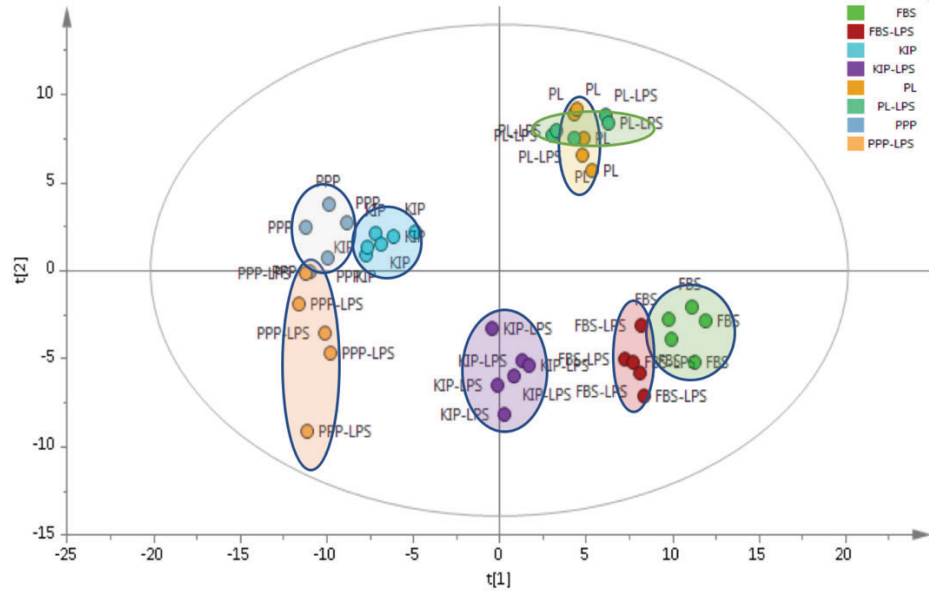
Çalışmamızın metabolomik testlerinde, akım sitometri yöntemi ile uygun kök hücre belirteçlerinin varlığı, adezyon ve farklılaşma özellikleri gösterilmiş olan P3 MKH'ler kullanılmıştır. Her grup için (FBS-MKH, PL-MKH, KİP-MKH, PPP-MKH, FBSLPS-MKH, PLLPS-MKH, KİPLPS-MKH, PPPLPS-MKH) aynı lot numaralı besiyerleri, L-glutamin ve antibiyotikler kullanılmıştır. Aynı donöre ait MKH'ler 6'şar tekrarlı olarak çoğaltılarak, aynı gün tripsin edilip P3'te kültürü sonlandırılmıştır. Eş zamanlı kültür besiyeri süpernatantları (conditioned medyum) toplanmış, santrifügasyon ile kontaminantlar çöktürülüp üstteki kısımdan 1'er mL'lik üç adet örnek -20 °C'de saklanmıştır. Ayrıca her grup besiyeri ve serum eklentisi örneğinden hazırlandıkları an

alınan 1'er mL'lik üç adet örnek -20 °C'de saklanmıştır. Tüm bu örneklerle metabolomik testleri uygulanmıştır.

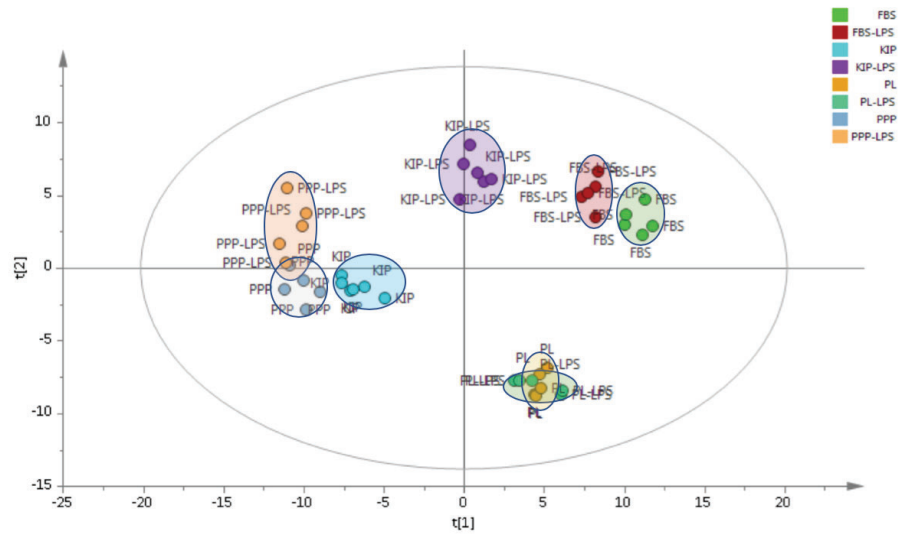
Metabolomik analizlerde heterojeniteye neden olabilecek bireysel etkileri azaltabilmek için aynı donörün örnekleri 6 tekrarlı olarak GC-MS ve LC- qTOF-MS ile analiz edilmiştir.

4.8.1. Hücre İçi Metabolitlerin Veri Analizleri:

Farklı koşullar altında ve inflamasyon varlığı/yokluğunda çoğaltılan MKH'ler için gerçekleştirilen tüm metabolomik (GC-MS ve LC-qTOF-MS) verileri çok değişkenli analizler ile incelenmiş, elde edilen metabolomik analizlerin sonucu bir arada değerlendirilerek değişen/farklılık gösteren metabolitler ve ilgili yollar belirlenmiştir. İlk önce PCA analizleri uygulanmış ve veri setlerinde herhangi bir sistemik hata veya aykırı bir veri olup olmadığını araştırılmıştır (Şekil 4.24). Aykırı değerler (PPP-LPS-5, FBS-LPS-1-5, PL-LPS-1-5, FBS-1-5, PL-1-5, PPP-1) verilerden uzaklaştırıldıktan sonra gruplara PLS-DA analizleri her bir değişken için bir arada ve ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.25). PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (projede önemli değişken) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.26, Şekil 4.27). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.



Şekil 4.24 Farklı serum eklentileri içeren besiyeri ortamında ve inflamatuvar uyarım varlığı/yokluğunda çoğaltılan MKH'lerin bütünleşik metabolomiks (GC-MS ve LC-qTOF-MS) verilerine ait PCA skor grafiği



Şekil 4.25 Farklı serum eklentileri içeren besiyeri ortamında ve inflamatuvar uyarım varlığı/yokluğunda çoğaltılan MKH'lerin bütünleşik metabolomiks (GC-MS ve LC-qTOF-MS) verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0.955 ve Q^2 :0.700).

Çalışmamızda 8 farklı koşulda besiyerleri (DMFBS, DMPL, DMKİP, DMPPP, DMFBSLPS, DMPLLPS, DMKİPLPS, DMPPPPLPS) ile çoğaltılan aynı vericiye ait MKH'lerin analizleri yapılmıştır. Analiz sonucunda yüklediğimiz veri setinde 479 metabolit anlamlı değişmiş, intrasellüler 242 metabolit tanımlanmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5 GC-MS ve LC_qTOF-MS analizleri ile tanımlanan intrasellüler metabolitler

	Intrasellüler Metabolit	Metabolit Kısaltması
1	(1aS,2Z,4E,14R,15aS)-8-Chloro-9,11-dihydroxy-14-methyl-1a,14,15,15a-tetrahydro-6H-oxireno[e][2] benzoxacyclotetradecine-6,12(7H)-dione	M1
2	(1S,4aS,5R,7S)-1-(beta-D-Glucopyranosyloxy)-4a,5-dihydroxy-7-methyl-1,4a,5,6,7,7a-hexahydrocyclopenta[c]pyran-7-yl(2Z)-3-(4-hydroxyphenyl)acrylate	M2
3	(2aS,5aR,7R,8aR)-6-Hydroxy-6-[2-(2-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydro-3-furanyl)ethyl]-2a,5a,7-trimethyldecahydro-2H-naphtho[1,8-bc]furan-2-one	M3
4	(2-hydroxy-3,6-diphenylcyclohexyl) acetate	M4
5	(2R,3S,4E,6E,8E,10E,12E,14R,15R,16R,18R,22S,24S,26S,27R)-14,16,18,22,24,26-Hexahydroxy-2,3,27-trimethyl-28-oxooxacyclooctacos-4,6,8,10,12-pentaene-15-carboxylic acid	M5
6	(2S)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-9-[[2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one	M6
7	(3R,5R,6S,7S,9R,11E,13S,14R)-14-Ethyl-13-hydroxy-3,5,7,9,13-pentamethyl-2,4,10-trioxooxacyclotetradec-11-en-6-yl 3,4,6-trideoxy-3-(dimethylamino)-D-xylo-hexopyranoside	M7
8	(4E,8E,10E-d18:3)sphingosine	M8
9	(5R,5aR,8aR,9R)-5-hydroxy-9-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-5a,6,8a,9-tetrahydro-5H-[2]benzofuro[5,6-f][1,3]benzodioxol-8-one	M9
10	(5xi,6alpha,7beta)-6,11,12-Trihydroxy-7,20-epoxyabieta-8,11,13-trien-20-one	M10
11	[(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate	M11
12	[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,5-dihydroxy-2-[[5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-2,3-dihydrochromen-7-yl]oxy]-6-(hydroxymethyl)oxan-4-yl](E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate	M12
13	[(2S,3R,4S,5S,6R)-2-[[3S,4R,4aR)-4-ethenyl-4a-hydroxy-8-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrano[3,4-c]pyran-3-yl]oxy]-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-3-yl] 2,4-dihydroxy-6-(3-hydroxyphenyl)benzoate	M13
14	[(2S,3S,4S,5R,6S)-6-[5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxochromen-3-yl]oxy-5-hydroxy-4-[(E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy-2-methyl-oxan-3-yl] (E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate	M14
15	[4,5-dihydroxy-3,4-bis(hydroxymethyl)-4a,8,8-trimethyl-5,6,7,8a-tetrahydro-1H-naphthalen-1-yl] octanoate	M15
16	1-(2,4-dihydroxy-6-methoxy-3,5-dimethylphenyl)-3-phenylpropan-1-one	M16
17	1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(5-methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)prop-2-en-1-one	M17

	Intrasellüler Metabolit	Metabolit Kısaltması
18	1,12-dihydroxy-1,6,12,17,23,28-hexazacyclotritriacontane-2,5,13,16,24,27-hexone	M18
19	1,6,8-trihydroxy-3-methyl-9,10-dioxoanthracene-2-carboxylic acid	M19
20	1-[(Z)-but-2-en-2-yl]-3,9-dihydroxy-4,7-dimethyl-6-oxobenzo[b][1,4]benzodioxepine-2-carboxylic acid	M20
21	10-hydroxydecanoic acid	M21
22	12-Ketodeoxycholic acid	M22
23	13-HDoHE	M23
24	15(16)-EpODE	M24
25	15(R)-hydroperoxy-EPE	M25
26	15-methylhexadecasping-4-enine(1+)	M26
27	1-deoxytetradecaspinganine	M27
28	1-hexadecanol	M28
29	1-hydroxypyrene	M29
30	1-Piperidinecarboxaldehyde	M30
31	1-tetradecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine	M31
32	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3,6-dimethoxy-4H-chromen-4-one	M32
33	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	M33
34	2-amino-1-phenylethanol	M34
35	2-butyne-1,4-diol	M35
36	2-Carboxybenzaldehyde	M36
37	2-Chloro-N6-cyclopentyladenosine	M37
38	2-Ethyl-2,5-dihydro-4,5-dimethylthiazole	M38
39	2-Hydroxy-4-methylpentanoic acid	M39
40	2-ketobutyric acid	M40
41	2-ketoisocaproic acid 2	M41
42	2-keto-l-gulonic acid 2	M42
43	2-Phenylethanol glucuronide	M43
44	3-(2-hydroxyphenyl)propanoic acid	M44
45	3,4,5-trihydroxy-6-[(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-6-yl)oxy]oxane-2-carboxylic acid	M45
46	3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	M46
47	3,5-dibromo-2-(3,5-dibromo-2-methoxyphenoxy)phenol	M47
48	3,9-dihydroxy-1,4,7,10-tetramethylbenzo[b][1,4]benzodioxepin-6-one	M48
49	3-Guanidinopropionic acid	M49
50	3-Hydroxyglutaric acid	M50
51	3-Indoleacetonitrile	M51
52	3-methyl-2-oxobutanoic acid	M52
53	3-Methylxanthine	M53
54	4-[(E)-3-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3-[(2S,3R,4R)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybut-1-enyl]-3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-one	M54
55	4-Aminophenol	M55
56	4-Hexylresorcinol	M56
57	4-hydroxy-proline	M57
58	4-isopropylbenzoic acid	M58
59	5(S)-5-carboxystrictosidine	M59

	Intrasellüler Metabolit	Metabolit Kısaltması
60	5,9,10-trihydroxy-2,2-dimethyl-12-(2-methylbut-3-en-2-yl)pyrano[3,2-b]xanthen-6-one	M60
61	5-[6-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1,3,3a,4,6,6a-hexahydrofuro[3,4-c]furan-3-yl]-2-methoxyphenol	M61
62	5-chloro-2,4-dihydroxy-3-[(E)-4-hydroxy-3-methyl-5-(1,2,6-trimethyl-3-oxocyclohexyl)pent-2-enyl]-6-methylbenzaldehyde	M62
63	5-hydroperoxy-7-[3,5-epidioxy-2-(2-octenyl)-cyclopentyl]-6-heptenoic acid	M63
64	5-hydroxy-6,8-dimethoxy-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-2-one	M64
65	5-Hydroxymethyluridine	M65
66	5-Hydroxytryptophol	M66
67	5'-Methylthioadenosine	M67
68	5S-HETE di-endoperoxide	M68
69	6-Aminoindazole	M69
70	6-deoxyglucose	M70
71	6-hydroxy-8-(7-hydroxy-2-oxochromen-8-yl)-7-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-2-one	M71
72	7-Nonene-3,5-diyn-1-ol	M72
73	8-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyl)-7-methoxychromen-2-one	M73
74	9(10)-EpODE	M74
75	Adenine	M75
76	Alanine	M76
77	Allothreonine	M77
78	Alpha ketoglutaric acid	M78
79	Alpha-D-glucosamine phosphate	M79
80	Apigenin-8-C-glucoside	M80
81	Arachidic acid	M81
82	Arachidonic acid	M82
83	Arginyl-Asparagine	M83
84	Aspartic acid	M84
85	Benzamidine	M85
86	Benzoic acid	M86
87	Beta- alanine	M87
88	Beta-glycerolphosphate	M88
89	C17 Sphinganine	M89
90	Capric acid	M90
91	Cholesterol	M91
92	Citraconic acid	M92
93	Citramalic acid	M93
94	Citric acid	M94
95	Creatinine	M95
96	D-allose	M96
97	Dehydroascorbic acid	M97
98	Dehydrophytosphingosine	M98
99	Dihydrotestosterone	M99
100	Dihydroxyacetone phosphate	M100
101	D-Sedoheptulose 7-phosphate	M101
102	Epsilon-caprolactam	M102

	Intrasellüler Metabolit	Metabolit Kısaltması
103	E-Resveratrol trimethyl ether	M103
104	FA 16:3	M104
105	FA 18:3	M105
106	Feruloyl quinic acid	M106
107	Fucose	M107
108	Fumaric acid	M108
109	Gluconic acid	M109
110	Glucosaminat	M110
111	Glucosaminic acid	M111
112	Glucose	M112
113	Glucose-6-phosphoric acid	M113
114	Glucuronic acid	M114
115	Glutamic acid	M115
116	Glutathione	M116
117	Glyceraldehyde	M117
118	Glyceric acid	M118
119	Glycerol 1-phosphate	M119
120	Glycerol tripropanoate	M120
121	Glycine	M121
122	Glycolic acid	M122
123	Guanosine	M123
124	Heptadecanoic acid	M124
125	hexadecasphinganine(1+)	M125
126	Homoserine	M126
127	Hydroquinone	M127
128	Hydroxygardnutine	M128
129	Hydroxyvalerylcarnitine	M129
130	hydroxyvalerylglycine	M130
131	Hypotaurine	M131
132	Indole-3-acetyl-L-glutamic acid	M132
133	Indole-3-acetyl-L-tryptophan	M133
134	Indoleacrylic acid	M134
135	Isocitric acid	M135
136	Iso-gamma-fagarine	M136
137	Isoleucine	M137
138	Itaconic acid	M138
139	L-Acetylcarnitine	M139
140	Lactamide	M140
141	Lactic acid	M141
142	Lauric acid	M142
143	L-beta-Homoserine	M143
144	Leucine	M144
145	Linoleic acid	M145
146	Lipoic acid	M146
147	Lysine	M147
148	LysoPC(16:0)	M148
149	LysoPC(18:0)	M149
150	LysoPC(18:1(11Z))	M150
151	LysoPC(18:1(9Z))	M151

	Intrasellüler Metabolit	Metabolit Kısaltması
152	LysoPC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	M152
153	LysoPE(0:0/18:1(11Z))	M153
154	LysoPE(0:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	M154
155	LysoPE(0:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	M155
156	LysoPE(0:0/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z))	M156
157	LysoPE(16:0/0:0)	M157
158	LysoPE(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)	M158
159	Lyxose	M159
160	Maleic acid	M160
161	Malic acid	M161
162	Mannitol	M162
163	Mannose	M163
164	Methionine	M164
165	Methionyl-Methionine	M165
166	methyl4-(6,8-dihydroxy-3-methyl-1-oxoisochromen-7-yl)-2,4-dimethoxybutanoate	M166
167	Methyl oleate	M167
168	MG(0:0/16:0/0:0)	M168
169	MG(0:0/18:1(9Z)/0:0)	M169
170	Mimosine	M170
171	Myo-inositol	M171
172	Myricetin	M172
173	Myristic acid d27	M173
174	N,N-Dimethyl-N'-phenylsulfamide	M174
175	N-acetyl-d-mannosamine	M175
176	N-acetyl-l-glutamic acid	M176
177	NCGC00385643-01_C20H30O3_1-Phenanthrenecarboxylic acid, 7-ethenyl-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,9,10,10a-dodecahydro-9-hydroxy-1,4a,7-trimethyl-	M177
178	N-ethylglycine	M178
179	N-oleoylthreonine	M179
180	Octopine	M180
181	Oleamide	M181
182	Oleic acid	M182
183	Oleoyl glycine	M183
184	O-phosphocolamine	M184
185	Oxalic acid	M185
186	Palmitic acid	M186
187	Palmitoleic acid	M187
188	Pantothenic acid	M188
189	PC(16:0/13-HODE)	M189
190	PC(16:1/13-HODE)	M190
191	p-Coumaraldehyde	M191
192	PE(18:0/11,12-EpETE)	M192
193	PE(19:0/0:0)	M193
194	Phenelzine	M194
195	PHENYLACETIC ACID	M195
196	Phenylalanine	M196
197	Phosphatidylcholine 15	M197

	İntrasellüler Metabolit	Metabolit Kısaltması
198	Phosphatidylcholine 16	M198
199	Phosphatidylcholine alkyl 16	M199
200	Phosphatidylethanolamine 16	M200
201	Phosphatidylethanolamine 18	M201
202	Phosphatidylethanolamine alkyl 18	M202
203	Phosphatidylethanolamine lyso alkenyl 18	M203
204	Phosphoenolpyruvic acid	M204
205	Phosphoric acid	M205
206	Phytosphingosine	M206
207	Porphine	M207
208	Proline	M208
209	Putrescine	M209
210	Pyridoxine	M210
211	Pyroglutamic acid	M211
212	Pyroglutamyl-Isoleucine	M212
213	Pyruvic acid	M213
214	quinoxaline-2-carboxylic acid	M214
215	Ribitol	M215
216	Ribose	M216
217	Sarcosine	M217
218	Secoisolariciresinol diglucoside	M218
219	Sedoheptulose	M219
220	Serine	M220
221	S-HEXYL-GLUTATHIONE	M221
222	Sorbitol-6-phosphate	M222
223	Sorbose	M223
224	Sphinganine	M224
225	Sphingosine	M225
226	Stearic acid	M226
227	Stearoylcarnitine	M227
228	Succinic acid	M228
229	Sucrose	M229
230	Tagatose	M230
231	Talose	M231
232	Threitol	M232
233	Threonine	M233
234	Trans-aconitic acid	M234
235	Tryptophan	M235
236	Tryptophyl-Lysine	M236
237	Tyrosine	M237
238	Uracil	M238
239	Urea	M239
240	Valerylcarnitine	M240
241	Valine	M241
242	Xylitol	M242

Tablo 4.6 Farklı besiyeri eklentileri ve inflamatuvar uyarım varlığında ve yokluğunda MKH'lerin metabolomik analizler sonucunda elde edilen intrasellüler metabolitler ve bağlı derişimleri.*

Metabolit Kısaltması	FBS-MKH	PL-MKH	KİP-MKH	PPP-MKH	FBSLPS-MKH	PLLPS-MKH	KİPLPS-MKH	PPPLPS-MKH
M 1	1.42±0.19	1.35±0.06	1.01±0.11	1.22±0.36	0.97±0.11	1.5±0.12	1.19±0.1	0.07±0.02
M 2	2.24±0.55	1.43±0.14	0.59±0.17	0.86±0.34	0.96±0.12	1.62±0.29	0.84±0.2	0.06±0.02
M 3	4.69±0.48	0.95±0.05	0.15±0.02	0.03±0	2.3±0.26	0.69±0.11	0.13±0.01	0.02±0
M 4	2.5±0.73	1.74±0.23	0.77±0.21	0.69±0.22	1.64±0.28	1.71±0.3	0.68±0.16	0.51±0.12
M 5	1.64±0.37	1.52±0.18	1.14±0.28	1.1±0.36	1.99±0.63	1.14±0.3	0.63±0.16	0.44±0.08
M 6	1.69±0.24	2.01±0.18	1±0.09	0.98±0.2	1.21±0.1	1.74±0.19	0.85±0.11	0.78±0.04
M 7	1.24±0.09	0.81±0.04	0.97±0.1	0.21±0.09	1.6±0.05	0.68±0.07	1.2±0.06	0±0
M 8	1.75±0.22	1.32±0.38	0.65±0.15	0.62±0.1	1.21±0.35	1.22±0.19	0.57±0.11	0.99±0.23
M 9	2.75±0.38	1.25±0.1	0.86±0.09	0.87±0.17	1.81±0.2	1.37±0.25	0.64±0.05	0.66±0.08
M 10	0.03±0.01	2.66±0.1	0.19±0.01	0.22±0.09	0.03±0	2.66±0.06	0.17±0.02	0.02±0.01
M 11	1.4±0.1	1.55±0.09	1.2±0.13	1.15±0.34	1.09±0.07	1.68±0.07	1.18±0.1	0.03±0.01
M 12	1.65±0.38	1.34±0.13	0.43±0.15	0.8±0.26	0.84±0.12	1.33±0.27	0.71±0.16	1.7±0.74
M 13	0.64±0.26	0.51±0.11	0.09±0.05	0.22±0.11	0.47±0.12	0.7±0.14	0.16±0.05	4.68±2.27
M 14	0.66±0.38	0.82±0.27	0.98±0.29	1.53±0.48	0.07±0.05	1.85±0.43	1.77±0.31	0.12±0.03
M 15	0.45±0.12	0.66±0.15	0.29±0.05	0.87±0.22	0.6±0.13	2.05±1.03	0.33±0.06	3.14±2.55
M 16	0.33±0.07	0.34±0.08	0.66±0.09	1.9±0.67	0.31±0.1	0.53±0.09	2.42±0.82	3.17±0.72
M 17	2.96±0.72	1.45±0.21	0.19±0.02	0.07±0.01	1.81±0.41	1.23±0.15	0.16±0.03	0.06±0.01
M 18	0.45±0.18	1±0.06	1.54±0.06	0.09±0.08	0.66±0.09	1.14±0.08	1.69±0.05	0.02±0.01
M 19	0.01±0.01	0.06±0.03	1.97±0.44	1.44±0.23	0.05±0.02	0.13±0.07	2.38±0.43	2.69±0.53
M 20	1.97±0.33	1.56±0.05	0.98±0.2	0.67±0.18	1.45±0.11	1.41±0.09	0.99±0.12	0.16±0.04
M 21	1.62±0.2	1.12±0.22	0.19±0.06	0.52±0.38	1.45±0.15	0.72±0.07	1.01±0.12	1.04±0.43
M 22	0±0	0±0	1.29±0.31	3.74±1.55	0±0	0±0	1.3±0.13	1.4±0.36
M 23	1.52±0.35	1.49±0.4	0.97±0.19	0.52±0.12	0.68±0.18	1.3±0.18	0.82±0.26	0.53±0.14
M 24	0.5±0.34	4.05±0.51	0.35±0.06	0.21±0.08	0.97±0.24	3.38±0.39	0.43±0.08	0.29±0.04

Metabolit Kislaltması	FBS-MKH	PL-MKH	KİP-MKH	PPP-MKH	FBSLPS-MKH	PLLPS-MKH	KİPLPS-MKH	PPPLPS-MKH
M 25	2.73±0.27	2.01±0.23	0.55±0.09	0.67±0.15	0.98±0.12	1.46±0.23	0.74±0.14	0.57±0.1
M 26	0.08±0.07	0.24±0.17	1.32±0.34	0.38±0.26	0.18±0.09	0.46±0.25	1.41±0.52	1.3±0.7
M 27	1.13±0.1	1.25±0.24	1.03±0.12	0.99±0.09	1.12±0.12	0.92±0.11	1.04±0.16	1.17±0.21
M 28	1.75±0.42	1.39±0.12	0.58±0.13	0.91±0.17	1.44±0.15	1.15±0.18	0.89±0.11	1±0.2
M 29	0.7±0.07	0.65±0.05	2.23±0.13	2.32±0.68	0.45±0.07	0.68±0.12	1.78±0.11	0.16±0.04
M 30	0.95±0.41	1.75±0.42	0.69±0.19	0.52±0.18	1.02±0.69	1.84±0.49	0.41±0.11	0.6±0.2
M 31	0.55±0.13	1.63±0.34	0.73±0.22	0.72±0.09	0.71±0.15	2.3±0.71	1±0.3	0.91±0.25
M 32	1.52±0.13	1.25±0.05	0.89±0.12	1.94±0.65	0.96±0.06	1.35±0.12	1.06±0.1	0.02±0.01
M 33	0.54±0.09	1.08±0.06	1.47±0.04	2.63±0.69	0.68±0.11	1.07±0.03	1.25±0.07	0.12±0.03
M 34	0.3±0.15	0.3±0.12	0.93±0.26	0.83±0.14	0.46±0.08	0.23±0.04	0.85±0.13	1.33±0.33
M 35	0.93±0.03	1.22±0.08	0.93±0.03	1.07±0.06	0.71±0.11	1.19±0.04	0.83±0.03	0.95±0.03
M 36	1.96±0.11	1.09±0.09	1.23±0.03	0.46±0.19	1.27±0.13	1.21±0.09	0.95±0.11	1.22±0.99
M 37	1.76±0.41	1.45±0.07	1.1±0.17	0.98±0.31	1.07±0.09	1.38±0.05	1.11±0.14	0.05±0.01
M 38	2.38±0.59	1.62±0.59	1.19±0.21	0.76±0.21	1.33±0.4	1.21±0.22	0.55±0.1	0.73±0.13
M 39	1.08±0.03	0.68±0.03	0.49±0.05	0.69±0.21	0.59±0.02	0.64±0.04	0.46±0.05	0.65±0.27
M 40	1.45±0.03	1.01±0.04	0.6±0.03	0.44±0.05	1.38±0.03	1.25±0.05	1.17±0.04	0.49±0.06
M 41	0.59±0.14	1.64±0.29	1.37±0.16	0.34±0.03	0.79±0.09	2.2±0.4	0.43±0.1	0.17±0.02
M 42	0.7±0.07	0.76±0.23	0.47±0.14	1.06±0.39	1.22±0.19	0.21±0.06	0.43±0.04	4.62±2.24
M 43	2.28±0.59	1.91±0.68	0.67±0.11	0.5±0.12	1.92±0.15	0.9±0.2	0.69±0.2	0.65±0.21
M 44	0.09±0.02	4.81±1.4	0.17±0.02	0.19±0.02	0.12±0.02	3.15±0.58	0.13±0.02	0.25±0.03
M 45	2.56±0.44	1.93±0.33	0.89±0.33	0.51±0.17	1.33±0.15	1.32±0.21	0.78±0.23	0.62±0.22
M 46	0.82±0.14	2.66±0.45	0.66±0.15	1.41±0.37	0.56±0.06	1.97±0.1	0.5±0.08	0.84±0.57
M 47	0±0	1.03±0.22	2.16±0.09	1.96±0.59	0.16±0.13	1.63±0.07	1.66±0.12	0.01±0
M 48	3.59±0.37	1.42±0.28	0.53±0.17	0.24±0.12	1.53±0.19	1.86±0.12	0.23±0.07	0.21±0.05
M 49	1.5±0.21	1.18±0.06	0.87±0.12	1.62±0.54	1.07±0.05	1.07±0.07	0.94±0.08	0.05±0.01
M 50	0.93±0.05	1.79±0.05	0.5±0.03	0.36±0.13	0.59±0.02	1.76±0.08	0.46±0.01	0.03±0.01

Metabolit Kislaltması	FBS-MKH	PL-MKH	KİP-MKH	PPP-MKH	FBSLPS-MKH	PLLPS-MKH	KİPLPS-MKH	PPPLPS-MKH
M 51	1.03±0.14	1.17±0.05	1.72±0.04	1.64±0.49	0.99±0.02	1.08±0.09	1.35±0.06	0.11±0.03
M 52	0.91±0.05	1.02±0.08	1.02±0.05	1.32±0.14	0.93±0.04	1.15±0.09	0.95±0.03	1.05±0.1
M 53	0.22±0.03	1.59±0.15	0.1±0.01	0.19±0.05	0.16±0.03	1.88±0.44	0.13±0.01	0.29±0.12
M 54	0.1±0.06	1.07±0.37	0.02±0.01	0±0	0.31±0.16	1.43±0.43	0±0	0±0
M 55	0.62±0.11	1.84±0.12	0.06±0.04	0.19±0.09	0.27±0.05	2±0.42	0.08±0.06	0.43±0.12
M 56	0.48±0.06	0.64±0.04	1.16±0.12	0.69±0.2	0.91±0.18	0.89±0.19	1.06±0.13	0.1±0.03
M 57	1.54±0.06	0.75±0.05	1.02±0.06	0.8±0.03	1.49±0.04	0.86±0.02	1.36±0.02	0.7±0.03
M 58	1.52±0.07	1.51±0.1	0.53±0.21	1.5±0.37	1.57±0.06	0.81±0.26	1.42±0.06	1.08±0.27
M 59	2.14±0.38	0.57±0.14	1.01±0.09	1.14±0.27	1.19±0.3	0.73±0.15	1.13±0.28	1.19±0.25
M 60	2.2±0.1	2.1±0.12	0.4±0.12	0.36±0.11	1.64±0.09	2.19±0.07	0.41±0.09	0.09±0.02
M 61	1.95±0.76	1.16±0.15	1.18±0.24	1.16±0.25	0.95±0.17	1.47±0.49	1.06±0.14	1.28±0.11
M 62	0±0	0±0	0.15±0.01	0.11±0.03	0±0	0.01±0	0.12±0.01	0.01±0
M 63	0.8±0.46	1.01±0.43	2.42±1.79	0.33±0.1	0.98±0.21	0.66±0.28	0.26±0.11	0.16±0.09
M 64	1.86±0.2	0.59±0.06	0.72±0.04	0.33±0.08	1.2±0.08	0.71±0.07	0.72±0.03	0.13±0.03
M 65	3.37±0.22	0.38±0.1	0.09±0.04	0.2±0.11	2.81±0.14	0.48±0.06	0.19±0.09	0.25±0.07
M 66	0.7±0.38	0.42±0.14	0.87±0.28	1.7±0.49	0.3±0.11	0.8±0.22	1.51±0.5	3.63±1.74
M 67	0.07±0.01	0.04±0	0.29±0.23	0.02±0	0.04±0.01	0.04±0	0.02±0	0.02±0
M 68	0.01±0	0.14±0.08	0.41±0.17	0.05±0.03	0.06±0.03	1.14±0.89	0.05±0.03	0.01±0
M 69	0.97±0.08	0.83±0.06	0.96±0.03	0.55±0.14	0.64±0.05	0.79±0.03	0.85±0.03	2.04±1.07
M 70	1.37±0.07	1.23±0.09	1.05±0.16	0.77±0.3	1.84±0.18	1.11±0.14	0.94±0.24	0.69±0.25
M 71	1.51±0.29	1.51±0.22	1.1±0.21	1.98±1.02	1±0.1	1.56±0.24	0.48±0.19	0.09±0.03
M 72	1.42±0.19	2.04±0.43	1.07±0.32	1.94±0.46	0.75±0.2	1.42±0.38	1.08±0.24	1.52±0.41
M 73	2.21±0.49	2.2±0.6	1.09±0.21	1.33±0.34	1.1±0.33	1.47±0.33	0.8±0.2	0.81±0.2
M 74	0±0	4.75±0.57	0.25±0.06	0.23±0.07	0.2±0.09	4.01±0.43	0.26±0.03	0.35±0.07
M 75	0.82±0.37	1.57±0.38	0.57±0.15	0.51±0.19	1.21±0.42	1.26±0.24	0.48±0.1	0.76±0.26
M 76	1.62±0.04	1.03±0.03	0.46±0.02	0.17±0	1.61±0.04	1.47±0.16	1.42±0.03	0.17±0.01

Metabolit Kislaltması	FBS-MKH	PL-MKH	KİP-MKH	PPP-MKH	FBSLPS-MKH	PLLPS-MKH	KİPLPS-MKH	PPPLPS-MKH
M 77	0.92±0.05	1.09±0.07	1.16±0.07	1.12±0.04	0.9±0.05	1.1±0.03	1.08±0.03	0.99±0.06
M 78	0.55±0.02	0.44±0.04	0.28±0.04	0.29±0.04	0.75±0.02	1.03±0.25	3.02±0.11	0.46±0.11
M 79	0.78±0.09	1.95±0.13	0.6±0.05	0.28±0.09	0.77±0.07	2.35±0.34	1.08±0.02	0.22±0.04
M 80	1.56±0.18	1.18±0.15	0.83±0.08	0.79±0.09	1.12±0.16	1.3±0.07	0.75±0.05	1.23±0.31
M 81	2.24±0.25	1.64±0.12	0.44±0.36	0.36±0.3	2.54±0.17	0.79±0.32	1.49±0.22	0.97±0.38
M 82	2.05±0.23	1.67±0.07	0.82±0.06	1.08±0.17	1.21±0.14	1.46±0.12	0.88±0.09	0.82±0.12
M 83	3.14±0.72	1.46±0.84	0.97±0.43	0.01±0	0.58±0.48	0.44±0.26	0.37±0.21	0.44±0.26
M 84	1.25±0.17	0.74±0.12	0.48±0.12	0.54±0.12	1.16±0.05	0.98±0.13	1.19±0.09	0.66±0.05
M 85	2.41±0.14	1.58±0.14	0.65±0.08	0.6±0.14	1.24±0.11	1.75±0.26	0.69±0.11	0.59±0.06
M 86	1.1±0.12	1.25±0.14	0.43±0.05	0.57±0.04	0.99±0.06	1.35±0.11	0.96±0.09	0.65±0.12
M 87	0.49±0.01	1.15±0.3	1.3±0.51	0.68±0.11	0.58±0.02	2.55±0.17	1.03±0.03	0.18±0.08
M 88	1.26±0.06	1.13±0.08	0.96±0.15	0.71±0.28	1.69±0.17	1.02±0.13	1.28±0.02	0.63±0.23
M 89	0.14±0.02	0.34±0.07	1.59±0.12	0.96±0.13	0.89±0.16	0.36±0.06	1.13±0.26	0.92±0.23
M 90	0.76±0.03	0.9±0.06	1.27±0.08	1.19±0.06	0.78±0.02	0.99±0.03	1.12±0.03	1.15±0.05
M 91	2±0.23	1.82±0.19	0.39±0.04	0.49±0.05	2.31±0.14	1.38±0.22	1±0.09	0.41±0.08
M 92	0.91±0.07	0.5±0.02	0.66±0.04	0.4±0.05	1.24±0.09	0.93±0.1	1.66±0.1	0.5±0.03
M 93	1.01±0.08	1.03±0.11	1.19±0.09	1.2±0.07	0.95±0.06	0.88±0.13	0.64±0.02	1.22±0.12
M 94	0.05±0.01	0.89±0.24	1.48±0.22	1.6±0.16	0.07±0.01	1.17±0.2	0.1±0.01	1.59±0.15
M 95	1.58±0.06	1.41±0.1	0.29±0.02	0.07±0	1.52±0.03	1.32±0.05	1.45±0.06	0.05±0
M 96	0.99±0.08	0.65±0.15	1.01±0.06	1.22±0.02	1.05±0.05	0.67±0.12	1.03±0.03	1.27±0.08
M 97	0.89±0.12	1.28±0.28	0.43±0.04	0.43±0.06	0.86±0.08	0.87±0.18	1.29±0.14	0.53±0.06
M 98	0.01±0	0.01±0.01	1.97±0.45	0.62±0.07	0.12±0.08	0±0	2.52±0.78	4.46±2.39
M 99	0.9±0.54	1.94±0.44	0.85±0.14	0.63±0.05	2.23±0.34	1.04±0.2	0.73±0.15	0.74±0.17
M 100	0.73±0.11	1.06±0.27	0.57±0.05	0.45±0.05	0.76±0.06	0.97±0.12	2.24±0.39	0.43±0.05
M 101	1.12±0.16	2.39±0.54	0.5±0.06	0.51±0.11	2.08±0.51	2.51±1.04	0.36±0.02	0.39±0.09
M 102	1.26±0.22	1.28±0.09	0.71±0.12	1.31±0.11	1.21±0.14	1.37±0.14	0.92±0.05	0.97±0.14

Metabolit Kislaltması	FBS-MKH	PL-MKH	KİP-MKH	PPP-MKH	FBSLPS-MKH	PLLPS-MKH	KİPLPS-MKH	PPPLPS-MKH
M 103	0±0	0.06±0.03	1.63±0.16	1.73±0.3	0.01±0.01	0±0	1.9±0.4	4.32±1.47
M 104	0.95±0.04	1.09±0.04	1.62±0.05	1.28±0.54	0.87±0.03	1.14±0.03	1.34±0.08	0.01±0
M 105	1.12±0.08	1.13±0.12	1.24±0.12	1.93±0.69	1.22±0.19	1.31±0.14	1.05±0.11	0.04±0.01
M 106	1.69±0.34	1.31±0.06	1.12±0.16	1.06±0.3	1.2±0.1	1.45±0.19	1.14±0.13	0.01±0
M 107	1.77±0.15	0.69±0.21	0.35±0.06	0.28±0.03	1.8±0.13	1.12±0.25	1.78±0.1	0.24±0.02
M 108	1.16±0.04	0.74±0.09	0.27±0.02	0.14±0.01	1.5±0.03	0.92±0.15	2.42±0.06	0.1±0.01
M 109	0.6±0.1	0.48±0.03	1.12±0.09	0.71±0.06	0.65±0.06	1.42±0.28	1.07±0.28	0.57±0.07
M 110	1.26±0.31	1.03±0.15	0.57±0.08	1.1±0.4	0.76±0.07	0.9±0.1	0.57±0.08	3.78±1.22
M 111	0.75±0.05	0.18±0.03	0.7±0.15	1.73±0.82	0.85±0.03	0.18±0.02	0.65±0.06	4.67±1.9
M 112	1.44±0.11	0.22±0.02	0.06±0.02	0.1±0.01	1.36±0.08	1.04±0.51	1.22±0.08	0.07±0.02
M 113	2.33±0.31	2.29±0.2	0.14±0.11	0.06±0.03	2.11±0.35	2±1.15	1.24±0.3	0.06±0.02
M 114	1.22±0.14	1.13±0.12	0.61±0.31	0.9±0.38	1.31±0.09	1.16±0.44	1.08±0.16	2.95±2.27
M 115	1.28±0.16	1.13±0.07	0.46±0.04	0.06±0	1.3±0.11	1.45±0.05	1.81±0.07	0.04±0
M 116	4.52±0.6	1.8±0.07	0.14±0.02	0.03±0	2.53±0.29	1.45±0.13	0.12±0.02	0.01±0
M 117	1.06±0.2	0.73±0.15	0.8±0.08	0.79±0.04	1.25±0.06	1.04±0.06	1.34±0.03	0.65±0.12
M 118	0.66±0.06	0.86±0.06	1.23±0.1	1.4±0.06	0.67±0.04	1.16±0.02	1.03±0.07	1.28±0.11
M 119	0.68±0.03	2.25±0.06	0.46±0.03	0.26±0.02	0.78±0.03	2.12±0.38	1.75±0.06	0.3±0.02
M 120	1.29±0.29	1.73±0.27	1.53±0.32	0.52±0.24	1.11±0.21	2.56±0.56	0.52±0.09	0.86±0.28
M 121	1.21±0.12	0.84±0.03	0.68±0.03	0.31±0.01	1.28±0.06	1.07±0.09	1.94±0.06	0.28±0.03
M 122	1.23±0.13	1.18±0.16	0.28±0.03	0.2±0.02	1.25±0.04	1.29±0.1	1.49±0.15	0.21±0.01
M 123	1.19±0.1	0.75±0.15	1.47±0.09	0.99±0.16	0.84±0.1	1.49±0.53	1.22±0.13	0.91±0.11
M 124	1.44±0.1	1.1±0.07	0.98±0.09	1.02±0.05	1.58±0.1	0.98±0.1	1.08±0.05	1.06±0.08
M 125	0.82±0.11	1.22±0.28	0.81±0.08	0.67±0.07	1.1±0.13	0.77±0.22	0.79±0.18	0.9±0.21
M 126	0.4±0.04	0.5±0.05	0.81±0.04	0.96±0.09	0.42±0.05	1.63±0.49	0.62±0.21	0.69±0.14
M 127	1.13±0.05	1.5±0.08	0.97±0.06	0.79±0.04	0.96±0.03	1.44±0.07	1.05±0.03	0.63±0.04
M 128	1.27±0.38	1±0.47	0.69±0.35	0.99±0.24	0.88±0.3	0.65±0.28	0.74±0.15	0.99±0.33

Metabolit Kislaltması	FBS-MKH	PL-MKH	KİP-MKH	PPP-MKH	FBSLPS-MKH	PLLPS-MKH	KİPLPS-MKH	PPPLPS-MKH
M 129	3.82±0.71	1.25±0.18	0.34±0.07	0.09±0.03	3.84±1.29	1.03±0.23	0.53±0.11	0.07±0.02
M 130	2.27±0.08	2±0.15	0.79±0.08	0.8±0.16	1.36±0.11	1.87±0.1	0.71±0.1	0.7±0.04
M 131	0.42±0.07	0.42±0.07	0.12±0.02	0.1±0.01	0.69±0.05	0.69±0.06	4.57±0.15	0.1±0.01
M 132	4.38±1.22	2.57±0.74	0.25±0.16	0.01±0	0.66±0.34	2.17±0.46	0.01±0	0.01±0
M 133	4.62±1.58	2.45±2.15	0.64±0.17	0.5±0.13	0.44±0.17	1.32±0.63	0.41±0.08	0.42±0.1
M 134	2.55±0.14	1.69±0.15	0.61±0.07	0.52±0.1	1.25±0.12	1.62±0.21	0.62±0.1	0.5±0.04
M 135	0.05±0.01	1.42±0.46	1.49±0.33	0.64±0.09	0.04±0.01	1.33±0.3	0.06±0.01	0.71±0.16
M 136	3.31±0.49	0.87±0.21	0.3±0.08	0.02±0.01	4.45±0.85	1.1±0.48	0.19±0.05	0±0
M 137	1.28±0.07	0.88±0.09	0.69±0.07	0.67±0.05	1.3±0.06	1±0.06	1.14±0.04	0.75±0.09
M 138	1.51±0.07	1.4±0.23	0.97±0.09	0.79±0.15	1.49±0.15	1.18±0.13	0.46±0.07	0.95±0.07
M 139	2.08±0.12	1.71±0.8	0.98±0.24	0.23±0.08	2.4±0.23	0.82±0.15	0.83±0.22	0.22±0.09
M 140	0.77±0.13	0.86±0.1	1.11±0.24	1.28±0.08	0.91±0.03	1.11±0.08	1.27±0.07	1.2±0.09
M 141	1.49±0.13	1.25±0.32	0.12±0.03	0.07±0.01	1.48±0.12	1.36±0.14	2.04±0.06	0.09±0.01
M 142	1.82±0.2	1.22±0.08	0.63±0.05	0.69±0.07	1.13±0.08	1.04±0.06	1.03±0.12	0.83±0.09
M 143	0.51±0.11	0.27±0.06	0.38±0.11	0.51±0.17	0.36±0.1	0.27±0.06	0.25±0.07	0.21±0.09
M 144	1.04±0.07	1.02±0.15	0.94±0.06	1.03±0.06	0.99±0.03	1.17±0.14	0.99±0.09	1.07±0.14
M 145	2±0.65	2.2±0.42	0.82±0.21	0.61±0.07	1.39±0.67	1.38±0.13	0.53±0.39	0.84±0.13
M 146	1.33±0.08	0.8±0.04	0.52±0.04	0.88±0.3	0.83±0.03	0.74±0.05	0.37±0.04	3.03±1.01
M 147	0.9±0.47	0.08±0.05	0.78±0.29	1.32±0.24	1.18±0.23	0.15±0.08	0.94±0.21	2.43±0.67
M 148	0.83±0.26	1.34±0.25	0.75±0.13	0.65±0.23	1.05±0.27	1.37±0.26	1.02±0.27	0.44±0.19
M 149	0.1±0.09	1.2±0.12	1.27±0.17	0.93±0.24	0.64±0.18	2.48±0.33	0.81±0.07	1.32±0.4
M 150	0.88±0.28	1.71±0.37	0.93±0.25	0.69±0.11	1.56±0.4	2.2±0.57	0.59±0.15	0.87±0.11
M 151	1.36±0.5	1.75±0.49	0.88±0.39	0.7±0.09	1.64±0.41	1.95±0.21	0.73±0.18	0.65±0.17
M 152	1.02±0.58	1.64±0.61	0.37±0.18	1.46±0.38	1.07±0.42	1.52±0.14	0.8±0.37	1.3±0.4
M 153	3.54±0.9	2±0.73	0±0	0.05±0.03	1.91±0.38	0.48±0.43	0.06±0.05	0.15±0.13
M 154	0.41±0.15	2.72±0.69	0.56±0.35	0.5±0.32	0.77±0.26	2.04±0.22	0.58±0.24	0.4±0.16

Metabolit Kislaltması	FBS-MKH	PL-MKH	KİP-MKH	PPP-MKH	FBSLPS-MKH	PLLPS-MKH	KİPLPS-MKH	PPPLPS-MKH
M 155	1.58±0.63	3.69±1.31	0.29±0.07	0.12±0.05	1.32±0.29	1.56±0.88	0.25±0.06	0.16±0.06
M 156	4.49±0.62	1.12±0.25	0.12±0.03	0.02±0.01	2.02±0.71	0.38±0.16	0.13±0.02	0±0
M 157	1.87±0.33	1.31±0.39	1.13±0.23	0.41±0.14	1.04±0.24	0.69±0.27	1.11±0.23	0.3±0.06
M 158	1.69±0.38	0.93±0.2	0.28±0.08	0.01±0.01	1.53±0.46	0.62±0.19	0.46±0.16	0.02±0.02
M 159	1.73±0.14	1.01±0.06	0.37±0.02	0.25±0.01	1.65±0.04	1.06±0.07	1.69±0.07	0.19±0.01
M 160	0.5±0.05	0.37±0.03	1.62±0.21	2±0.12	0.77±0.04	1.58±0.15	0.75±0.12	1.03±0.31
M 161	1.03±0.11	0.41±0.03	0.27±0.01	0.16±0.01	1.35±0.11	0.7±0.18	2.96±0.09	0.14±0.01
M 162	1.4±0.26	0.28±0.03	0.04±0.02	0.14±0.02	1.53±0.27	0.32±0.14	1.32±0.12	0.15±0.08
M 163	0.72±0.06	0.52±0.16	1.29±0.05	1.6±0.06	0.76±0.11	0.54±0.18	0.84±0.06	1.46±0.08
M 164	1.36±0.21	0.51±0.18	0.12±0.04	0.12±0.04	1.6±0.14	0.81±0.18	1.94±0.04	0.33±0.12
M 165	1.45±0.33	0.92±0.27	0.16±0.06	0±0	1.34±0.58	0.86±0.17	0.07±0.03	0±0
M 166	1.39±0.13	1.45±0.11	1±0.15	1.56±0.52	0.98±0.06	1.43±0.08	0.92±0.09	0.05±0.01
M 167	1.94±0.15	1.93±0.13	0.62±0.3	0.61±0.25	2.01±0.15	0.88±0.3	1.31±0.19	0.92±0.26
M 168	6.37±5.64	0.26±0.04	1.13±0.55	1.4±0.68	0.07±0.01	0.87±0.59	1.02±0.6	0.96±0.81
M 169	0.78±0.23	1.79±0.53	1.74±0.48	1.44±0.4	0.67±0.23	2.23±0.41	0.55±0.09	0.46±0.09
M 170	1.48±0.06	1.12±0.12	0.66±0.05	0.58±0.03	1.5±0.06	1.16±0.1	1.43±0.04	0.52±0.05
M 171	0.01±0	1.1±0.2	0.39±0.03	0.29±0.06	0.01±0	0.21±0.12	0.45±0.4	0.26±0.07
M 172	10.99±10.03	0.36±0.09	0.23±0.04	0.2±0.05	0±0	0.55±0.11	0.21±0.06	0.16±0.05
M 173	1.11±0.06	1.42±0.09	0.88±0.05	0.64±0.18	1.12±0.03	1.35±0.11	0.83±0.04	0.84±0.16
M 174	2.57±0.62	1.79±0.43	0.81±0.05	0.97±0.27	0.79±0.19	1.67±0.55	0.61±0.11	0.98±0.43
M 175	4.25±0.07	0.01±0	0.02±0	0.04±0.02	4.02±0.04	0.01±0	0.7±0.41	0.1±0.04
M 176	1.03±0.11	0.8±0.13	0.87±0.08	0.73±0.03	1.06±0.06	0.99±0.1	1.2±0.03	0.75±0.08
M 177	1.5±0.16	1.59±0.36	0.89±0.11	0.87±0.08	1.32±0.18	0.79±0.09	0.9±0.13	2.09±1.12
M 178	0.6±0.03	0.66±0.05	1.25±0.05	1.55±0.12	0.71±0.02	0.84±0.03	0.99±0.03	1.55±0.07
M 179	1.26±0.93	2.38±1.15	0.83±0.2	0.4±0.11	0.76±0.18	0.21±0.17	1.26±0.36	1.23±0.55
M 180	1.47±0.2	1.84±0.3	0.72±0.14	0.53±0.05	1.7±0.18	1.1±0.21	0.59±0.09	0.55±0.1

Metabolit Kislaltması	FBS-MKH	PL-MKH	KİP-MKH	PPP-MKH	FBSLPS-MKH	PLLPS-MKH	KİPLPS-MKH	PPPLPS-MKH
M 181	1±0.18	2.6±0.46	0.86±0.12	0.5±0.07	0.97±0.28	2.08±0.28	1.19±0.12	0.54±0.08
M 182	1.14±0.13	1.3±0.06	0.67±0.09	0.45±0.07	1.58±0.06	1.28±0.13	1.1±0.06	0.59±0.08
M 183	0.04±0	0.17±0.13	1.17±0.5	0.61±0.36	0.02±0	0.02±0	1.95±1.03	4.83±2.24
M 184	0.54±0.11	1.41±0.37	0.49±0.06	0.23±0.01	0.68±0.04	2.56±0.46	1.1±0.04	0.18±0.02
M 185	0.75±0.05	1.24±0.11	1.01±0.06	1.34±0.14	0.87±0.02	1.02±0.04	0.85±0.05	1.16±0.06
M 186	1.75±0.14	1.55±0.09	0.71±0.18	0.68±0.17	1.88±0.13	0.94±0.18	1.15±0.13	1.02±0.22
M 187	0.32±0.12	0.38±0.2	1.25±0.21	1.02±0.2	0.28±0.15	1.42±0.37	0.91±0.36	1.42±0.46
M 188	2.08±0.11	1.16±0.1	0.38±0.11	0.25±0.12	2.43±0.05	0.82±0.23	1.5±0.26	0.58±0.22
M 189	0.23±0.08	0.12±0.07	0.38±0.11	0.45±0.32	0.2±0.1	0.19±0.08	0.27±0.08	11.05±3.42
M 190	0.09±0.05	0.09±0.08	0.19±0.08	0.46±0.22	0.22±0.05	0.2±0.06	0.25±0.08	11.66±5.24
M 191	0.15±0.03	0.13±0.03	0.66±0.12	3.25±0.83	0.09±0.02	0.2±0.03	3.54±1.02	3.99±1.1
M 192	1.86±0.16	2.12±0.13	0±0	2.21±1.44	1.71±0.07	1.65±0.33	0±0	0.06±0.01
M 193	0.55±0.21	2.81±1.14	0.8±0.16	1.05±0.43	1.74±0.71	2.41±0.89	0.58±0.15	0.45±0.17
M 194	1.43±0.48	0.98±0.29	0.63±0.09	0.39±0.18	0.98±0.28	1.56±0.81	0.52±0.14	0.47±0.11
M 195	2.05±0.22	0.93±0.08	0.11±0.04	0.17±0.09	1.73±0.09	1.04±0.17	0.16±0.02	1.96±0.86
M 196	1.3±0.04	0.88±0.09	0.66±0.06	0.6±0.04	1.31±0.03	1.06±0.05	1.25±0.02	0.68±0.09
M 197	1.17±0.09	1.27±0.13	1.62±0.13	1.39±0.44	1.1±0.07	1.39±0.07	1.28±0.14	0.04±0.01
M 198	0.51±0.11	0.73±0.1	0.73±0.1	1.09±0.38	0.49±0.04	0.6±0.12	0.37±0.11	5.26±2.88
M 199	0.13±0.04	0.29±0.13	0.33±0.08	0.91±0.3	0.18±0.06	0.21±0.09	0.27±0.05	7.61±2.29
M 200	0.78±0.19	1.26±0.08	1.66±0.06	1.69±0.52	1.07±0.03	1.27±0.08	1.38±0.06	0.04±0.01
M 201	0.84±0.12	0.98±0.15	1.29±0.15	1.24±0.43	0.7±0.09	0.81±0.09	1.18±0.08	3.46±3.09
M 202	0.2±0.09	0.74±0.14	2.03±0.15	1.99±0.57	0.51±0.24	0.55±0.11	1.52±0.09	2.38±1.93
M 203	1.59±0.14	1.83±0.15	1.56±0.12	1.35±0.41	1.9±0.13	1.73±0.34	1.65±0.16	0.15±0.06
M 204	0.2±0.02	2.25±0.1	1.66±0.28	1.77±0.49	0.13±0.02	1.93±0.1	1.72±0.2	0.07±0.02
M 205	0.21±0.05	0.01±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
M 206	0.26±0.09	1.66±0.44	0.95±0.1	0.88±0.08	2.95±1.27	0.89±0.1	0.9±0.22	1.3±0.33

Metabolit Kislaltması	FBS-MKH	PL-MKH	KİP-MKH	PPP-MKH	FBSLPS-MKH	PLLPS-MKH	KİPLPS-MKH	PPPLPS-MKH
M 207	0.63±0.04	0.73±0.05	1.3±0.09	1.6±0.15	0.75±0.04	0.86±0.02	0.95±0.06	1.36±0.17
M 208	1.42±0.04	1.67±0.12	0.69±0.05	0.19±0.01	1.33±0.02	1.82±0.29	1.06±0.02	0.13±0.01
M 209	1.89±0.25	0.41±0.06	0.21±0.02	0.08±0.01	2.86±0.15	0.93±0.19	1.67±0.12	0.1±0.01
M 210	2.13±0.11	1.68±0.21	0.73±0.09	0.95±0.17	1.15±0.1	1.61±0.18	0.85±0.13	1±0.05
M 211	1.04±0.03	0.91±0.06	0.82±0.07	0.64±0.06	1.06±0.01	1.12±0.07	1.18±0.03	0.74±0.07
M 212	1.81±0.09	1.28±0.03	0.86±0.1	0.95±0.28	1.2±0.04	1.4±0.12	1.1±0.09	0.15±0.03
M 213	0.78±0.07	1.3±0.14	1.02±0.08	1.01±0.06	0.92±0.06	1.29±0.06	0.89±0.02	0.92±0.09
M 214	0.01±0	1.12±0.11	1.13±0.21	1.21±0.24	0.01±0	0.71±0.12	1.18±0.1	1.24±0.97
M 215	1.47±0.15	1.63±0.07	0.3±0.02	0.13±0.02	1.17±0.11	1.72±0.25	1.63±0.07	0.19±0.04
M 216	0.88±0.08	0.78±0.1	1.05±0.04	1.68±0.1	0.81±0.05	0.75±0.03	0.84±0.03	1.77±0.11
M 217	0.75±0.06	1.2±0.11	1.07±0.04	1.34±0.16	0.84±0.02	0.97±0.04	0.83±0.05	1.21±0.07
M 218	1.59±0.09	1.52±0.09	1.4±0.2	1.19±0.4	1.34±0.07	1.79±0.05	1.14±0.13	0.1±0.03
M 219	0.17±0.11	1.34±0.48	0.6±0.17	1.54±0.74	0.05±0.01	0.29±0.09	0.14±0.11	2.67±0.88
M 220	1.05±0.21	0.34±0.07	0.6±0.09	0.61±0.08	1.52±0.15	0.61±0.09	1.51±0.04	0.85±0.16
M 221	1.47±0.22	1.64±0.28	0.63±0.16	0.77±0.25	1.39±0.22	1.37±0.26	1.3±0.13	0.19±0.05
M 222	0.75±0.13	1.2±0.13	1.54±0.18	1.6±0.49	0.87±0.04	1.2±0.06	1.58±0.15	0.32±0.13
M 223	1.73±0.07	0.39±0.04	0.43±0.08	0.28±0.01	1.15±0.26	1.48±0.25	2.19±0.04	0.22±0.01
M 224	1.82±0.24	0.41±0.16	1.04±0.09	1.26±0.15	0.44±0.1	0.18±0.05	1.2±0.09	1.91±0.36
M 225	1.56±0.71	0.74±0.23	1.38±0.25	0.99±0.15	0.75±0.14	0.53±0.14	2.33±0.33	1.12±0.19
M 226	1.8±0.15	1.83±0.12	0.6±0.24	0.56±0.19	2.03±0.14	0.99±0.27	1.23±0.16	0.96±0.26
M 227	0±0	0±0	0.75±0.09	2.31±1.25	0±0	0±0	7.61±3.84	0.66±0.24
M 228	1.28±0.11	0.29±0.04	1.03±0.51	2.72±0.14	1.35±0.05	0.22±0.03	1.24±0.05	2.12±0.38
M 229	1.62±0.14	1.56±0.11	0.42±0.31	0.34±0.2	1.58±0.16	0.55±0.25	1.18±0.21	0.95±0.33
M 230	2.07±0.17	0.32±0.05	0.13±0.02	0.49±0.03	2.08±0.15	0.38±0.07	2.08±0.11	0.51±0.04
M 231	0.25±0.02	1.33±0.23	0.78±0.11	2.08±0.35	0.24±0.01	0.99±0.06	0.19±0.01	2.74±0.65
M 232	1.65±0.14	0.54±0.05	0.52±0.04	0.53±0.02	1.72±0.09	0.61±0.05	1.8±0.06	0.51±0.05

Metabolit Kısaltması	FBS-MKH	PL-MKH	KİP-MKH	PPP-MKH	FBSLPS-MKH	PLLPS-MKH	KİPLPS-MKH	PPPLPS-MKH
M 233	1.23±0.1	0.78±0.06	0.77±0.05	0.61±0.03	1.23±0.04	1±0.06	1.27±0.02	0.67±0.07
M 234	0.36±0.02	1.54±0.37	1.49±0.23	0.42±0.03	0.39±0.04	1.54±0.15	0.67±0.11	0.43±0.04
M 235	2.27±0.38	1.65±0.38	0.74±0.16	0.74±0.31	0.96±0.19	1.48±0.25	0.79±0.2	0.56±0.09
M 236	0.42±0.25	2.67±0.5	0.44±0.08	0.17±0.03	1.17±0.31	2.61±0.6	0.19±0.1	0.04±0.02
M 237	0.69±0.29	0.73±0.13	0.98±0.04	1.05±0.05	0.3±0.03	1.73±0.2	0.65±0.23	0.95±0.07
M 238	1.13±0.09	0.22±0.03	0.79±0.09	0.97±0.08	1.38±0.07	0.69±0.08	1.73±0.06	0.76±0.06
M 239	1.13±0.09	1.14±0.07	0.86±0.11	0.98±0.05	1.11±0.08	1.15±0.05	1.02±0.04	0.93±0.11
M 240	4.53±0.74	0.51±0.07	0.49±0.12	0.12±0.05	2.93±0.31	1.8±0.33	0.61±0.12	0.1±0.02
M 241	1.17±0.08	0.84±0.09	0.73±0.08	0.69±0.04	1.2±0.06	0.99±0.06	1.2±0.03	0.79±0.1
M 242	1.81±0.13	0.25±0.01	0.87±0.29	0.67±0.41	1.86±0.1	0.32±0.02	1.99±0.06	0.61±0.34

* Normalize edilmiş verilerin ortalama ± standart hata'sı

Tablo 4.7 Farklı besiyeri eklentileri ve inflamatuvar uyarım varlığında ve yokluğunda çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolitlerinin gruplar arası istatistiksel olarak karşılaştırılmalarına ait p değerleri.

Metabolit Kısaltması	FBS		PL		KIP-PPP	FBS-FBSLPS	PL-PLLPS	KIP-KIPLPS	PPP-PPPLPS
	PL	KIP	PPP	PL					
M 1	0.76	0.12	0.67	0.76	0.63	0.09	0.34	0.28	0.02
M 2	0.23	0.03	0.08	0.18	0.53	0.07	0.60	0.41	0.06
M 3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.37	0.03
M 4	0.38	0.06	0.06	0.01	0.82	0.34	0.94	0.78	0.54
M 5	0.78	0.35	0.36	0.37	0.93	0.68	0.35	0.18	0.14
M 6	0.36	0.04	0.07	0.01	0.96	0.12	0.39	0.38	0.39
M 7	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.01	0.18	0.09	0.06
M 8	0.39	0.00	0.00	0.14	0.88	0.25	0.83	0.69	0.21
M 9	0.01	0.00	0.00	0.11	0.99	0.08	0.70	0.08	0.36
M 10	0.00	0.00	0.07	0.00	0.77	0.35	0.99	0.29	0.07
M 11	0.33	0.30	0.54	0.33	0.91	0.05	0.28	0.90	0.01
M 12	0.49	0.02	0.12	0.12	0.28	0.09	0.98	0.27	0.32
M 13	0.69	0.09	0.21	0.13	0.34	0.59	0.38	0.38	0.10
M 14	0.76	0.56	0.22	0.27	0.39	0.19	0.10	0.12	0.02
M 15	0.35	0.30	0.16	0.49	0.04	0.47	0.25	0.69	0.44
M 16	0.94	0.03	0.06	0.06	0.13	0.88	0.19	0.08	0.27
M 17	0.10	0.01	0.00	0.00	0.00	0.24	0.48	0.45	0.46
M 18	0.02	0.00	0.12	0.00	0.00	0.35	0.23	0.11	0.46
M 19	0.12	0.00	0.00	0.00	0.36	0.07	0.36	0.56	0.08
M 20	0.29	0.04	0.01	0.00	0.32	0.20	0.21	0.96	0.03
M 21	0.15	0.00	0.04	0.24	0.45	0.54	0.15	0.00	0.43
M 22	0.00	0.00	0.05	0.05	0.19	0.00	0.26	0.98	0.21

Metabolit Kisaltması	FBS			PL			KIP-PPP	FBS-FBSLPS	PL-PLLPS	KIP-KIPLPS	PPP-PPPLPS
	PL	KIP	PPP	PL		PPP					
				KIP	PPP						
M 23	0.96	0.23	0.03	0.31	0.06	0.09	0.08	0.70	0.66	0.96	
M 24	0.00	0.70	0.47	0.00	0.00	0.23	0.33	0.36	0.49	0.45	
M 25	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.55	0.00	0.16	0.32	0.63	
M 26	0.46	0.01	0.32	0.03	0.67	0.07	0.46	0.52	0.90	0.29	
M 27	0.69	0.56	0.34	0.47	0.37	0.80	0.93	0.28	0.96	0.48	
M 28	0.47	0.04	0.12	0.00	0.06	0.19	0.53	0.32	0.13	0.75	
M 29	0.62	0.00	0.06	0.00	0.05	0.90	0.05	0.89	0.04	0.02	
M 30	0.24	0.61	0.40	0.06	0.03	0.57	0.94	0.89	0.27	0.80	
M 31	0.02	0.52	0.35	0.07	0.04	0.97	0.49	0.46	0.52	0.54	
M 32	0.12	0.01	0.58	0.03	0.36	0.18	0.01	0.51	0.33	0.02	
M 33	0.00	0.00	0.02	0.00	0.07	0.15	0.37	0.97	0.03	0.01	
M 34	0.98	0.09	0.04	0.07	0.02	0.77	0.42	0.63	0.81	0.23	
M 35	0.01	0.90	0.10	0.01	0.20	0.11	0.11	0.79	0.05	0.16	
M 36	0.00	0.00	0.00	0.18	0.02	0.00	0.00	0.38	0.04	0.51	
M 37	0.51	0.20	0.19	0.11	0.20	0.75	0.16	0.42	0.98	0.02	
M 38	0.42	0.12	0.04	0.55	0.23	0.21	0.21	0.56	0.03	0.93	
M 39	0.00	0.00	0.13	0.01	0.96	0.42	0.00	0.55	0.70	0.92	
M 40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.16	0.00	0.00	0.60	
M 41	0.01	0.01	0.13	0.48	0.00	0.00	0.28	0.33	0.00	0.00	
M 42	0.84	0.21	0.44	0.35	0.56	0.23	0.04	0.06	0.82	0.18	
M 43	0.71	0.03	0.02	0.13	0.09	0.36	0.59	0.22	0.92	0.59	
M 44	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.39	0.26	0.34	0.27	0.19	
M 45	0.32	0.02	0.00	0.07	0.01	0.37	0.04	0.19	0.81	0.71	
M 46	0.01	0.51	0.21	0.00	0.08	0.12	0.16	0.21	0.40	0.47	
M 47	0.00	0.00	0.01	0.00	0.21	0.77	0.29	0.04	0.01	0.01	
M 48	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01	0.23	0.00	0.22	0.16	0.82	

Metabolit Kisaltması	FBS			PL			KIP-PPP	FBS-FBSLPS	PL-PLLPS	KIP-KIPLPS	PPP-PPPLPS
	PL	KIP	PPP	PL							
				KIP	PPP	PPP					
M 49	0.22	0.04	0.85	0.06	0.48	0.24	0.10	0.29	0.66	0.02	
M 50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.36	0.00	0.80	0.25	0.04	
M 51	0.43	0.00	0.30	0.00	0.40	0.89	0.76	0.44	0.00	0.02	
M 52	0.32	0.19	0.03	0.97	0.12	0.09	0.76	0.36	0.34	0.18	
M 53	0.00	0.00	0.63	0.00	0.00	0.10	0.16	0.58	0.06	0.50	
M 54	0.04	0.26	0.17	0.03	0.02	0.10	0.30	0.57	0.10	0.42	
M 55	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.25	0.02	0.74	0.76	0.17	
M 56	0.08	0.00	0.40	0.00	0.84	0.10	0.06	0.28	0.61	0.03	
M 57	0.00	0.00	0.00	0.01	0.45	0.01	0.48	0.07	0.00	0.11	
M 58	0.91	0.00	0.96	0.00	1.00	0.06	0.63	0.05	0.00	0.41	
M 59	0.01	0.02	0.08	0.04	0.12	0.68	0.10	0.49	0.70	0.91	
M 60	0.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.83	0.00	0.58	0.95	0.06	
M 61	0.37	0.40	0.39	0.94	0.98	0.96	0.26	0.59	0.69	0.72	
M 62	0.05	0.00	0.01	0.00	0.01	0.25	0.19	0.56	0.05	0.01	
M 63	0.77	0.44	0.38	0.50	0.20	0.31	0.75	0.56	0.30	0.28	
M 64	0.00	0.00	0.00	0.12	0.04	0.00	0.02	0.28	0.94	0.05	
M 65	0.00	0.00	0.00	0.04	0.31	0.44	0.08	0.44	0.37	0.72	
M 66	0.54	0.74	0.17	0.22	0.04	0.21	0.38	0.22	0.33	0.35	
M 67	0.00	0.40	0.00	0.36	0.00	0.32	0.14	0.26	0.32	0.42	
M 68	0.16	0.06	0.26	0.22	0.39	0.09	0.15	0.33	0.09	0.28	
M 69	0.24	0.89	0.04	0.10	0.13	0.03	0.01	0.57	0.03	0.24	
M 70	0.27	0.12	0.11	0.40	0.22	0.47	0.05	0.54	0.74	0.85	
M 71	0.99	0.32	0.70	0.25	0.69	0.46	0.16	0.89	0.07	0.12	
M 72	0.26	0.41	0.37	0.13	0.89	0.19	0.05	0.35	1.00	0.54	
M 73	0.99	0.08	0.21	0.14	0.28	0.58	0.12	0.35	0.39	0.25	
M 74	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.85	0.07	0.37	0.81	0.25	

Metabolit Kisaltması	FBS			PL			KIP-PPP	FBS-FBSLPS	PL-PLLPS	KIP-KIPLPS	PPP-PPPLPS
	PL	KIP	PPP	PL		PPP					
				KIP	PPP						
M 75	0.22	0.58	0.51	0.05	0.05	0.05	0.83	0.54	0.55	0.67	0.49
M 76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.89	0.03	0.00	0.64
M 77	0.11	0.04	0.02	0.59	0.77	0.77	0.69	0.78	0.97	0.38	0.13
M 78	0.06	0.00	0.00	0.03	0.05	0.05	0.85	0.00	0.06	0.00	0.21
M 79	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.93	0.34	0.00	0.58
M 80	0.17	0.01	0.01	0.10	0.08	0.08	0.77	0.13	0.50	0.45	0.25
M 81	0.08	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.89	0.39	0.05	0.05	0.28
M 82	0.18	0.00	0.01	0.00	0.02	0.02	0.21	0.02	0.21	0.58	0.27
M 83	0.19	0.04	0.00	0.65	0.15	0.15	0.07	0.02	0.32	0.28	0.17
M 84	0.05	0.01	0.01	0.21	0.29	0.29	0.79	0.67	0.24	0.00	0.38
M 85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.75	0.00	0.61	0.82	0.96
M 86	0.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.51	0.61	0.00	0.58
M 87	0.07	0.18	0.17	0.82	0.20	0.20	0.30	0.00	0.00	0.64	0.01
M 88	0.27	0.12	0.11	0.40	0.22	0.22	0.47	0.05	0.54	0.08	0.85
M 89	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.84	0.18	0.89
M 90	0.08	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.44	0.58	0.23	0.14	0.61
M 91	0.59	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	0.33	0.20	0.00	0.43
M 92	0.00	0.02	0.00	0.01	0.14	0.14	0.00	0.02	0.00	0.00	0.15
M 93	0.87	0.21	0.14	0.35	0.28	0.28	0.93	0.62	0.42	0.00	0.88
M 94	0.01	0.00	0.00	0.13	0.05	0.05	0.71	0.32	0.44	0.00	0.97
M 95	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.46	0.00	0.02
M 96	0.10	0.83	0.03	0.07	0.01	0.01	0.02	0.54	0.93	0.85	0.61
M 97	0.28	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.96	0.85	0.29	0.00	0.33
M 98	0.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.23	0.34	0.58	0.17
M 99	0.20	0.94	0.67	0.06	0.02	0.02	0.22	0.09	0.12	0.61	0.60
M 100	0.33	0.26	0.06	0.14	0.07	0.07	0.15	0.87	0.78	0.00	0.86

Metabolit Kisaltması	FBS			PL			KIP-PPP	FBS-FBSLPS	PL-PLLPS	KIP-KIPLPS	PPP-PPPLPS
	PL	KIP	PPP	PL							
				KIP	PPP	PPP					
M 101	0.07	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.95	0.14	0.93	0.07	0.44
M 102	0.96	0.07	0.87	0.01	0.84	0.84	0.01	0.85	0.62	0.19	0.11
M 103	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.80	0.42	0.15	0.58	0.15
M 104	0.03	0.00	0.59	0.00	0.75	0.75	0.58	0.19	0.34	0.02	0.06
M 105	0.92	0.47	0.31	0.60	0.32	0.32	0.38	0.66	0.39	0.33	0.03
M 106	0.34	0.20	0.23	0.33	0.46	0.46	0.86	0.24	0.53	0.94	0.01
M 107	0.00	0.00	0.00	0.19	0.11	0.11	0.38	0.92	0.25	0.00	0.31
M 108	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.39	0.00	0.05
M 109	0.35	0.01	0.40	0.00	0.01	0.01	0.01	0.72	0.01	0.88	0.21
M 110	0.54	0.07	0.77	0.03	0.88	0.88	0.26	0.17	0.54	0.97	0.09
M 111	0.00	0.80	0.30	0.01	0.12	0.12	0.29	0.15	0.93	0.74	0.22
M 112	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.62	0.17	0.00	0.14
M 113	0.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.69	0.83	0.01	1.00
M 114	0.68	0.13	0.49	0.18	0.61	0.61	0.60	0.63	0.96	0.25	0.44
M 115	0.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.93	0.01	0.00	0.00
M 116	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.06	0.50	0.04
M 117	0.27	0.30	0.25	0.72	0.76	0.76	0.87	0.41	0.13	0.00	0.35
M 118	0.06	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.21	0.91	0.00	0.17	0.44
M 119	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.77	0.00	0.16
M 120	0.34	0.62	0.09	0.68	0.01	0.01	0.04	0.66	0.25	0.02	0.41
M 121	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.67	0.06	0.00	0.33
M 122	0.84	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.89	0.63	0.00	0.77
M 123	0.05	0.08	0.35	0.00	0.34	0.34	0.03	0.06	0.24	0.18	0.72
M 124	0.03	0.01	0.00	0.39	0.41	0.41	0.76	0.39	0.38	0.43	0.69
M 125	0.25	0.96	0.31	0.23	0.11	0.11	0.25	0.17	0.27	0.91	0.37
M 126	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	0.77	0.06	0.43	0.17

Metabolit Kisaltması	FBS			PL			KIP-PPP	FBS-FBSLPS	PL-PLLPS	KIP-KIPLPS	PPP-PPPLPS
	PL	KIP	PPP	PL							
				KIP	PPP	PPP					
M 127	0.01	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.65	0.32	0.03	
M 128	0.69	0.33	0.58	0.63	0.98	0.98	0.54	0.57	0.90	1.00	
M 129	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.51	0.21	0.53	
M 130	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.98	0.54	0.55	0.61	
M 131	0.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.02	0.00	0.91	
M 132	0.27	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.20	0.69	0.20	0.99	
M 133	0.48	0.05	0.04	0.46	0.43	0.43	0.55	0.66	0.29	0.69	
M 134	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.80	0.93	0.89	
M 135	0.02	0.00	0.00	0.91	0.16	0.16	0.04	0.89	0.00	0.71	
M 136	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.01	0.70	0.30	0.47	
M 137	0.01	0.00	0.00	0.15	0.08	0.08	0.79	0.30	0.00	0.47	
M 138	0.68	0.00	0.00	0.14	0.06	0.06	0.34	0.45	0.00	0.37	
M 139	0.69	0.00	0.00	0.44	0.12	0.12	0.02	0.33	0.68	0.93	
M 140	0.62	0.28	0.01	0.39	0.01	0.01	0.56	0.09	0.58	0.58	
M 141	0.54	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.22	0.77	0.00	0.19	
M 142	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.56	0.14	0.02	0.28	
M 143	0.12	0.48	0.99	0.42	0.25	0.25	0.58	0.98	0.36	0.17	
M 144	0.91	0.33	0.86	0.65	0.99	0.99	0.41	0.54	0.67	0.81	
M 145	0.82	0.14	0.08	0.02	0.01	0.01	0.43	0.12	0.57	0.19	
M 146	0.00	0.00	0.22	0.00	0.82	0.82	0.31	0.39	0.04	0.09	
M 147	0.14	0.85	0.48	0.05	0.00	0.00	0.23	0.50	0.70	0.19	
M 148	0.23	0.80	0.64	0.08	0.09	0.09	0.74	0.94	0.42	0.55	
M 149	0.00	0.00	0.01	0.78	0.38	0.38	0.32	0.01	0.05	0.46	
M 150	0.14	0.90	0.59	0.14	0.04	0.04	0.44	0.53	0.31	0.33	
M 151	0.62	0.51	0.26	0.23	0.08	0.08	0.69	0.74	0.76	0.84	
M 152	0.52	0.35	0.58	0.10	0.83	0.83	0.04	0.86	0.36	0.79	

Metabolit Kisaltması	FBS			PL			KIP-PPP	FBS-FBSLPS	PL-PLLPS	KIP-KIPLPS	PPP-PPPLPS
	PL	KIP	PPP	PL							
				KIP	PPP	PPP					
M 153	0.25	0.00	0.01	0.03	0.03	0.03	0.21	0.16	0.13	0.28	0.53
M 154	0.01	0.72	0.82	0.03	0.02	0.02	0.90	0.29	0.40	0.97	0.81
M 155	0.22	0.09	0.06	0.04	0.03	0.03	0.09	0.73	0.25	0.66	0.64
M 156	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.04	0.04	0.71	0.16
M 157	0.34	0.12	0.00	0.72	0.07	0.07	0.04	0.09	0.26	0.96	0.55
M 158	0.13	0.01	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	0.82	0.33	0.37	0.53
M 159	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.60	0.65	0.00	0.00
M 160	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	0.00	0.00	0.01	0.03
M 161	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.18	0.00	0.07
M 162	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.76	0.79	0.00	0.93
M 163	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.75	0.92	0.00	0.25
M 164	0.02	0.00	0.00	0.08	0.09	0.09	0.90	0.40	0.31	0.00	0.17
M 165	0.28	0.01	0.00	0.03	0.01	0.01	0.04	0.88	0.86	0.24	0.42
M 166	0.76	0.11	0.78	0.06	0.85	0.85	0.37	0.03	0.90	0.70	0.02
M 167	0.97	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.97	0.77	0.01	0.11	0.45
M 168	0.35	0.42	0.44	0.18	0.16	0.16	0.79	0.33	0.37	0.90	0.72
M 169	0.14	0.13	0.22	0.95	0.64	0.64	0.67	0.78	0.56	0.05	0.05
M 170	0.03	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.24	0.90	0.79	0.00	0.33
M 171	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.21	0.86	0.01	0.90	0.81
M 172	0.36	0.35	0.35	0.29	0.22	0.22	0.71	0.34	0.24	0.77	0.67
M 173	0.03	0.02	0.05	0.00	0.01	0.01	0.28	0.89	0.65	0.47	0.46
M 174	0.37	0.03	0.06	0.07	0.17	0.17	0.60	0.03	0.88	0.17	0.98
M 175	0.00	0.00	0.00	0.17	0.12	0.12	0.24	0.03	0.70	0.15	0.23
M 176	0.24	0.33	0.04	0.66	0.64	0.64	0.17	0.83	0.30	0.01	0.83
M 177	0.84	0.02	0.01	0.12	0.11	0.11	0.89	0.51	0.08	0.96	0.35
M 178	0.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.04	0.02	0.00	0.99

Metabolit Kisaltması	FBS			PL			KIP-PPP	FBS-FBSLPS	PL-PLLPS	KIP-KIPLPS	PPP-PPPLPS
	PL	KIP	PPP	PL							
				KIP	PPP	PPP					
M 179	0.50	0.69	0.42	0.25	0.15	0.12	0.64	0.12	0.37	0.21	
M 180	0.37	0.02	0.00	0.01	0.00	0.27	0.45	0.10	0.51	0.86	
M 181	0.01	0.57	0.04	0.01	0.00	0.03	0.94	0.40	0.11	0.72	
M 182	0.34	0.02	0.00	0.00	0.00	0.10	0.02	0.93	0.00	0.24	
M 183	0.38	0.07	0.18	0.11	0.32	0.43	0.00	0.33	0.55	0.12	
M 184	0.07	0.71	0.03	0.05	0.02	0.00	0.31	0.11	0.00	0.02	
M 185	0.00	0.02	0.01	0.13	0.63	0.08	0.10	0.13	0.10	0.31	
M 186	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.91	0.53	0.02	0.10	0.29	
M 187	0.83	0.01	0.02	0.02	0.07	0.48	0.87	0.05	0.47	0.48	
M 188	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.49	0.03	0.24	0.00	0.26	
M 189	0.41	0.35	0.57	0.11	0.40	0.86	0.81	0.60	0.47	0.02	
M 190	0.97	0.34	0.16	0.40	0.17	0.32	0.14	0.32	0.66	0.08	
M 191	0.61	0.00	0.01	0.00	0.01	0.02	0.19	0.15	0.03	0.64	
M 192	0.27	0.00	0.83	0.00	0.96	0.19	0.43	0.25	0.01	0.20	
M 193	0.10	0.40	0.36	0.14	0.22	0.63	0.17	0.80	0.37	0.26	
M 194	0.48	0.17	0.10	0.32	0.14	0.31	0.49	0.55	0.55	0.75	
M 195	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.58	0.24	0.59	0.30	0.09	
M 196	0.00	0.00	0.00	0.10	0.03	0.48	0.79	0.13	0.00	0.45	
M 197	0.58	0.03	0.66	0.12	0.81	0.67	0.59	0.48	0.13	0.02	
M 198	0.20	0.20	0.21	0.99	0.42	0.42	0.91	0.46	0.05	0.22	
M 199	0.30	0.08	0.04	0.83	0.12	0.12	0.59	0.66	0.60	0.02	
M 200	0.06	0.00	0.17	0.00	0.48	0.97	0.22	0.98	0.01	0.02	
M 201	0.52	0.06	0.43	0.21	0.61	0.91	0.42	0.42	0.53	0.53	
M 202	0.01	0.00	0.02	0.00	0.08	0.95	0.28	0.36	0.02	0.86	
M 203	0.31	0.89	0.62	0.22	0.33	0.65	0.17	0.81	0.69	0.02	
M 204	0.00	0.00	0.01	0.10	0.41	0.85	0.06	0.07	0.87	0.01	

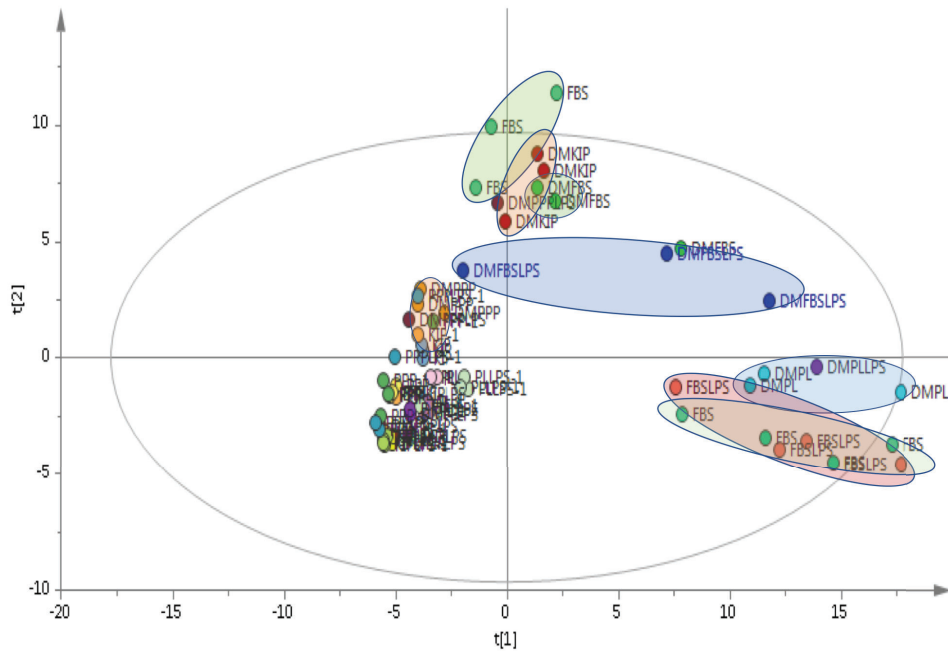
Metabolit Kisaltması	FBS			PL			KIP-PPP	FBS-FBSLPS	PL-PLLPS	KIP-KIPLPS	PPP-PPPLPS
	PL	KIP	PPP	PL							
				KIP	PPP	PPP					
M 205	0.09	0.80	0.49	0.14	0.63	0.57	0.06	0.15	0.44	0.60	
M 206	0.02	0.00	0.00	0.18	0.14	0.66	0.08	0.15	0.86	0.28	
M 207	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	0.06	0.06	0.01	0.36	
M 208	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.67	0.00	0.00	
M 209	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	0.04	0.00	0.29	
M 210	0.10	0.00	0.00	0.00	0.03	0.33	0.00	0.84	0.51	0.79	
M 211	0.13	0.02	0.00	0.38	0.02	0.11	0.54	0.07	0.00	0.36	
M 212	0.00	0.00	0.02	0.00	0.30	0.81	0.00	0.41	0.15	0.03	
M 213	0.01	0.06	0.05	0.14	0.11	0.92	0.19	0.93	0.17	0.46	
M 214	0.00	0.00	0.00	0.98	0.77	0.82	0.44	0.05	0.84	0.98	
M 215	0.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	0.76	0.00	0.22	
M 216	0.48	0.09	0.00	0.04	0.00	0.00	0.53	0.80	0.00	0.61	
M 217	0.01	0.00	0.01	0.36	0.52	0.17	0.24	0.12	0.01	0.52	
M 218	0.64	0.46	0.39	0.64	0.48	0.67	0.08	0.05	0.33	0.03	
M 219	0.06	0.08	0.13	0.21	0.84	0.28	0.36	0.08	0.07	0.39	
M 220	0.01	0.10	0.10	0.05	0.03	0.94	0.14	0.04	0.00	0.24	
M 221	0.67	0.02	0.08	0.02	0.06	0.68	0.82	0.53	0.01	0.06	
M 222	0.05	0.01	0.15	0.18	0.48	0.92	0.45	1.00	0.89	0.04	
M 223	0.00	0.00	0.00	0.65	0.03	0.09	0.07	0.00	0.00	0.01	
M 224	0.00	0.02	0.10	0.01	0.01	0.27	0.00	0.26	0.26	0.16	
M 225	0.34	0.83	0.50	0.12	0.42	0.25	0.34	0.50	0.06	0.65	
M 226	0.89	0.00	0.00	0.00	0.00	0.90	0.35	0.03	0.07	0.28	
M 227	0.00	0.00	0.12	0.00	0.12	0.28	0.00	0.26	0.13	0.27	
M 228	0.00	0.68	0.00	0.22	0.00	0.02	0.61	0.31	0.71	0.20	
M 229	0.79	0.01	0.00	0.01	0.00	0.85	0.90	0.01	0.09	0.18	
M 230	0.00	0.00	0.00	0.01	0.03	0.00	0.95	0.58	0.00	0.74	

Metabolit Kisaltması	FBS			PL			KIP-PPP	FBS-FBSLPS	PL-PLLPS	KIP-KIPLPS	PPP-PPPLPS
	PL	KIP	PPP	KIP	PPP	PPP					
M 231	0.00	0.00	0.00	0.08	0.13	0.13	0.01	0.95	0.24	0.00	0.43
M 232	0.00	0.00	0.00	0.70	0.78	0.78	0.81	0.70	0.40	0.00	0.80
M 233	0.00	0.00	0.00	0.95	0.04	0.04	0.04	0.99	0.04	0.00	0.45
M 234	0.02	0.00	0.14	0.93	0.02	0.02	0.00	0.65	0.99	0.02	0.85
M 235	0.31	0.01	0.02	0.07	0.12	0.12	1.00	0.02	0.74	0.87	0.62
M 236	0.00	0.96	0.38	0.00	0.00	0.00	0.02	0.11	0.94	0.10	0.01
M 237	0.91	0.37	0.28	0.11	0.06	0.06	0.35	0.25	0.00	0.22	0.29
M 238	0.00	0.03	0.25	0.00	0.00	0.00	0.20	0.08	0.00	0.00	0.08
M 239	0.90	0.12	0.24	0.08	0.13	0.13	0.39	0.89	0.95	0.26	0.67
M 240	0.00	0.00	0.00	0.89	0.00	0.00	0.03	0.10	0.01	0.51	0.85
M 241	0.03	0.00	0.00	0.42	0.20	0.20	0.66	0.75	0.25	0.00	0.41
M 242	0.00	0.02	0.04	0.08	0.38	0.38	0.73	0.82	0.05	0.01	0.91

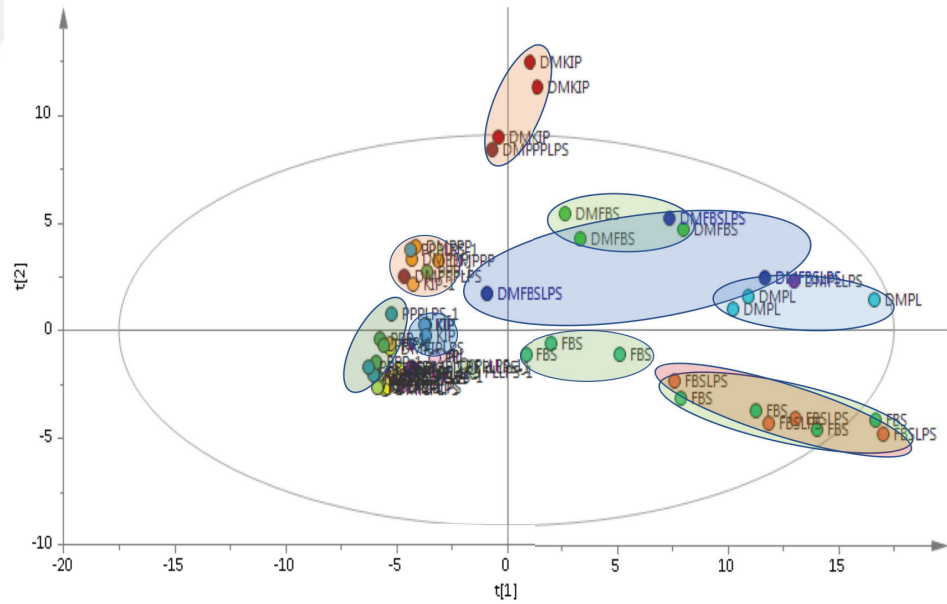
4.8.2. Ekstrasellüler Metabolitlerin Veri Analizleri:

Metabolomik analizlerde hücrel örneklerin intrasellüler metabolitlerinin yanısıra ekstrasellüler metabolitler de incelenmiş, ayrıca kültür koşullarında kullanılan besiyerleri negatif kontrol olarak test edilmiştir. MKH'lere besiyerlerinin etkisini doğrudan gözleyebilmek için kültür koşullarında kullanılan medyumlar MKH eklenmeden önce ve sonra metabolomiks testleri ile ayrıntılı incelenmiştir. Hücre kültürleri süpernatantları test edilerek MKH'lerin maruz kaldıkları ortama bağlı olarak salgıladıkları ekstrasellüler metabolitler incelenmiştir. Böylelikle çalışmamızda hücrel örneklerin intrasellüler metabolitleri yanında farklı ortamlara maruziyet sonrası hücrelerin metabolik özelliklerine bağlı olarak değişen ekstrasellüler metabolitler de incelenmiştir.

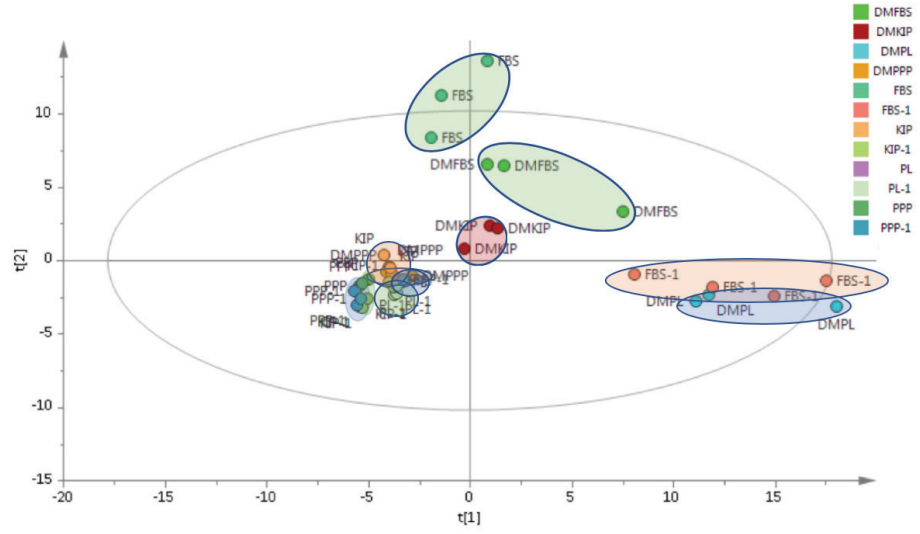
Besiyeri eklentileri (FBS, PL, KİP, PPP), eklentilerin kültür besiyerlerine eklenmesi sonucu hücrelerin çoğaltılması için kullanılan tam besiyerleri (DMFBS, DMPL, DMKİP, DMPPP, DMFBSLPS, DMPLLPS, DMKİPLPS, DMPPPLPS) ve hücre kültürleri süpernatantlarında (FBS1, PL1, KİP1, PPP1, FBSLPS1, PLLPS1, KİPLPS1, PPPLPS1) 605 ekstrasellüler metabolit saptanmış, bunların 116'sı tanımlanmıştır. Tanımlanan ekstrasellüler metabolitler Tablo 4.8, Tablo 4.9, Tablo 4.10, Tablo 4.11'de gösterilmiştir. PCA analizleri (Şekil 4.28) ve PLS-DA analizleri (Şekil 4.29) her bir değişken için bir arada ve ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.



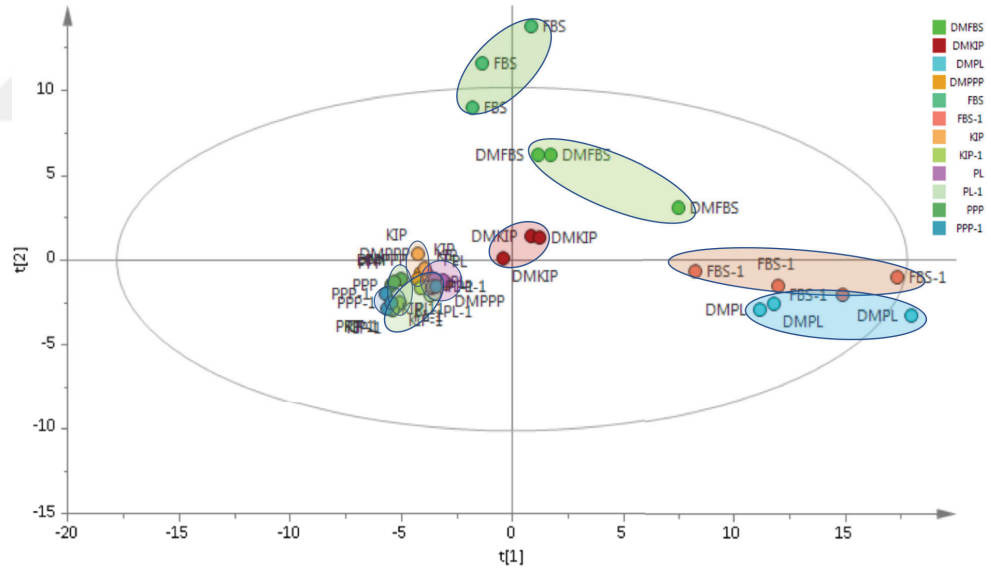
Şekil 4.28 Ekstrasellüler metabolitlerin PCA grafiği



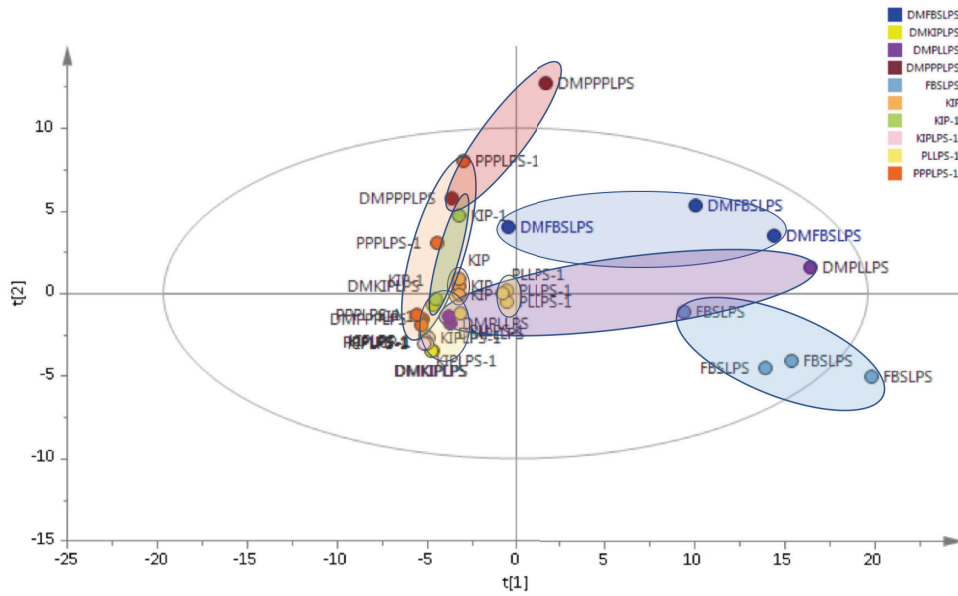
Şekil 4.29 Ekstrasellüler metabolitlerin PLS-DA grafiği. (R^2 : 0,954 Q^2 :0,903).



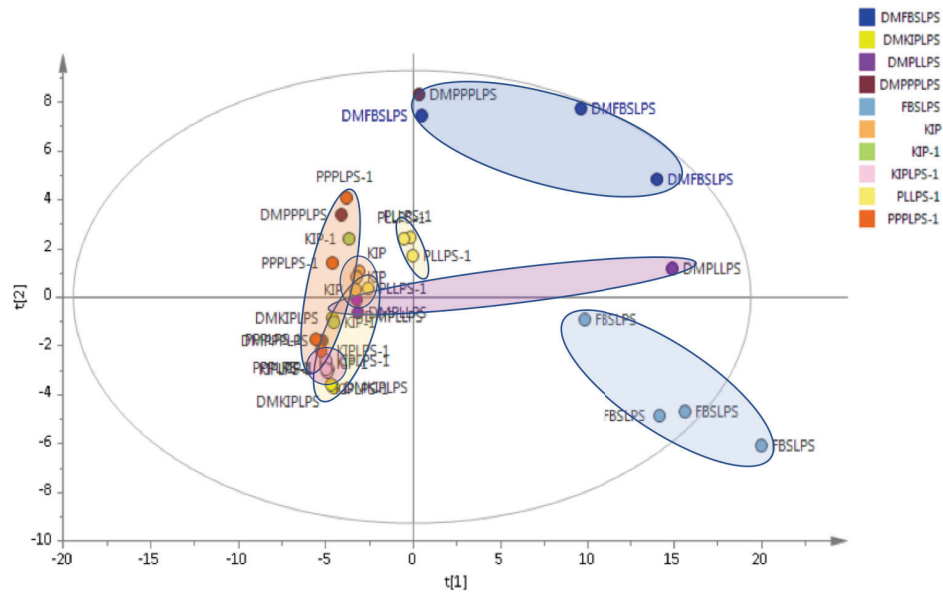
Şekil 4.30 İnflamatuvar uyarım yokluğunda çoğaltılan MKH'lere ait ekstrasellüler metabolitlerin PCA grafiği



Şekil 4.31 İnflamatuvar uyarım yokluğunda çoğaltılan MKH'lere ait ekstrasellüler metabolitlerin PLS-DA skor grafiği ($R^2: 1.000$ ve $Q^2:0.971$) ve VIP grafiği



Şekil 4.32 İnflamatuvar uyarım varlığında çoğaltılan MKH'lere ait ekstrasellüler metabolitlerin PCA grafiği.



Şekil 4.33 İnflamatuvar uyarım varlığında çoğaltılan MKH'lere ait ekstrasellüler metabolitlerin PLS-DA skor grafiği (R²: 1.000 ve Q²:0.983) ve VIP grafiği

Tablo 4.8 GC-MS analizleri ile tanımlanan ekstrasellüler metabolitler

	Ekstrasellüler Metabolit	Metabolit Kısaltması
1	1.2-cyclohexanedione	ESM 1
2	10-hydroxydecanoic acid	ESM 2
3	2-deoxyuridine	ESM 3
4	2-isopropylmalic acid	ESM 4
5	2-ketoadipic acid	ESM 5
6	2-keto-l-gulonic acid	ESM 6
7	2-piperidone	ESM 7
8	3-aminopropionitrile	ESM 8
9	3-hydroxypropanoic acid	ESM 9
10	3-methyl-2-oxobutanoic acid	ESM 10
11	3-ureidopropionate	ESM 11
12	4-hydroxybenzyl cyanide	ESM 12
13	4-isopropylbenzoic acid	ESM 13
14	4-methyl-5-thiazoleethanol	ESM 14
15	5.6 - dimethylbenzimidazole	ESM 15
16	6-deoxy-d-glucose	ESM 16
17	6-hydroxy caproic acid	ESM 17
18	7.8-dimethylalloxazine	ESM 18
19	Acetoacetate	ESM 19
20	Acetol	ESM 20
21	Acetylisatin	ESM 21
22	Acetyl-l-serine	ESM 22
23	Alanine	ESM 23
24	Allo-inositol	ESM 24
25	Allose	ESM 25
26	Aspartic acid	ESM 26
27	Benzoic acid	ESM 27
28	Benzylsuccinic acid	ESM 28
29	Beta- alanine	ESM 29
30	Biphenyl	ESM 30
31	Capric acid	ESM 31
32	Caprylic acid	ESM 32
33	Cellotetraose	ESM 33
34	Cholesterol	ESM 34
35	Cis-4-hydroxycyclohexanecarboxylic acid	ESM 35
36	Dehydroascorbic acid	ESM 36
37	Dihydrocarveol	ESM 37
38	Dithiothreitol	ESM 38
39	Fructose	ESM 39

	Ekstrasellüler Metabolit	Metabolit Kısaltması
40	Fucose	ESM 40
41	Galactinol	ESM 41
42	Galactono-gamma-lactone	ESM 42
43	Galactose	ESM 43
44	Glucoheptonic acid	ESM 44
45	Gluconic acid	ESM 45
46	Gluconic acid lactone	ESM 46
47	Glucosamine phosphate	ESM 47
48	Glucosaminic acid	ESM 48
49	Glucose	ESM 49
50	Glucuronic acid	ESM 50
51	Glutamic acid 1	ESM 51
52	Glutamic acid 2	ESM 52
53	Glyceraldehyde	ESM 53
54	Glyceric acid	ESM 54
55	Glycerol	ESM 55
56	Glycolic acid	ESM 56
57	Gulonic acid gamma-lactone	ESM 57
58	Halostachine	ESM 58
59	Heptadecanoic acid	ESM 59
60	Isomaltose	ESM 60
61	Lactamide	ESM 61
62	Lactic acid	ESM 62
63	Linoleic acid	ESM 63
64	Lysine	ESM 64
65	Lyxose	ESM 65
66	Lyxosylamine	ESM 66
67	Malonamide	ESM 67
68	Malonic acid	ESM 68
69	Mannitol	ESM 69
70	Mannose	ESM 70
71	Menthone	ESM 71
72	Methionine sulfoxide	ESM 72
73	Methyl linolenate	ESM 73
74	Methyl oleate	ESM 74
75	Methyl palmitate	ESM 75
76	Methyl palmitoleate	ESM 76
77	Methyl stearate	ESM 77
78	Methyl-beta-d-galactopyranoside	ESM 78
79	Mono(2-ethylhexyl)phthalate	ESM 79
80	Myo-inositol	ESM 80
81	Myristic acid	ESM 81

	Ekstrasellüler Metabolit	Metabolit Kısaltması
82	N-acetyl-d-glucosamine	ESM 82
83	N-acetyl-l-aspartic acid	ESM 83
84	N-acetyl-l-glutamic acid	ESM 84
85	N-cyclohexylformamide	ESM 85
86	N-ethylglycine	ESM 86
87	Nicotinamide	ESM 87
88	N-methylglutamic acid	ESM 88
89	Oleic acid	ESM 89
90	Palmitic acid	ESM 90
91	Palmitoleic acid	ESM 91
92	Pantothenic acid	ESM 92
93	Phenylacetaldehyde	ESM 93
94	Phosphoenolpyruvic acid	ESM 94
95	Phosphoric acid	ESM 95
96	Pimelic acid	ESM 96
97	Purine riboside	ESM 97
98	Ribitol	ESM 98
99	Ribonic acid-gamma-lactone	ESM 99
100	S-carboxymethylcysteine	ESM 100
101	Sedoheptulose anhydride monohydrate	ESM 101
102	Serine	ESM 102
103	Shikimic acid	ESM 103
104	Sinapyl alcohol	ESM 104
105	Sorbitol	ESM 105
106	Sorbose	ESM 106
107	Squalene	ESM 107
108	Stearic acid	ESM 108
109	Tagatose	ESM 109
110	Talose	ESM 110
111	Threitol	ESM 111
112	Threonine	ESM 112
113	Threose	ESM 113
114	Tyrosine methyl ester	ESM 114
115	Urethane	ESM 115
116	Xylitol	ESM 116

Tablo 4.9 Besiyeri eklentileri (FBS, PL, KİP, PPP)'nin tanımlanan bu ekstraselüler metabolitlere göre karşılaştırmalı içerikleri ve bağlı derişimleri.*

Metabolit İsmi	FBS	PL	KIP	PPP
1.2-cyclohexanedione	0.02±0	0.01±0	0.07±0.03	0±0
10-hydroxydecanoic acid	0.65±0.04	1.16±0.57	1.8±0.46	1.59±0.06
2-deoxyuridine	1.69±0.43	0.15±0.01	0.08±0.01	0.05±0
2-isopropylmalic acid	1.97±0.15	0.41±0	2.59±0.72	0.6±0.06
2-ketoadipic acid	0.39±0.02	0.07±0	0.12±0	0.03±0
2-keto-l-gulonic acid	0.03±0	1.29±0.02	1.45±0.29	3.59±0.42
2-piperidone	0.25±0.08	0.13±0.01	0.09±0.01	0.03±0
3-aminopropionitrile	0.09±0.02	0.09±0.01	0.12±0.02	0.06±0.01
3-hydroxypropanoic acid	0.83±0.04	0.24±0	0.81±0.02	0.35±0.03
3-methyl-2-oxobutanoic acid	0.43±0.08	0.04±0	0.14±0.01	0.03±0
3-ureidopropionate	0.1±0.03	0.58±0	0.18±0.08	0.4±0.04
4-hydroxybenzyl cyanide	0.29±0.09	0.09±0	0.06±0.01	0.05±0
4-isopropylbenzoic acid	0.24±0.05	0.16±0.01	0.04±0.01	0.02±0
4-methyl-5-thiazoleethanol	0.31±0.04	0.17±0.01	0.14±0.03	0±0
5.6 - dimethylbenzimidazole	2.25±0.64	0.09±0.02	0.2±0.04	0.12±0.01
6-deoxy-d-glucose	0.88±0.01	0.92±0.02	0.84±0.1	0.85±0.04
6-hydroxy caproic acid	0.17±0.05	0.3±0.02	0.42±0.07	0.06±0.01
7.8-dimethylalloxazine	0.62±0.3	0.02±0	0.02±0	0.75±0.1
Acetoacetate	0.81±0.08	0.02±0	0.47±0.05	0.23±0.02
Acetol	1.74±0.24	0.9±0.03	1.08±0.15	1.41±0.17
Acetylisatin	7.4±0.14	1.68±0.02	0.08±0.02	0.05±0
Acetyl-l-serine	0.88±0.04	0.02±0	0.04±0	0.11±0
Alanine	0.14±0.03	0.13±0.06	0.42±0.16	0.08±0.03
Allo-inositol	2.99±0.31	0.34±0.01	0.3±0.04	0.88±0.03
Allose	0.02±0.02	0.33±0.01	1.95±0.22	0.58±0.04
Aspartic acid	4.88±0.3	0.05±0.01	0.03±0.01	0.21±0
Benzoic acid	0.08±0.01	6.42±0.39	0.12±0	0.09±0.03
Benzylsuccinic acid	0.68±0.06	0.82±0.03	1.15±0.19	0.98±0.05
Beta- alanine	2.53±0.07	0.93±0.04	0.37±0.06	0.24±0.01
Biphenyl	7.15±0.68	0.07±0	0.47±0.01	0.24±0.02
Capric acid	0.4±0.22	0.11±0.03	2.01±0.44	0.14±0.01
Caprylic acid	0.2±0.04	0.41±0.01	1.25±0.15	0.1±0
Cellotetraose	0±0	0±0	0±0	0±0
Cholesterol	2.81±1.07	0.26±0.02	1.5±0.49	1.6±0.3
Cis-4-hydroxycyclohexanecarboxylic acid	0.06±0.01	0.05±0.01	0.02±0	0.01±0
Dehydroascorbic acid	0.57±0.22	1.13±0.03	1.81±0.07	1.26±0.08
Dihydrocarveol	0.16±0	0.11±0	0.51±0.34	0.03±0
Dithiothreitol	1.57±0.06	0.49±0.02	1.58±0.04	0.19±0.01
Fructose	1.29±0.01	1.7±0.06	1.08±0.18	0.5±0.04
Fucose	8.46±0.81	0.26±0.01	0.28±0.05	2.15±0.12
Galactinol	0.28±0.06	0.1±0.02	0.07±0.01	0.05±0.01
Galactono-gamma-lactone	0.08±0.02	0.03±0	0.76±0.57	0.78±0.62

Metabolit İsmi	FBS	PL	KIP	PPP
Galactose	0.41±0.01	0.9±0.01	1.08±0.04	1.33±0.43
Glucoheptonic acid	1.48±0.65	0.4±0.02	0.21±0.02	0.2±0.03
Gluconic acid	1.01±0.09	1.32±0.01	1.59±0.8	2.64±0.06
Gluconic acid lactone	0.03±0	0.94±0.02	1.57±0.1	0.36±0.14
Glucosamine phosphate	5.88±0.25	0.83±0.01	0.64±0.26	0.76±0.15
Glucosaminic acid	0.7±0.06	0.26±0.01	0.04±0.01	0.09±0.02
Glucose	0.26±0.02	1.01±0.01	0.68±0.28	0.01±0
Glucuronic acid	0.13±0.01	0.83±0.04	1.54±0.17	1.32±0.08
Glutamic acid 1	0.7±0.16	0.13±0.01	0.25±0.02	0.07±0
Glutamic acid 2	0.19±0.05	0.07±0	0.1±0.02	0.03±0
Glyceraldehyde	1.12±0.08	0.05±0	0.2±0.02	0.08±0.01
Glyceric acid	0.22±0.1	0.04±0	0.4±0.07	0.03±0
Glycerol	0.26±0.06	0.16±0.01	0.09±0.01	0.06±0
Glycolic acid	0.09±0.02	0±0	0.09±0.01	0.01±0
Gulonic acid gamma-lactone	0.37±0.07	0.13±0	0.11±0.01	0.2±0.01
Halostachine	0.48±0.11	0.93±0.03	0.68±0.12	0.15±0.01
Heptadecanoic acid	0.4±0.14	0.23±0.11	0.21±0.06	0.16±0.03
Isomaltose	2.18±1.65	0.06±0.01	0.04±0.01	0.03±0
Lactamide	0.34±0.08	0.18±0	0.09±0.01	0.07±0
Lactic acid	0.77±0.28	0.02±0.01	0.51±0.01	0.19±0
Linoleic acid	0.73±0.23	0.26±0.03	0.4±0.11	0.12±0.01
Lysine	11.69±1.91	0.42±0.18	0.21±0.02	1.83±0.24
Lyxose	2.57±0.21	1.47±0.07	1.2±0.1	0.18±0.02
Lyxosylamine	2.65±0.15	1.5±0.08	1.22±0.1	0.19±0.02
Malonamide	1.71±0.41	0.13±0.01	0.36±0.05	0.23±0.01
Malonic acid	0.32±0.07	0.12±0.01	0.09±0	0.07±0
Mannitol	0.93±0.09	0.82±0.01	3.59±0.15	2.44±0.05
Mannose	0.4±0.01	0.89±0.01	0.63±0.5	1.87±0.05
Menthone	0.2±0.04	0.74±0.05	0.1±0.01	0.08±0
Methionine sulfoxide	0.37±0.02	1.2±0.03	1.14±0.05	0.71±0.02
Methyl linolenate	0.2±0.04	1.72±0.05	1.17±0.08	0.5±0.04
Methyl oleate	0.31±0.05	0.69±0.02	0.65±0.04	0.25±0.02
Methyl palmitate	0.39±0.06	0.33±0.01	0.34±0	0.29±0.01
Methyl palmitoleate	0.33±0.08	0.8±0.01	0.3±0.12	0.69±0.02
Methyl stearate	0.28±0.06	0.1±0	0.07±0.01	0.06±0
Methyl-beta-d-galactopyranoside	2.4±1.39	0.96±0.02	1.53±0.07	1.12±0.05
Mono(2-ethylhexyl) phthalate	0.06±0.01	4.82±0.29	0.07±0.01	0.06±0
Myo-inositol	1.12±0.06	0.06±0	0.04±0	0.01±0
Myristic acid	0.74±0.05	0.66±0.02	1.08±0.06	0.8±0.05
N-acetyl-d-glucosamine	0.21±0.1	0.07±0.01	0.09±0	0.07±0.01
N-acetyl-l-aspartic acid	0.68±0.06	0.09±0	0.02±0	0.01±0
N-acetyl-l-glutamic acid	0.29±0.06	0.14±0	0.09±0	0.07±0
N-cyclohexylformamide	0.2±0.06	0.13±0.01	0.08±0.01	0.04±0
N-ethylglycine	0.23±0.04	0.31±0.03	0.08±0	0.07±0
Nicotinamide	0.28±0.05	0.13±0	0.1±0.01	0.07±0

Metabolit İsmi	FBS	PL	KIP	PPP
N-methylglutamic acid	0.07±0.01	0.02±0	0.02±0.01	0.01±0
Oleic acid	0.17±0.06	0.09±0.01	0.29±0.09	0.07±0.01
Palmitic acid	0.37±0.09	0.38±0.04	0.52±0.11	0.62±0.05
Palmitoleic acid	0.31±0.16	0.06±0.01	0.13±0.04	0.09±0
Pantothenic acid	0.68±0.05	0.48±0	0.08±0.04	0.07±0.03
Phenylacetaldehyde	0.47±0.15	0.1±0	0.1±0.01	0.11±0
Phosphoenolpyruvic acid	2.65±0.85	1.09±0.04	1.41±0.1	0.36±0.02
Phosphoric acid	0.02±0	0.02±0	4.12±0.77	0.01±0
Pimelic acid	0.16±0.04	0.05±0	0.13±0.01	0.06±0.01
Purine riboside	0.41±0.05	0.11±0	0.07±0	0.03±0
Ribitol	8.39±0.8	1.43±0.01	0.11±0.03	2.1±0.11
Ribonic acid- gamma-lactone	4.56±0.19	0.29±0.02	0.16±0.08	0.2±0.03
S-carboxymethylcysteine	7.92±0.76	1.36±0.01	0.27±0.04	2.02±0.11
Sedoheptulose anhydride monohydrate	0.01±0	1.63±0.02	1.61±0.04	1.16±0.02
Serine	0.11±0.03	0.03±0	0.25±0.01	0.06±0.01
Shikimic acid	2.74±0.35	2.01±0.02	0.97±0.05	2.39±0.06
Sinapyl alcohol	0.03±0.01	0.02±0	0.01±0	0.01±0
Sorbitol	0.15±0.01	1.05±0.01	0.84±0.11	1.42±0.04
Sorbose	1.79±0.02	0.09±0.07	0.3±0.17	0.75±0.03
Squalene	0.21±0.03	0.17±0.04	0.13±0.02	0.06±0.01
Stearic acid	0.51±0.15	0.22±0.02	0.68±0.14	0.26±0.03
Tagatose	2.43±1.46	0.87±0.02	1.38±0.06	1±0.05
Talose	0.42±0.16	0.49±0.02	0.35±0.03	1.02±0.06
Threitol	0.7±0.07	0.16±0.05	0.17±0.03	0.09±0.06
Threonine	4.16±0.25	0.04±0.01	0.44±0.03	0.36±0.01
Threose	0.14±0.01	0.01±0	0.02±0	0.02±0
Tyrosine methyl ester	0.68±0.03	0.8±0.01	0.96±0.06	1.04±0.04
Urethane	0.33±0.03	0.59±0.14	0.08±0.01	0.06±0
Xylitol	5.38±0.25	0.95±0.01	1.24±0.53	0.04±0.01

* Normalize edilmiş verilerin ortalama ± standart hata'sı

Tablo 4.10 Kültür besiyerleri (DMFBS, DMPL, DMKİP, DMPPP, DMFBSLPS, DMPLPS, DMKİPLPS, DMPPPLPS)'nin içerikleri ve bağlı derişimleri.*

Metabolit ismi	DM FBS	DM PL	DM KİP	DM PPP	DM FBS LPS	DM PL LPS	DM KİP LPS	DM PPP LPS
1.2-cyclohexanedione	2.37±0.79	5.14±0.9	7.21±0.66	0.74±0.11	2.74±1.47	2.18±1.77	0.02±0.01	0.9±1.12
10-hydroxydecanoic acid	0.38±0.06	0.17±0.02	0.32±0.08	0.74±0.07	0.42±0.12	1.81±0.67	2.09±0.47	1.21±1.18
2-deoxyuridine	2.39±0.61	2.14±0.41	0.21±0.02	0.13±0.01	1.61±0.71	0.51±0.37	0.07±0.01	0.12±0.01
2-isopropylmalic acid	4.05±0.56	0.33±0.04	0.49±0.04	0.16±0.02	2.6±0.43	0.41±0.03	1.11±0.47	0.33±0.11
2-ketoadipic acid	0.9±0.16	0.34±0.03	0.05±0	0.02±0	0.45±0.1	0.16±0.06	0.05±0.01	0.03±0
2-keto-l-gulonic acid	0.17±0.09	0.04±0.01	0.1±0.01	0.06±0.01	0.1±0.04	0.79±0.3	5.31±1.75	0.73±0.85
2-piperidone	1.16±0.39	3.68±0.59	0.39±0.03	0.22±0.02	1.72±0.63	1.42±1.09	0.07±0.02	0.25±0.1
3-aminopropionitrile	1.02±0.45	3.97±0.36	1.27±0.09	0.57±0.03	1.91±0.67	1.43±0.99	0.22±0.05	0.75±0.49
3-hydroxypropanoic acid	2.23±0.18	0.9±0.29	1.24±0.09	0.56±0.03	2.53±0.12	0.51±0.21	0.35±0.08	0.62±0.09
3-methyl-2-oxobutanoic acid	3.29±0.69	1.01±0.19	1.87±0.14	0.76±0.05	2.21±0.7	0.31±0.23	0.15±0.07	0.85±0.66
3-ureidopropionate	0.5±0.28	0.69±0.08	8.55±1.05	1.36±0.06	0.76±0.22	0.31±0.16	0.03±0.01	3.96±11.3
4-hydroxybenzyl cyanide	0.84±0.27	4.13±0.7	0.31±0.02	0.21±0.02	1.62±0.73	1.29±0.97	0.07±0.01	0.26±0.11
4-isopropylbenzoic acid	3.19±0.9	3.31±0.43	0.68±0.02	0.3±0.02	3.97±1.87	0.96±0.72	0.16±0.02	0.4±0.17
4-methyl-5-thiazoleethanol	3±0.41	3.57±0.37	1.67±0.13	0.52±0.01	3.15±1.01	1.22±0.81	0.19±0.01	0.71±0.49
5.6- dimethylbenzimidazole	0.87±0.19	1.15±0.24	0.75±0.01	0.86±0.02	1.29±0.48	0.37±0.23	0.06±0.02	0.7±0.3
6-deoxy-d-glucose	0.76±0.09	0.81±0.07	3±0.08	3.12±0.06	0.88±0.1	0.45±0.19	0.3±0.08	2.42±1.73
6-hydroxy caproic acid	1.78±0.4	3.28±0.52	2.7±0.14	1.05±0.13	2.24±0.61	1.32±1.02	0.06±0.01	1.4±1.64
7.8-dimethylalloxazine	0.15±0.03	0.41±0.04	0.05±0.01	1.78±0.27	0.19±0.1	0.15±0.1	0.6±0.22	1.46±0.19
Acetoacetate	1.5±0.64	5.32±0.72	2.16±0.25	0.64±0.03	2.68±0.94	2.17±1.64	0.22±0.03	0.79±0.52
Acetol	0.93±0.15	0.45±0.04	0.92±0.06	0.32±0.02	1.12±0.24	0.36±0.03	1.9±0.28	0.52±0.1

Metabolit ismi	DM FBS	DM PL	DM KIP	DM PPP	DM FBS LPS	DM PL LPS	DM KIP LPS	DM PPP LPS
Acetylisatin	3.73±0.63	0.29±0.05	0.11±0.01	0.3±0.03	1.79±0.48	0.36±0.07	0.09±0.03	0.38±0.07
Acetyl-L-serine	2.83±1.5	0.4±0.06	9.99±1	0.97±0.14	4.58±2.11	0.22±0.15	0.14±0.02	1.19±1.64
Alanine	4.95±1.3	0.51±0.39	1.56±0.05	0.57±0.11	1.75±1.14	1.49±0.81	0.42±0.14	0.8±0.42
Allo-inositol	0.43±0.3	0.06±0	0.01±0	0.06±0.01	1.61±0.49	0.72±0.28	0.86±0.16	0.22±0.12
Allose	0.22±0.02	0.12±0.03	1.68±0.17	4.13±0.11	0.24±0.09	0.04±0.02	0.81±0.42	3.04±2.38
Aspartic acid	1.09±0.36	1.49±0.2	0.58±0.06	0.41±0.03	2.06±1.17	0.49±0.36	0.04±0.01	0.32±0.11
Benzoic acid	0.44±0.09	4.37±0.3	0.45±0.14	0.25±0	0.54±0.18	1.39±0.94	0.07±0.02	0.28±0.06
Benzylsuccinic acid	2.07±0.36	0.09±0.03	0.46±0.06	0.77±0.07	1.33±0.33	0.93±0.36	0.87±0.21	1.09±0.14
Beta- alanine	4.73±0.84	0.9±0.18	1.24±0.43	0.44±0.1	2.34±0.46	0.64±0.19	0.36±0.08	0.27±0.07
Biphenyl	0.62±0.18	1.35±0.2	0.44±0.04	0.22±0.02	1.14±0.23	0.46±0.27	0.15±0.02	0.4±0.12
Capric acid	1.72±0.73	2.09±0.31	2.44±0.13	0.72±0.04	1.79±0.6	0.76±0.54	0.61±0.11	0.65±0.31
Caprylic acid	0.48±0.11	3.72±0.36	2.39±0.22	0.11±0.02	0.73±0.27	1.2±0.9	0.44±0.08	0.13±0.03
Cellotetraose	0.01±0	0.05±0	0±0	0±0	0.03±0.01	0.03±0.02	0±0	0±0
Cholesterol	0.64±0.13	1.02±0.19	0.3±0.01	0.3±0.05	1.02±0.51	0.3±0.2	0.19±0.05	0.22±0.02
Cis-4-hydroxycyclohexanecarboxylic acid	1.19±0.44	5.63±0.45	0.83±0.07	0.15±0	1.87±0.71	2.27±1.79	0.03±0	0.22±0.12
Dehydroascorbic acid	1.01±0.28	0.37±0.12	0.35±0.18	1.82±0.72	0.59±0.11	0.73±0.13	1.25±0.15	1.55±1.04
Dihydrocarveol	5.18±2.43	3.6±0.61	1.82±0.25	0.28±0.02	3.26±1.3	1.45±1.13	0.06±0.03	0.35±0.17
Dithiothreitol	2.81±0.44	1.09±0.1	0.4±0.02	0.21±0.02	2.83±0.76	0.73±0.27	0.43±0.09	0.23±0.01
Fructose	2.04±0.36	0.09±0.03	0.36±0.07	0.97±0.1	1.34±0.45	1.17±0.46	0.26±0.21	0.87±0.23
Fucose	1±0.07	0.68±0.02	1.88±0.02	1.78±0.06	0.91±0.17	0.29±0.17	0.19±0.01	1.43±0.96
Galactinol	1.06±0.36	2.72±0.4	0.33±0.03	0.2±0.03	1.76±0.82	1.12±0.82	0.1±0.01	0.26±0.1
Galactono-gamma-lactone	0.09±0.02	0.26±0.02	0.04±0	0.05±0	0.16±0.06	0.21±0.16	3.22±1.27	1.35±2.48
Galactose	0.88±0.11	0.07±0.02	0.22±0.03	0.62±0.05	0.65±0.18	1.05±0.43	1.48±0.58	1.23±0.71
Glucoheptonic acid	0.95±0.22	2.03±0.24	0.22±0.02	0.1±0.01	1.54±0.53	0.76±0.54	0.19±0.03	0.17±0.01

Metabolit ismi	DM FBS	DM PL	DM KIP	DM PPP	DM FBS LPS	DM PL LPS	DM KIP LPS	DM PPP LPS
Gluconic acid	0.03±0.01	0.07±0.01	0.01±0	0.05±0	0.05±0.01	0.16±0.03	3.19±0.17	0.99±1.53
Gluconic acid lactone	1.56±0.5	2.45±0.31	3.32±0.09	1.54±0.2	1.52±0.71	1.49±0.54	0.66±0.33	1.87±0.41
Glucosamine phosphate	1.59±0.25	0.62±0.05	1.64±0.03	1.92±0.12	1.09±0.15	0.58±0.04	0.26±0.03	0.95±0.66
Glucosaminic acid	1.62±0.39	1.83±0.17	0.22±0.01	0.09±0	2.15±0.75	0.78±0.6	0.02±0	0.15±0.05
Glucose	1.61±0.16	1.98±0.15	2.27±0.07	1.62±0.05	1.82±0.21	1.32±0.3	0.01±0	1.65±1.55
Glucuronic acid	0.7±0.09	0.32±0.04	1.61±0.04	1.98±0.02	0.81±0.13	0.37±0.06	1.86±0.23	1.91±0.1
Glutamic acid 1	2.21±0.4	2.69±0.37	1.62±0.37	0.43±0.2	1.96±0.34	0.9±0.65	0.07±0.03	0.5±0.36
Glutamic acid 2	2.07±0.45	6±0.24	1.96±0.1	0.36±0.06	3.16±1.65	2.98±2.13	0.12±0.03	0.58±0.39
Glyceraldehyde	3.38±0.18	4.39±0.61	5.15±1.51	0.61±0.03	2.95±1.3	1.5±1.17	0.16±0.05	0.71±0.39
Glyceric acid	2.01±0.26	1.19±0.19	5.4±0.88	1.86±0.17	1.39±0.28	0.49±0.38	0.15±0.09	1.54±1.68
Glycerol	0.91±0.33	4.93±0.86	0.45±0.05	0.22±0.01	1.48±0.53	1.77±1.36	0.06±0.02	0.27±0.12
Glycolic acid	2.21±0.69	3.67±0.46	0.8±0.05	0.23±0.03	3.38±1.53	1.13±0.89	0.07±0.02	0.28±0.14
Gulonic acid gamma-lactone	1.53±0.57	3.14±0.43	0.22±0.02	0.15±0.02	1.98±0.85	1.15±0.82	0.29±0.07	0.22±0.05
Halostachine	0.64±0.21	4.22±0.42	2.05±0.2	0.53±0.06	0.82±0.31	1.56±1.22	0.21±0.03	0.5±0.22
Heptadecanoic acid	0.45±0.09	0.96±0.12	0.19±0.03	0.09±0.02	0.85±0.34	0.33±0.2	0.14±0.01	0.1±0.01
Isomaltose	0.43±0.11	1.44±0.16	0.15±0	0.09±0.01	0.77±0.29	0.66±0.48	0.06±0	0.11±0.02
Lactamide	0.99±0.45	4.04±0.7	0.38±0.03	0.28±0.01	1.53±0.59	0.31±0.1	0.06±0.03	0.35±0.17
Lactic acid	2.06±0.31	1.87±0.19	4.53±0.5	1.97±0.23	2.1±0.65	0.83±0.66	0.15±0.08	1.56±1.84
Linoleic acid	0.59±0.12	0.74±0.04	0.35±0	0.21±0.02	0.54±0.02	0.34±0.2	0.17±0.02	0.22±0.02
Lysine	0.06±0.02	0.15±0.01	0.05±0.01	0.52±0.04	0.17±0.08	0.33±0.1	1.66±1.08	0.59±0.03
Lyxose	2.57±0.51	0.74±0.17	0.35±0.01	0.16±0.04	1.92±0.6	0.61±0.06	0.43±0.02	0.16±0.01
Lyxosylamine	2.61±0.53	0.72±0.19	0.35±0.01	0.13±0.02	1.95±0.62	0.61±0.06	0.44±0.02	0.16±0.01
Malonamide	2.52±0.26	1.15±0.06	3.04±0.26	1.45±0.04	1.82±0.6	0.74±0.45	0.3±0.09	1.66±1.61
Malonic acid	1.15±0.36	3.25±0.45	0.35±0.03	0.21±0.02	1.43±0.5	1.24±0.91	0.1±0.01	0.25±0.09
Mannitol	0.02±0.01	0.06±0.01	0.01±0	0.04±0	0.05±0	0.12±0.02	2.95±0.16	0.93±1.4

Metabolit ismi	DM FBS	DM PL	DM KIP	DM PPP	DM FBS LPS	DM PLLPS	DM KIP LPS	DM PPP LPS
Mannose	0.86±0.11	0.07±0.02	0.21±0.03	0.6±0.05	0.63±0.18	1.56±0.72	2.12±0.24	1.1±0.5
Menthone	0.63±0.14	3.69±0.44	0.31±0.06	0.11±0	0.93±0.4	1.2±0.84	0.08±0.01	0.12±0.02
Methionine sulfoxide	0.87±0.18	0.08±0.02	0.25±0.02	0.64±0.14	0.65±0.24	0.88±0.33	1.07±0.22	1±0.17
Methyl linolenate	0.7±0.22	5.19±0.72	0.89±0.06	0.27±0.03	0.89±0.36	1.8±1.31	0.28±0.02	0.27±0.09
Methyl oleate	1.06±0.33	3.89±0.53	0.63±0.05	0.22±0.03	1.42±0.57	1.4±1.04	0.17±0.01	0.23±0.08
Methyl palmitate	1.86±0.76	2.86±0.38	0.61±0.03	0.3±0.12	2.2±0.81	1.22±0.8	0.46±0.03	0.53±0.09
Methyl palmitoleate	0.53±0.15	2.18±0.21	0.39±0.04	0.11±0.03	0.73±0.29	0.84±0.59	1.97±0.78	0.91±1.12
Methyl stearate	1.07±0.36	2.98±0.31	0.29±0.03	0.19±0.03	1.84±0.83	1.15±0.85	0.09±0.01	0.25±0.09
Methyl-beta-d-galactopyranoside	0.77±0.16	0.35±0.05	0.63±0.02	2.08±0.13	0.83±0.31	0.54±0.08	1.07±0.13	1.42±0.63
Mono(2-ethylhexyl)phthalate	0.23±0.07	5.62±0.48	0.12±0.02	0.07±0.01	0.29±0.15	1.76±1.05	0.04±0.01	0.09±0.02
Myo-inositol	1.7±0.35	1.53±0.1	0.26±0.01	0.12±0	2.12±0.69	0.63±0.44	0.13±0.01	0.19±0.04
Myristic acid	0.72±0.2	0.49±0.07	1.38±0.4	2.16±0.03	0.69±0.22	0.4±0.05	1.05±0.09	2.32±0.48
N-acetyl-d-glucosamine	0.92±0.28	3.2±0.33	0.31±0.05	0.18±0.02	1.63±0.67	1.23±0.93	0.1±0.01	0.23±0.08
N-acetyl-l-aspartic acid	1.21±0.35	2.78±0.48	0.25±0.02	0.27±0.02	1.58±0.81	1.06±0.82	0.05±0.02	0.33±0.15
N-acetyl-l-glutamic acid	1.05±0.36	3.16±0.33	0.33±0.03	0.18±0.02	1.67±0.7	1.18±0.87	0.08±0.01	0.22±0.08
N-cyclohexylformamide	0.98±0.3	3.79±0.42	0.37±0.04	0.21±0.01	1.51±0.62	1.22±0.94	0.07±0.02	0.23±0.08
N-ethylglycine	0.72±0.2	2.87±0.34	0.28±0.02	0.18±0.01	1.09±0.45	1.04±0.75	0.07±0	0.25±0.08
Nicotinamide	1.08±0.36	3.2±0.4	0.4±0.03	0.21±0.01	1.66±0.68	1.2±0.88	0.09±0.01	0.26±0.09
N-methylglutamic acid	1.02±0.69	6.87±0.44	0.03±0.01	0.04±0	1.4±0.85	4.2±3.33	0.02±0	0.05±0
Oleic acid	0.1±0.03	0.16±0.01	0.04±0	0.09±0.02	0.07±0.03	0.05±0.04	0.09±0.01	0.05±0
Palmitic acid	0.21±0.1	0.13±0.01	0.29±0.04	0.62±0.02	0.09±0.02	0.07±0.03	0.54±0.03	0.49±0.05
Palmitoleic acid	0.38±0.13	0.69±0.15	0.06±0.01	0.11±0.03	0.34±0.12	0.04±0.01	0.13±0.02	0.06±0
Pantothenic acid	0.08±0.03	1.05±0.76	0.03±0	0.01±0	1.35±1.05	0.92±0.74	0.04±0.01	0.24±0.09
Phenylacetaldehyde	1.02±0.32	3.32±0.48	0.32±0.03	0.25±0.02	1.84±0.9	1.2±0.83	0.13±0.01	0.31±0.12
Phosphoenolpyruvic acid	4.25±0.71	0.14±0.01	0.25±0.03	0.06±0.01	2.4±0.65	0.44±0.15	0.69±0.1	0.14±0.02

Metabolit ismi	DM FBS	DM PL	DM KIP	DM PPP	DM FBS LPS	DM PL LPS	DM KIP LPS	DM PPP LPS
Phosphoric acid	5.76±4.63	0.18±0.01	7.75±1.26	2.07±1.04	0.24±0.1	0.07±0.05	1.23±0.83	1.13±1.96
Pimelic acid	2.16±0.61	3.9±0.96	1.31±0.1	0.62±0.03	3.19±1.43	1.06±0.69	0.25±0.04	0.76±0.44
Purine riboside	1.44±0.45	3.75±0.56	0.28±0.01	0.09±0	1.69±0.64	1.35±1.01	0.07±0.01	0.13±0.03
Ribitol	1±0.06	0.68±0.02	1.87±0.02	1.76±0.06	1.2±0.2	0.37±0.13	0.15±0.04	0.96±0.47
Ribonic acid-gamma-lactone	1.4±0.21	2.13±0.12	2.21±0.39	0.19±0.06	1.7±0.19	0.94±0.63	0.24±0.09	0.68±0.41
S-carboxymethylcysteine	0.94±0.06	0.64±0.02	1.76±0.02	1.67±0.05	1.13±0.19	0.31±0.14	0.18±0.01	1.34±0.87
Sedoheptulose anhydride monohydrate	0±0	0.01±0	3.67±0.11	2.62±0.08	0.74±0.6	1.04±0.42	1.44±0.06	1.19±0.91
Serine	3.64±0.46	2.13±0.17	5.75±0.53	1.76±0.11	3.53±1.14	0.62±0.48	0.13±0.08	1.95±2.65
Shikimic acid	1.5±0.49	0.14±0.02	1.39±0.09	1.57±0.15	0.76±0.34	0.61±0.2	0.49±0.14	1.8±0.27
Sinapyl alcohol	0.06±0.03	0.26±0.04	0.02±0	0.01±0	0.07±0.02	0.09±0.07	0.01±0	0.01±0
Sorbitol	0.82±0.1	0.37±0.04	1.87±0.06	1.85±0.32	0.96±0.18	0.42±0.07	1.99±0.24	1.72±0.37
Sorbose	2.88±0.58	0.15±0.04	0.72±0.09	1.24±0.14	1.26±0.16	0.52±0.15	0.54±0.17	1.21±0.2
Squalene	1.28±0.3	2.26±0.44	0.33±0.05	0.17±0.07	1.56±0.53	1.69±1.34	0.05±0.01	0.13±0.03
Stearic acid	0.3±0.1	0.27±0.04	0.14±0.02	0.35±0.03	0.17±0.05	0.1±0.07	0.3±0.04	0.24±0
Tagatose	0.84±0.18	0.43±0.03	1.69±0.03	1.9±0.12	0.77±0.27	0.57±0.11	0.96±0.12	1.82±0.28
Talose	0.35±0.14	5.09±0.4	0.06±0.01	1.47±1.1	0.17±0.05	2.22±1.26	1.11±0.34	0.2±0.03
Threitol	1.57±0.2	1.86±0.52	3.31±0.29	1.88±0.06	1.16±0.36	0.92±0.7	0.09±0.02	1.45±1
Threonine	2.05±0.74	0.3±0.12	1.54±0.45	0.6±0.03	1.98±0.89	0.46±0.3	0.52±0.02	1.14±0.56
Threose	0.12±0.04	0.32±0.05	0.06±0	0.04±0	0.13±0.04	0.09±0.06	0.04±0	0.03±0
Tyrosine methyl ester	1.32±0.21	0.07±0.02	0.27±0.05	0.87±0.09	0.99±0.3	1±0.42	0.82±0.26	1.01±0.16
Urethane	1.02±0.1	3.36±0.5	0.3±0.02	0.09±0.02	1.32±0.51	1.18±0.84	0.04±0.01	0.1±0.01
Xylitol	1.25±0.14	0.63±0.06	3.92±1.47	0.35±0.03	1.46±0.15	0.19±0.11	0.08±0.03	2.46±4.97

* Normalize edilmiş verilerin ortalama ± standart hata'sı

Tablo 4.11 Kültür süpernatantları (DMFBS medsup, DMPL medsup, DMKIP medsup, DMPPP medsup, DMFBSLPS medsup, DMPLLLPS medsup, DMKIPLPS medsup, DMPPPPLPS medsup)'nin içerikleri ve bağlı derişimleri.*

Metabolit ismi	DM FBS MED SUP	DM PL MED SUP	DM KIP MED SUP	DM PPP MED SUP	DM FBS LPS MED SUP	DM PL LPS MED SUP	DM KIP LPS MED SUP	DM PPP LPS MED SUP
1.2-cyclohexanedione	0.36±0.1	0.1±0	0.26±0.19	0.09±0.06	0.48±0.14	0.11±0.04	0±0	0.07±0.05
10-hydroxydecanoic acid	0.19±0.07	0.07±0	2.01±0.35	2.52±0.56	0.1±0.02	0.01±0	2.5±0.14	1.67±0.55
2-deoxyuridine	2.02±0.21	0.21±0	0.06±0.01	0.09±0.01	1.57±0.1	0.27±0.04	0.06±0	0.09±0.01
2-isopropylmalic acid	0.27±0.03	0.03±0	0.92±0.23	0.7±0.1	0.34±0.05	0.13±0.01	0.56±0.13	0.58±0.1
2-ketoadipic acid	0.36±0.03	0.03±0	0.04±0	0.02±0	0.33±0.02	0.08±0.01	0.03±0	0.02±0
2-keto-l-gulonic acid	0.01±0.01	0.01±0	1.85±0.67	0.95±0.27	0.01±0	0.53±0.07	3.39±0.26	1.17±0.57
2-piperidone	3.99±0.56	0.56±0	0.11±0.04	0.11±0.03	4.41±0.63	0.66±0.14	0.05±0	0.11±0.03
3-aminopropionitrile	2.21±0.2	0.2±0	0.33±0.1	0.45±0.07	1.87±0.16	0.34±0.08	0.16±0.01	0.55±0.25
3-hydroxypropanoic acid	2.59±0.36	0.36±0	0.43±0.04	0.47±0.02	2.7±0.33	0.19±0.04	0.29±0.01	0.33±0.03
3-methyl-2-oxobutanoic acid	1.68±0.98	0.98±0	0.17±0.06	0.4±0.1	1.99±0.67	0.3±0.07	0.07±0	0.41±0.24
3-ureidopropionate	0.49±0.06	0.06±0	0.38±0.27	0.3±0.23	0.57±0.14	0.17±0.03	0.03±0.01	0.41±0.29
4-hydroxybenzyl cyanide	4.21±0.88	0.88±0	0.1±0.03	0.12±0.03	4.1±0.52	0.57±0.11	0.06±0	0.13±0.04
4-isopropylbenzoic acid	2.69±0.37	0.37±0	0.19±0.05	0.13±0.04	2.78±0.36	0.38±0.08	0.14±0.01	0.11±0.03
4-methyl-5-thiazoleethanol	1.44±0.24	0.24±0	0.21±0.06	0.23±0.08	1.93±0.35	1.17±0.22	0.15±0.01	0.16±0.05
5.6 - dimethylbenzimidazole	3.29±0.38	0.38±0	0.25±0.15	0.37±0.17	2.92±0.23	0.31±0.07	0.08±0	0.45±0.2
6-deoxy-d-glucose	0.26±0.05	0.05±0	0.99±0.43	1.57±0.49	0.3±0.05	0.66±0.07	0.39±0.01	1.77±0.63
6-hydroxy caproic acid	1.66±0.3	0.3±0	0.28±0.18	0.34±0.21	1.59±0.12	0.36±0.11	0.04±0.01	0.32±0.18
7.8-dimethylalloxazine	0.42±0.06	0.06±0	0.91±0.16	1.39±0.11	0.55±0.09	0.08±0.02	0.46±0.03	1.11±0.14
Acetoacetate	1.41±0.17	0.17±0	0.38±0.08	0.17±0.08	1.81±0.16	0.1±0.01	0.15±0.01	0.09±0.02
Acetol	0.7±0.05	0.05±0	1.92±0.34	0.67±0.09	0.79±0.18	0.5±0.02	1.78±0.06	0.66±0.12
Acetylisatin	0.91±0.34	0.34±0	0.16±0.03	0.16±0.03	0.89±0.19	1.7±0.24	0.21±0.01	0.18±0.02
Acetyl-l-serine	0.62±0.18	0.18±0	0.35±0.22	0.13±0.07	0.47±0.06	0.07±0.01	0.06±0.02	0.1±0.06
Alanine	0.32±0.1	0.1±0	0.5±0.18	0.74±0.26	0.24±0.05	2.81±2.05	0.15±0.01	0.57±0.41

Metabolit ismi	DM FBS MED SUP	DM PL MED SUP	DM KIP MED SUP	DM PPP MED SUP	DM FBS LPS MED SUP	DM PL LPS MED SUP	DM KIP LPS MED SUP	DM PPP LPS MED SUP
Allo-inositol	3.43±0.15	0.15±0	0.59±0.21	0.15±0.04	3.46±0.4	1.01±0.06	0.99±0.01	0.37±0.15
Allose	0.06±0.01	0.01±0	1.71±0.69	4.02±0.25	0.07±0.02	0.03±0.01	0.4±0.17	2.15±0.93
Aspartic acid	5.13±1.47	1.47±0	0.1±0.07	0.16±0.1	2.72±0.66	0.19±0.04	0.03±0	0.04±0.03
Benzoic acid	1.08±0.07	0.07±0	0.05±0	0.1±0.01	1.19±0.23	1.52±0.39	0.04±0	0.08±0.02
Benzylsuccinic acid	0.22±0.05	0.05±0	1.11±0.04	1.22±0.2	0.31±0.15	2.35±0.07	1.2±0.04	1.21±0.2
Beta- alanine	1.2±0.18	0.18±0	0.16±0.04	0.14±0.06	1.1±0.12	0.56±0.07	0.2±0.01	0.12±0.03
Biphenyl	1.01±0.18	0.18±0	0.13±0.02	0.24±0.01	1.18±0.11	0.18±0.03	0.11±0.01	0.24±0.03
Capric acid	1.42±0.19	0.19±0	0.57±0.14	0.31±0.12	2.67±0.61	0.32±0.07	0.29±0.02	0.3±0.14
Caprylic acid	3±0.43	0.43±0	0.18±0.02	0.1±0.02	2.82±0.34	0.71±0.15	0.11±0.01	0.11±0.04
Cellotetraose	0.07±0.01	0.01±0	0±0	0±0	0.05±0.01	0.01±0	0±0	0±0
Cholesterol	1.24±0.24	0.24±0	0.18±0.01	0.21±0.04	1.77±0.33	0.24±0.08	0.13±0.01	0.22±0.03
Cis-4- hydroxycyclohexanecarboxylic acid	2.48±0.13	0.13±0	0.09±0.05	0.03±0.02	3.31±0.59	0.56±0.12	0.02±0	0.03±0.01
Dehydroascorbic acid	0.12±0.04	0.04±0	1.49±0.31	1.55±0.35	0.14±0.06	1.47±0.18	1.05±0.23	2.18±0.15
Dihydrocarveol	1.3±0.3	0.3±0	0.12±0.04	0.11±0.03	1.48±0.21	0.75±0.25	0.06±0	0.1±0.02
Dithiothreitol	0.85±0.12	0.12±0	0.35±0.05	0.25±0.01	1.06±0.06	0.28±0.04	0.29±0.02	0.23±0.01
Fructose	0.21±0.06	0.06±0	0.77±0.19	0.87±0.07	0.43±0.26	2.06±0.77	0.41±0.09	0.96±0.16
Fucose	0.41±0.06	0.06±0	0.5±0.3	0.7±0.35	0.47±0.12	0.25±0.05	0.08±0	0.86±0.42
Galactinol	4.37±0.99	0.99±0	0.13±0.03	0.11±0.03	4.12±0.5	0.59±0.11	0.07±0	0.14±0.03
Galactono-gamma-lactone	0.44±0.07	0.07±0	3.02±1.49	0.86±0.67	0.48±0.09	0.05±0.01	5.61±0.2	1.9±0.91
Galactose	0.12±0.03	0.03±0	1.54±0.29	1.17±0.21	0.22±0.12	2.12±0.2	2.16±0.19	1.49±0.29
Glucoheptonic acid	4.28±0.16	0.16±0	0.13±0.02	0.08±0.01	3.9±0.54	0.4±0.04	0.19±0.01	0.11±0.01
Gluconic acid	0.08±0	0±0	2.26±0.65	2.36±0.67	0.08±0.01	0.28±0.03	2.86±0.05	1.46±0.69
Gluconic acid lactone	0.6±0.18	0.18±0	0.69±0.28	1.04±0.08	0.4±0.07	0.95±0.13	0.41±0.23	0.68±0.19
Glucosamine phosphate	0.34±0.09	0.09±0	0.78±0.32	0.76±0.23	0.47±0.17	0.98±0.13	0.25±0.03	0.72±0.37

Metabolit ismi	DM FBS MED SUP	DM PL MED SUP	DM KIP MED SUP	DM PPP MED SUP	DM FBS LPS MED SUP	DM PL LPS MED SUP	DM KIP LPS MED SUP	DM PPP LPS MED SUP
Glucosaminic acid	4.74±0.2	0.2±0	0.05±0.02	0.04±0.02	4.83±0.76	0.25±0.04	0.03±0	0.04±0.01
Glucose	1.07±0.05	0.05±0	0.83±0.28	0.75±0.3	0.98±0.06	1.28±0.15	0.18±0.15	0.88±0.29
Glucuronic acid	0.17±0.01	0.01±0	2.1±0.06	1.15±0.18	0.19±0.05	0.41±0.04	1.96±0.05	1.81±0.1
Glutamic acid 1	2.86±0.52	0.52±0	0.11±0.03	0.31±0.19	3.24±0.34	0.5±0.09	0.05±0	0.13±0.04
Glutamic acid 2	1.23±0.34	0.34±0	0.16±0.05	0.07±0.02	1.44±0.43	0.74±0.15	0.08±0.01	0.06±0.01
Glyceraldehyde	0.85±0.13	0.13±0	0.18±0.05	0.31±0.05	0.55±0.07	0.14±0.03	0.1±0	0.24±0.08
Glyceric acid	1.42±0.16	0.16±0	0.4±0.22	0.68±0.35	1.27±0.36	0.16±0.03	0.07±0.01	0.59±0.32
Glycerol	3.08±0.26	0.26±0	0.1±0.03	0.09±0.03	3.55±0.55	0.7±0.14	0.06±0	0.09±0.03
Glycolic acid	3.83±0.85	0.85±0	0.15±0.06	0.1±0.04	2.65±0.3	0.16±0.05	0.04±0	0.08±0.04
Gulonic acid gamma-lactone	4.34±0.57	0.57±0	0.14±0.01	0.13±0.01	3.91±0.52	0.49±0.09	0.17±0.01	0.14±0.01
Halostachine	1.25±0.1	0.1±0	0.52±0.14	0.19±0.02	1.59±0.13	1.17±0.24	0.26±0	0.11±0.01
Heptadecanoic acid	1.32±0.32	0.32±0	0.09±0.02	0.08±0.02	1.89±0.26	0.33±0.06	0.06±0.02	0.12±0.03
Isomaltose	1.61±0.35	0.35±0	0.07±0.02	0.06±0.01	2.25±0.3	0.38±0.07	0.06±0.01	0.06±0.01
Lactamide	4.05±0.56	0.56±0	0.1±0.06	0.12±0.05	3.47±0.36	0.92±0.19	0.05±0.01	0.15±0.06
Lactic acid	0.55±0.14	0.14±0	0.34±0.17	1.22±0.42	0.52±0.07	0.62±0.25	0.04±0	1.58±0.83
Linoleic acid	0.59±0.07	0.07±0	0.21±0.03	0.16±0.01	0.5±0.09	0.1±0.01	0.17±0.01	0.17±0.02
Lysine	0.29±0.04	0.04±0	0.34±0.04	0.72±0.1	0.3±0.02	1.48±0.21	0.3±0.02	0.33±0.06
Lyxose	0.88±0.13	0.13±0	0.24±0.05	0.08±0	0.68±0.05	1.2±0.17	0.28±0.02	0.07±0.01
Lyxosylamine	0.9±0.14	0.14±0	0.24±0.05	0.06±0.02	0.69±0.05	1.21±0.17	0.28±0.02	0.07±0.01
Malonamide	0.98±0.17	0.17±0	0.32±0.1	0.54±0.11	1.09±0.07	0.22±0.04	0.15±0.01	0.42±0.14
Malonic acid	4.5±0.81	0.81±0	0.12±0.03	0.11±0.03	4.33±0.59	0.65±0.13	0.08±0	0.13±0.03
Mannitol	0.07±0	0±0	2.13±0.61	2.2±0.63	0.08±0.01	0.26±0.03	2.69±0.04	1.36±0.65
Mannose	0.11±0.03	0.03±0	1.28±0.45	1.17±0.47	0.21±0.12	2.06±0.19	2.08±0.01	1.18±0.44
Menthone	3.9±0.74	0.74±0	0.16±0.02	0.1±0.02	3.74±0.51	1.01±0.2	0.12±0.01	0.12±0.01
Methionine sulfoxide	0.05±0.01	0.01±0	1.17±0.07	1.29±0.2	0.15±0.1	1.73±0.17	1.3±0.05	1.4±0.21
Methyl linolenate	2.11±0.49	0.49±0	0.27±0.04	0.13±0.02	1.82±0.3	0.45±0.08	0.2±0	0.12±0.03

Metabolit ismi	DM FBS MED SUP	DM PL MED SUP	DM KIP MED SUP	DM PPP MED SUP	DM FBS LPS MED SUP	DM PL LPS MED SUP	DM KIP LPS MED SUP	DM PPP LPS MED SUP
Methyl oleate	2.92±0.32	0.32±0	0.18±0.03	0.09±0.02	2.57±0.27	0.48±0.09	0.13±0	0.09±0.02
Methyl palmitate	3.84±0.29	0.29±0	0.36±0.05	0.41±0.02	3.19±0.5	0.42±0.06	0.36±0.03	0.36±0.06
Methyl palmitoleate	1.69±0.14	0.14±0	1.34±0.62	0.7±0.54	1.57±0.17	0.37±0.06	2.51±0.01	1.31±0.63
Methyl stearate	4.57±1.01	1.01±0	0.11±0.03	0.11±0.03	4.5±0.69	0.59±0.12	0.07±0	0.14±0.03
Methyl-beta-d-galactopyranoside	0.11±0.03	0.03±0	1.43±0.2	1.69±0.04	0.1±0.03	1.23±0.16	0.9±0.21	1.84±0.12
Mono(2-ethylhexyl)phthalate	1.2±0.22	0.22±0	0.06±0.02	0.06±0.01	0.84±0.2	2.48±0.42	0.04±0	0.05±0.01
Myo-inositol	4.59±0.2	0.2±0	0.12±0.01	0.08±0.01	4.62±0.58	0.34±0.04	0.14±0.01	0.08±0.01
Myristic acid	0.23±0.05	0.05±0	1.62±0.12	2.09±0.04	0.26±0.09	0.32±0.03	1.31±0.03	2.39±0.1
N-acetyl-d-glucosamine	4.4±0.95	0.95±0	0.11±0.02	0.11±0.03	4.1±0.67	0.66±0.13	0.07±0.01	0.14±0.03
N-acetyl-l-aspartic acid	5.23±1.27	1.27±0	0.13±0.04	0.14±0.04	4.77±0.64	0.21±0.08	0.06±0	0.11±0.05
N-acetyl-l-glutamic acid	3.74±0.62	0.62±0	0.11±0.03	0.11±0.03	3.77±0.46	0.54±0.11	0.07±0	0.12±0.02
N-cyclohexylformamide	4.04±0.77	0.77±0	0.11±0.04	0.1±0.03	4.24±0.59	0.62±0.13	0.05±0	0.12±0.04
N-ethylglycine	2.94±0.17	0.17±0	0.1±0.03	0.12±0.02	3.24±0.37	0.89±0.18	0.07±0	0.12±0.03
Nicotinamide	4.13±0.69	0.69±0	0.12±0.03	0.11±0.03	3.99±0.52	0.65±0.13	0.08±0	0.13±0.03
N-methylglutamic acid	2.02±1.06	1.06±0	0.08±0.03	0.02±0.01	4.58±1.5	0.58±0.32	0.1±0.02	0.03±0
Oleic acid	0.11±0.01	0.01±0	0.07±0.01	0.06±0.01	0.12±0.01	0.02±0	0.06±0	0.07±0
Palmitic acid	0.06±0.01	0.01±0	0.39±0.03	0.35±0.05	0.08±0.01	0.02±0	0.38±0	0.47±0.09
Palmitoleic acid	0.71±0.21	0.21±0	0.09±0	0.05±0.01	0.92±0.31	0.09±0.03	0.09±0	0.04±0.01
Pantothenic acid	5.99±0.27	0.27±0	0.04±0.01	0.04±0.01	6.03±0.9	0.08±0.06	0.05±0	0.02±0.01
Phenylacetaldehyde	4.23±0.9	0.9±0	0.17±0.03	0.17±0.03	3.99±0.53	0.76±0.14	0.1±0	0.16±0.03
Phosphoenolpyruvic acid	0.3±0.03	0.03±0	0.34±0.09	0.13±0.03	0.32±0.14	0.28±0.02	0.41±0.02	0.17±0.04
Phosphoric acid	0.28±0.07	0.07±0	0.01±0	0.01±0	0.28±0.02	0.05±0.01	0.01±0	0.01±0
Pimelic acid	2.22±0.54	0.54±0	0.54±0.11	0.35±0.05	2.55±0.31	0.15±0.02	0.33±0	0.24±0.06
Purine riboside	3.26±0.15	0.15±0	0.07±0.01	0.06±0.01	3.05±0.45	0.51±0.1	0.05±0	0.05±0.01
Ribitol	0.41±0.06	0.06±0	0.04±0.02	0.56±0.39	0.47±0.12	0.32±0.03	0.02±0	0.82±0.43
Ribonic acid-gamma-lactone	1.31±0.15	0.15±0	0.12±0.02	0.14±0.03	1.25±0.21	0.3±0.05	0.1±0.04	0.26±0.06

Metabolit ismi	DM FBS MED SUP	DM PL MED SUP	DM KIP MED SUP	DM PPP MED SUP	DM FBS LPS MED SUP	DM PL LPS MED SUP	DM KIP LPS MED SUP	DM PPP LPS MED SUP
S-carboxymethylcysteine	0.39±0.06	0.06±0	0.48±0.28	0.66±0.33	0.44±0.11	0.23±0.05	0.13±0	0.81±0.39
Sedoheptulose anhydride monohydrate	0.42±0.36	0.36±0	1.65±0.29	1.73±0.29	0±0	0±0	1.25±0.02	1.75±0.3
Serine	0.49±0.07	0.07±0	0.29±0.17	0.5±0.25	0.56±0.09	0.08±0.01	0.06±0.01	0.43±0.25
Shikimic acid	0.21±0.07	0.07±0	0.67±0.24	1.26±0.43	0.2±0.1	1.2±0.14	0.57±0.04	0.87±0.17
Sinapyl alcohol	0.21±0.01	0.01±0	0.01±0	0.01±0	0.2±0.02	0.05±0.01	0.01±0	0.01±0
Sorbitol	0.2±0.01	0.01±0	1.81±0.25	1.05±0.29	0.22±0.05	0.45±0.05	1.94±0.04	2.03±0.14
Sorbose	0.36±0.06	0.06±0	0.68±0.3	0.82±0.04	0.53±0.19	3.57±1.05	0.67±0.04	0.87±0.06
Squalene	3.41±0.23	0.23±0	0.08±0.03	0.09±0.03	4.68±0.98	0.49±0.14	0.03±0.01	0.1±0.02
Stearic acid	0.16±0.01	0.01±0	0.24±0.01	0.26±0.02	0.18±0.01	0.05±0.01	0.2±0	0.32±0.02
Tagatose	0.09±0.03	0.03±0	1.28±0.18	1.53±0.04	0.1±0.03	0.99±0.11	1.02±0.02	1.67±0.12
Talose	2.8±0.14	0.14±0	0.29±0.08	1.1±0.86	2.44±0.13	0.6±0.04	0.68±0.04	0.21±0.05
Threitol	1.56±0.42	0.42±0	0.46±0.25	0.68±0.35	1.05±0.17	0.33±0.06	0.17±0.05	0.61±0.42
Threonine	0.85±0.06	0.06±0	0.42±0.04	0.55±0.05	1.69±0.71	1.29±0.41	0.35±0.01	0.49±0.03
Threose	0.31±0.02	0.02±0	0.03±0	0.02±0	0.29±0.02	0.06±0.01	0.03±0	0.02±0
Tyrosine methyl ester	0.17±0.03	0.03±0	1.27±0.06	1.22±0.19	0.25±0.12	3.04±0.36	1.13±0.14	1.05±0.08
Urethane	4.2±0.18	0.18±0	0.1±0.02	0.07±0.01	3.6±0.57	1.58±0.32	0.08±0	0.06±0.02
Xylitol	0.69±0.03	0.03±0	0.26±0.08	0.64±0.08	0.77±0.12	0.15±0.03	0.04±0.02	1.14±0.68

* Normalize edilmiş verilerin ortalama ± standart hata'sı

Tablo 4.12 MKH kültüründe kullandığımız besiyerlerinin metabolik analizlerle saptanan ekstrasellüler metabolitlerinin gruplar arası istatistiksel olarak karşılaştırılmasına ait p değerleri.

Metabolit Kısaltması	Besiyerlerinin ekstrasellüler metabolitlerinin karşılaştırılması			İnflamatuvar uyurum altındaki besiyerlerinin ekstrasellüler metabolitlerinin karşılaştırılması				
	DMFBS-DMPL	DMFBS-DMKİP	DMFBS-DMPPP	DMFBS-DMFBSLPS	DMPL-DMPLLPS	DMKİP-DMKİPLPS	DMPPP-DMPPPPLPS	
ESM 1	0.13	0.02	0.17	0.87	0.29	0.00	0.85	
ESM 2	0.05	0.63	0.03	0.81	0.12	0.04	0.59	
ESM 3	0.80	0.04	0.04	0.53	0.07	0.00	0.78	
ESM 4	0.01	0.01	0.00	0.17	0.25	0.34	0.37	
ESM 5	0.05	0.01	0.01	0.12	0.09	0.60	0.79	
ESM 6	0.31	0.56	0.36	0.61	0.11	0.07	0.35	
ESM 7	0.04	0.19	0.12	0.57	0.21	0.00	0.84	
ESM 8	0.01	0.67	0.46	0.42	0.12	0.00	0.70	
ESM 9	0.03	0.02	0.00	0.33	0.42	0.00	0.71	
ESM 10	0.06	0.17	0.04	0.42	0.13	0.00	0.87	
ESM 11	0.62	0.00	0.07	0.58	0.16	0.00	0.51	
ESM 12	0.02	0.19	0.13	0.46	0.12	0.00	0.76	
ESM 13	0.93	0.09	0.06	0.78	0.08	0.00	0.67	
ESM 14	0.45	0.07	0.01	0.91	0.10	0.00	0.69	
ESM 15	0.51	0.65	0.96	0.54	0.13	0.00	0.66	
ESM 16	0.73	0.00	0.00	0.51	0.21	0.00	0.53	
ESM 17	0.13	0.15	0.23	0.63	0.23	0.00	0.74	
ESM 18	0.01	0.09	0.01	0.71	0.11	0.11	0.48	
ESM 19	0.03	0.47	0.33	0.44	0.22	0.00	0.75	
ESM 20	0.06	0.96	0.03	0.60	0.20	0.05	0.27	
ESM 21	0.01	0.01	0.01	0.12	0.50	0.72	0.59	
ESM 22	0.26	0.03	0.37	0.61	0.42	0.00	0.83	
ESM 23	0.06	0.10	0.05	0.21	0.42	0.00	0.63	
ESM 24	0.36	0.31	0.36	0.17	0.12	0.01	0.42	
ESM 25	0.08	0.00	0.00	0.87	0.14	0.19	0.44	

Metabolit Kısaltması	Besiyerlerinin ekstrasellüler metabolitlerinin karşılaştırılması			İnflamatuvar uyuram altındaki besiyerlerinin ekstrasellüler metabolitlerinin karşılaştırılması				
	DMFBS-DMPL	DMFBS-DMKİP	DMFBS-DMPPP	DMFBS-DMFBSLPS	DMPL-DMPLPS	DMKİP-DMKİPLPS	DMPPP-DMPPPPLPS	
ESM 26	0.47	0.32	0.20	0.55	0.12	0.00	0.61	
ESM 27	0.00	0.97	0.16	0.71	0.07	0.09	0.82	
ESM 28	0.01	0.02	0.04	0.28	0.13	0.20	0.21	
ESM 29	0.02	0.04	0.01	0.11	0.46	0.18	0.39	
ESM 30	0.09	0.46	0.13	0.21	0.09	0.01	0.37	
ESM 31	0.72	0.47	0.33	0.95	0.16	0.00	0.83	
ESM 32	0.00	0.00	0.06	0.52	0.10	0.00	0.81	
ESM 33	0.00	0.10	0.07	0.47	0.35	0.01	0.63	
ESM 34	0.26	0.09	0.11	0.59	0.10	0.15	0.40	
ESM 35	0.00	0.55	0.13	0.54	0.21	0.00	0.73	
ESM 36	0.16	0.18	0.44	0.32	0.17	0.03	0.83	
ESM 37	0.63	0.33	0.18	0.60	0.24	0.00	0.75	
ESM 38	0.04	0.01	0.01	0.98	0.37	0.78	0.61	
ESM 39	0.01	0.02	0.08	0.38	0.13	0.74	0.74	
ESM 40	0.02	0.00	0.00	0.70	0.13	0.00	0.64	
ESM 41	0.07	0.17	0.12	0.56	0.23	0.00	0.73	
ESM 42	0.01	0.09	0.20	0.45	0.81	0.11	0.37	
ESM 43	0.00	0.01	0.16	0.43	0.13	0.15	0.34	
ESM 44	0.05	0.05	0.03	0.45	0.16	0.52	0.21	
ESM 45	0.07	0.09	0.07	0.06	0.10	0.00	0.37	
ESM 46	0.28	0.05	0.98	0.97	0.28	0.00	0.51	
ESM 47	0.04	0.86	0.39	0.25	0.61	0.00	0.15	
ESM 48	0.71	0.04	0.03	0.63	0.24	0.00	0.54	
ESM 49	0.24	0.04	0.97	0.55	0.19	0.00	0.98	
ESM 50	0.03	0.00	0.00	0.60	0.62	0.44	0.68	
ESM 51	0.51	0.42	0.03	0.72	0.12	0.03	0.88	
ESM 52	0.00	0.85	0.04	0.63	0.31	0.00	0.61	
ESM 53	0.27	0.40	0.00	0.80	0.15	0.05	0.82	

Metabolit Kısaltması	Besiyerlerinin ekstrasellüler metabolitlerinin karşılaştırılması			İnflamatuvar uyuram altındaki besiyerlerinin ekstrasellüler metabolitlerinin karşılaştırılması			
	DMFBS-DMPL	DMFBS-DMKİP	DMFBS-DMPPP	DMFBS-DMFBSLPS	DMPL-DMPLLS	DMKİP-DMKİPLPS	DMPPP-DMPPPPLPS
ESM 54	0.10	0.04	0.72	0.25	0.25	0.01	0.77
ESM 55	0.02	0.31	0.16	0.50	0.19	0.00	0.79
ESM 56	0.23	0.17	0.08	0.60	0.11	0.00	0.82
ESM 57	0.14	0.13	0.12	0.74	0.15	0.51	0.54
ESM 58	0.00	0.02	0.71	0.72	0.17	0.00	0.92
ESM 59	0.05	0.09	0.03	0.41	0.09	0.20	0.91
ESM 60	0.01	0.11	0.06	0.42	0.28	0.00	0.75
ESM 61	0.04	0.33	0.26	0.59	0.01	0.00	0.79
ESM 62	0.69	0.03	0.86	0.97	0.28	0.00	0.73
ESM 63	0.39	0.17	0.06	0.77	0.19	0.00	0.84
ESM 64	0.03	0.68	0.00	0.35	0.20	0.29	0.50
ESM 65	0.05	0.02	0.02	0.54	0.59	0.04	0.90
ESM 66	0.05	0.02	0.02	0.54	0.67	0.03	0.57
ESM 67	0.01	0.32	0.03	0.43	0.50	0.00	0.84
ESM 68	0.04	0.15	0.10	0.73	0.18	0.01	0.76
ESM 69	0.07	0.18	0.07	0.07	0.08	0.00	0.37
ESM 70	0.00	0.01	0.16	0.43	0.17	0.00	0.34
ESM 71	0.01	0.15	0.04	0.59	0.10	0.03	0.87
ESM 72	0.02	0.04	0.44	0.57	0.12	0.04	0.27
ESM 73	0.01	0.52	0.18	0.73	0.14	0.00	0.96
ESM 74	0.02	0.35	0.10	0.68	0.16	0.00	0.97
ESM 75	0.39	0.25	0.17	0.81	0.20	0.05	0.32
ESM 76	0.01	0.52	0.09	0.63	0.16	0.17	0.35
ESM 77	0.03	0.15	0.12	0.52	0.17	0.00	0.70
ESM 78	0.11	0.52	0.01	0.90	0.16	0.06	0.30
ESM 79	0.00	0.26	0.13	0.77	0.05	0.03	0.60
ESM 80	0.71	0.03	0.02	0.68	0.18	0.01	0.45
ESM 81	0.43	0.30	0.00	0.93	0.41	0.55	0.73

Metabolit Kısaltması	Besiyerlerinin ekstrasellüler metabolitlerinin karşılaştırılması			İnflamatuvar uyuram altındaki besiyerlerinin ekstrasellüler metabolitlerinin karşılaştırılması			
	DMFBS-DMPL	DMFBS-DMKİP	DMFBS-DMPPP	DMFBS-DMFBSLPS	DMPL-DMPLLS	DMKİP-DMKİPLPS	DMPPP-DMPPPPLPS
ESM 82	0.01	0.16	0.10	0.47	0.18	0.02	0.77
ESM 83	0.10	0.09	0.09	0.75	0.21	0.00	0.76
ESM 84	0.02	0.18	0.12	0.55	0.16	0.01	0.75
ESM 85	0.01	0.17	0.10	0.57	0.11	0.00	0.90
ESM 86	0.01	0.15	0.09	0.56	0.14	0.00	0.68
ESM 87	0.03	0.19	0.12	0.57	0.17	0.00	0.75
ESM 88	0.00	0.30	0.31	0.79	0.55	0.40	0.55
ESM 89	0.16	0.18	0.83	0.66	0.08	0.01	0.19
ESM 90	0.56	0.60	0.03	0.39	0.11	0.02	0.23
ESM 91	0.26	0.11	0.17	0.89	0.02	0.04	0.22
ESM 92	0.36	0.24	0.12	0.38	0.93	0.55	0.19
ESM 93	0.03	0.15	0.12	0.52	0.15	0.01	0.72
ESM 94	0.01	0.01	0.01	0.19	0.17	0.03	0.25
ESM 95	0.38	0.75	0.56	0.39	0.16	0.02	0.61
ESM 96	0.28	0.32	0.11	0.62	0.12	0.00	0.74
ESM 97	0.06	0.10	0.07	0.80	0.16	0.00	0.53
ESM 98	0.02	0.00	0.00	0.48	0.13	0.00	0.14
ESM 99	0.07	0.21	0.01	0.43	0.20	0.02	0.28
ESM 100	0.02	0.00	0.00	0.48	0.13	0.00	0.64
ESM 101	0.33	0.00	0.00	0.37	0.12	0.00	0.10
ESM 102	0.07	0.07	0.03	0.94	0.07	0.00	0.89
ESM 103	0.08	0.87	0.92	0.37	0.13	0.01	0.54
ESM 104	0.02	0.28	0.21	0.81	0.14	0.04	0.30
ESM 105	0.03	0.00	0.06	0.59	0.63	0.72	0.82
ESM 106	0.02	0.04	0.09	0.09	0.13	0.51	0.92
ESM 107	0.20	0.06	0.04	0.73	0.76	0.01	0.69
ESM 108	0.82	0.27	0.69	0.42	0.15	0.03	0.06
ESM 109	0.14	0.02	0.02	0.86	0.35	0.01	0.80

Metabolit Kısaltması	Besiyerlerinin ekstraseellüer metabolitlerinin karşılaştırılması			İnflamatuvar uyarım altındaki besiyerlerinin ekstraseellüer metabolitlerinin karşılaştırılması			
	DMFBS-DMPL	DMFBS-DMKİP	DMFBS- DMPPP	DMFBS-DMFBSLPS	DMPL-DMPLLS	DMKİP-DMKİPLPS	DMPPP- DMPPPPLPS
ESM 110	0.00	0.16	0.46	0.37	0.15	0.07	0.40
ESM 111	0.69	0.02	0.29	0.47	0.43	0.00	0.58
ESM 112	0.13	0.66	0.18	0.97	0.71	0.14	0.32
ESM 113	0.07	0.26	0.14	0.94	0.09	0.01	0.44
ESM 114	0.01	0.02	0.18	0.50	0.15	0.16	0.60
ESM 115	0.02	0.00	0.00	0.66	0.14	0.00	0.78
ESM 116	0.03	0.21	0.01	0.45	0.05	0.10	0.36

Tablo 4.13 MKH kültür süpernatantlarının metabolik analizlerle saptanan ekstrasellüler metabolitlerinin gruplar arası istatistiksel olarak karşılaştırılmalarına ait p değerleri.

Metabolit Kısaltması	MKH kültür süpernatantlarının, kendi besiyerlerinin içerikleri ile karşılaştırılması				inflatuar uyurım varlığında çoğaltılan MKH'lerin kültür süpernatantlarının, kendi besiyerlerinin içerikleri ile karşılaştırılması				MKH kültür süpernatantlarının içeriklerinin karşılaştırılması			
	DM FBS-FBS MED SUP	DM PL-PL MED SUP	DM KIP-KIP MED SUP	DM PPP-PPP MED SUP	DM FBS-LPS-FBS LPS MED SUP	DM PLLPS-PLLPS MED SUP	DM KİPLPS-KİPLPS MED SUP	DM PPPLPS-PPPLPS MED SUP	FBS MED SUP-PL MED SUP	FBS MED SUP-KIP MED SUP	FBS MED SUP-PPP MED SUP	
ESM 1	0.06	0.00	0.00	0.01	0.20	0.31	0.30	0.25	0.03	0.72	0.10	
ESM 2	0.14	0.00	0.02	0.07	0.05	0.05	0.46	0.67	0.05	0.00	0.01	
ESM 3	0.61	0.01	0.00	0.09	0.96	0.55	0.33	0.39	0.00	0.00	0.00	
ESM 4	0.00	0.00	0.23	0.01	0.00	0.00	0.34	0.25	0.01	0.05	0.01	
ESM 5	0.03	0.00	0.04	0.35	0.30	0.24	0.06	0.37	0.00	0.00	0.00	
ESM 6	0.14	0.01	0.11	0.06	0.05	0.46	0.34	0.66	0.00	0.05	0.02	
ESM 7	0.02	0.00	0.01	0.05	0.06	0.53	0.52	0.35	0.00	0.00	0.00	
ESM 8	0.08	0.00	0.00	0.27	0.96	0.34	0.30	0.70	0.00	0.00	0.00	
ESM 9	0.52	0.04	0.00	0.10	0.73	0.21	0.48	0.08	0.00	0.00	0.00	
ESM 10	0.34	0.01	0.00	0.05	0.86	0.96	0.31	0.46	0.21	0.23	0.30	
ESM 11	0.97	0.00	0.00	0.02	0.55	0.44	0.79	0.29	0.00	0.75	0.52	
ESM 12	0.04	0.00	0.01	0.11	0.06	0.51	0.64	0.41	0.01	0.01	0.01	
ESM 13	0.66	0.00	0.00	0.04	0.57	0.47	0.18	0.19	0.00	0.00	0.00	
ESM 14	0.03	0.00	0.00	0.05	0.33	0.95	0.03	0.20	0.05	0.00	0.01	
ESM 15	0.01	0.01	0.05	0.09	0.04	0.82	0.31	0.53	0.00	0.00	0.00	
ESM 16	0.01	0.00	0.02	0.07	0.01	0.38	0.30	0.61	0.03	0.19	0.06	
ESM 17	0.85	0.00	0.00	0.07	0.36	0.40	0.39	0.26	0.00	0.01	0.02	
ESM 18	0.03	0.00	0.01	0.28	0.07	0.56	0.58	0.25	0.00	0.05	0.00	
ESM 19	0.91	0.00	0.00	0.01	0.42	0.28	0.09	0.13	0.00	0.00	0.00	
ESM 20	0.22	0.07	0.08	0.03	0.38	0.02	0.71	0.54	0.00	0.02	0.81	
ESM 21	0.02	0.04	0.28	0.04	0.17	0.01	0.03	0.11	0.74	0.10	0.10	

Metabolit Kısaltması	MKH kültür süpermatanlarının, kendi besiyerlerinin içerikleri ile karşılaştırılması				İnflamatuvar uyarım varlığında çoğaltılan MKH'lerin kültür süpermatanlarının, kendi besiyerlerinin içerikleri ile karşılaştırılması				MKH kültür süpermatanlarının içeriklerinin karşılaştırılması			
	DM FBS- FBS MED SUP	DM PL- PL MED SUP	DM KİP- KİP MED SUP	DM PPP- PPP MED SUP	DM FBS- LPS-FBS LPS MED SUP	DM PLLPS- PLLPS MED SUP	DM KİPLPS- KİPLPS MED SUP	DM PPPLPS- PPPLPS MED SUP	FBS MED SUP-PL MED SUP	FBS MED SUP-KİP MED SUP	FBS MED SUP-PPP MED SUP	
ESM 22	0.21	0.00	0.00	0.00	0.12	0.35	0.03	0.24	0.03	0.43	0.06	
ESM 23	0.02	0.83	0.01	0.68	0.25	0.67	0.13	0.74	0.76	0.48	0.24	
ESM 24	0.00	0.02	0.10	0.13	0.05	0.38	0.47	0.56	0.00	0.00	0.00	
ESM 25	0.00	0.02	0.97	0.78	0.15	0.90	0.45	0.61	0.05	0.08	0.00	
ESM 26	0.11	0.00	0.01	0.14	0.68	0.45	0.28	0.11	0.02	0.03	0.03	
ESM 27	0.00	0.00	0.04	0.00	0.13	0.91	0.17	0.10	0.00	0.00	0.00	
ESM 28	0.00	0.00	0.00	0.18	0.05	0.01	0.20	0.71	0.00	0.00	0.01	
ESM 29	0.01	0.05	0.06	0.08	0.06	0.72	0.13	0.24	0.01	0.00	0.00	
ESM 30	0.26	0.00	0.00	0.50	0.89	0.35	0.11	0.35	0.01	0.01	0.01	
ESM 31	0.72	0.00	0.00	0.06	0.44	0.46	0.04	0.34	0.00	0.02	0.01	
ESM 32	0.01	0.00	0.00	0.62	0.01	0.63	0.01	0.79	0.00	0.00	0.00	
ESM 33	0.03	0.00	0.02	0.11	0.29	0.40	0.44	0.38	0.00	0.00	0.00	
ESM 34	0.16	0.01	0.00	0.27	0.33	0.79	0.21	1.00	0.01	0.01	0.01	
ESM 35	0.04	0.00	0.00	0.00	0.24	0.39	0.05	0.25	0.00	0.00	0.00	
ESM 36	0.03	0.02	0.06	0.77	0.02	0.05	0.59	0.37	0.00	0.01	0.01	
ESM 37	0.19	0.00	0.00	0.01	0.25	0.58	0.97	0.22	0.03	0.01	0.01	
ESM 38	0.01	0.00	0.56	0.27	0.07	0.17	0.21	0.94	0.00	0.01	0.00	
ESM 39	0.00	0.00	0.18	0.49	0.18	0.48	0.59	0.79	0.00	0.05	0.00	
ESM 40	0.00	0.00	0.02	0.08	0.13	0.85	0.00	0.52	0.01	0.83	0.53	
ESM 41	0.07	0.00	0.01	0.15	0.08	0.57	0.12	0.41	0.01	0.01	0.01	
ESM 42	0.02	0.00	0.20	0.41	0.07	0.38	0.13	0.75	0.00	0.19	0.61	
ESM 43	0.00	0.00	0.02	0.12	0.15	0.09	0.35	0.70	0.00	0.01	0.01	
ESM 44	0.00	0.00	0.04	0.40	0.05	0.55	1.00	0.18	0.00	0.00	0.00	
ESM 45	0.00	0.00	0.05	0.05	0.07	0.07	0.14	0.72	0.00	0.03	0.03	

Metabolit Kısaltması	MKH kültür süpermatanlarının, kendi besiyerlerinin içerikleri ile karşılaştırılması				İnflamatuvar uyarım varlığında çoğaltılan MKH'lerin kültür süpermatanlarının, kendi besiyerlerinin içerikleri ile karşılaştırılması				MKH kültür süpermatanlarının içeriklerinin karşılaştırılması			
	DM FBS-FBS MED SUP	DM PL-PL MED SUP	DM KİP-KİP MED SUP	DM PPP-PPP MED SUP	DM FBS-LPS-FBS LPS MED SUP	DM PLLPS-PLLPS MED SUP	DM KİPLPS-KİPLPS MED SUP	DM PPPLPS-PPPLPS MED SUP	FBS MED SUP-PL MED SUP	FBS MED SUP-KİP MED SUP	FBS MED SUP-MED SUP	FBS MED SUP-PPP MED SUP
ESM 46	0.15	0.00	0.00	0.08	0.19	0.39	0.62	0.04	0.48	0.84	0.10	
ESM 47	0.01	0.10	0.11	0.02	0.08	0.08	0.79	0.75	0.01	0.31	0.19	
ESM 48	0.00	0.00	0.00	0.07	0.09	0.43	0.03	0.22	0.00	0.00	0.00	
ESM 49	0.03	0.00	0.01	0.09	0.01	0.91	0.43	0.43	0.01	0.48	0.40	
ESM 50	0.00	0.81	0.00	0.02	0.01	0.65	0.70	0.64	0.00	0.00	0.00	
ESM 51	0.46	0.00	0.01	0.73	0.08	0.58	0.54	0.28	0.00	0.00	0.01	
ESM 52	0.25	0.00	0.00	0.01	0.38	0.35	0.25	0.16	0.06	0.04	0.03	
ESM 53	0.00	0.00	0.02	0.01	0.13	0.31	0.32	0.23	0.00	0.01	0.02	
ESM 54	0.15	0.00	0.00	0.07	0.85	0.43	0.44	0.36	0.00	0.02	0.14	
ESM 55	0.01	0.00	0.00	0.02	0.08	0.48	0.99	0.27	0.00	0.00	0.00	
ESM 56	0.29	0.00	0.00	0.09	0.67	0.34	0.30	0.30	0.01	0.01	0.01	
ESM 57	0.03	0.00	0.02	0.33	0.15	0.47	0.15	0.35	0.00	0.00	0.00	
ESM 58	0.06	0.00	0.00	0.00	0.09	0.77	0.17	0.13	0.00	0.01	0.00	
ESM 59	0.11	0.00	0.05	0.70	0.09	0.99	0.06	0.65	0.02	0.02	0.02	
ESM 60	0.06	0.00	0.01	0.19	0.03	0.61	0.77	0.36	0.01	0.01	0.01	
ESM 61	0.02	0.00	0.02	0.06	0.06	0.08	0.84	0.38	0.00	0.00	0.00	
ESM 62	0.01	0.00	0.00	0.28	0.07	0.79	0.24	0.99	0.30	0.43	0.24	
ESM 63	0.99	0.00	0.01	0.17	0.76	0.29	0.86	0.36	0.00	0.00	0.00	
ESM 64	0.01	0.00	0.01	0.21	0.20	0.01	0.28	0.06	0.00	0.47	0.01	
ESM 65	0.03	0.46	0.19	0.12	0.10	0.05	0.00	0.04	0.13	0.01	0.00	
ESM 66	0.03	0.55	0.19	0.06	0.10	0.06	0.00	0.04	0.11	0.01	0.00	
ESM 67	0.01	0.00	0.00	0.00	0.29	0.31	0.15	0.20	0.00	0.03	0.10	
ESM 68	0.04	0.00	0.01	0.08	0.03	0.56	0.33	0.39	0.00	0.00	0.00	
ESM 69	0.00	0.00	0.05	0.05	0.07	0.02	0.18	0.72	0.00	0.03	0.03	

Metabolit Kısaltması	MKH kültür süpermatanlarının, kendi besiyerlerinin içerikleri ile karşılaştırılması				İnflamatuar uyarım varlığında çoğaltılan MKH'lerin kültür süpermatanlarının, kendi besiyerlerinin içerikleri ile karşılaştırılması				MKH kültür süpermatanlarının içeriklerinin karşılaştırılması			
	DM FBS- FBS MED SUP	DM PL- PL MED SUP	DM KİP- KİP MED SUP	DM PPP- PPP MED SUP	DM FBS- LPS-FBS LPS MED SUP	DM PLLPS- PLLPS MED SUP	DM KİPLPS- KİPLPS MED SUP	DM PPPLPS- PPPLPS MED SUP	FBS MED SUP-PL MED SUP	FBS MED SUP-KİP MED SUP	FBS MED SUP-PPP MED SUP	
ESM 70	0.00	0.00	0.14	0.42	0.15	0.55	0.86	0.91	0.00	0.07	0.10	
ESM 71	0.02	0.00	0.07	0.63	0.02	0.84	0.03	0.90	0.01	0.00	0.00	
ESM 72	0.01	0.00	0.00	0.09	0.14	0.10	0.38	0.29	0.00	0.00	0.00	
ESM 73	0.10	0.00	0.00	0.02	0.15	0.36	0.01	0.29	0.02	0.02	0.01	
ESM 74	0.02	0.00	0.00	0.02	0.15	0.43	0.02	0.26	0.00	0.00	0.00	
ESM 75	0.07	0.00	0.03	0.43	0.40	0.37	0.12	0.29	0.00	0.00	0.00	
ESM 76	0.01	0.00	0.31	0.46	0.08	0.48	0.53	0.73	0.00	0.65	0.17	
ESM 77	0.06	0.00	0.01	0.14	0.09	0.55	0.12	0.42	0.01	0.01	0.01	
ESM 78	0.01	0.01	0.03	0.05	0.07	0.03	0.60	0.41	0.00	0.00	0.00	
ESM 79	0.03	0.00	0.11	0.65	0.14	0.58	0.93	0.36	0.78	0.00	0.00	
ESM 80	0.00	0.00	0.00	0.02	0.07	0.56	0.66	0.20	0.00	0.00	0.00	
ESM 81	0.07	0.15	0.61	0.32	0.16	0.20	0.05	0.86	0.07	0.00	0.00	
ESM 82	0.05	0.00	0.02	0.21	0.08	0.58	0.12	0.51	0.01	0.01	0.01	
ESM 83	0.07	0.00	0.10	0.11	0.04	0.36	0.70	0.26	0.01	0.01	0.01	
ESM 84	0.03	0.00	0.01	0.12	0.08	0.51	0.33	0.38	0.00	0.00	0.00	
ESM 85	0.04	0.00	0.01	0.05	0.04	0.56	0.43	0.40	0.01	0.00	0.00	
ESM 86	0.00	0.00	0.01	0.10	0.03	0.86	0.23	0.35	0.00	0.00	0.00	
ESM 87	0.03	0.00	0.00	0.06	0.07	0.57	0.21	0.37	0.00	0.00	0.00	
ESM 88	0.56	0.00	0.27	0.12	0.21	0.34	0.03	0.28	0.16	0.16	0.15	
ESM 89	0.63	0.00	0.04	0.32	0.24	0.48	0.03	0.03	0.00	0.01	0.02	
ESM 90	0.21	0.00	0.16	0.01	0.79	0.13	0.01	0.90	0.00	0.00	0.00	
ESM 91	0.34	0.01	0.09	0.08	0.25	0.24	0.04	0.30	0.04	0.04	0.04	
ESM 92	0.00	0.24	0.43	0.02	0.04	0.33	0.30	0.14	0.00	0.00	0.00	
ESM 93	0.05	0.00	0.04	0.16	0.13	0.63	0.02	0.36	0.01	0.01	0.01	

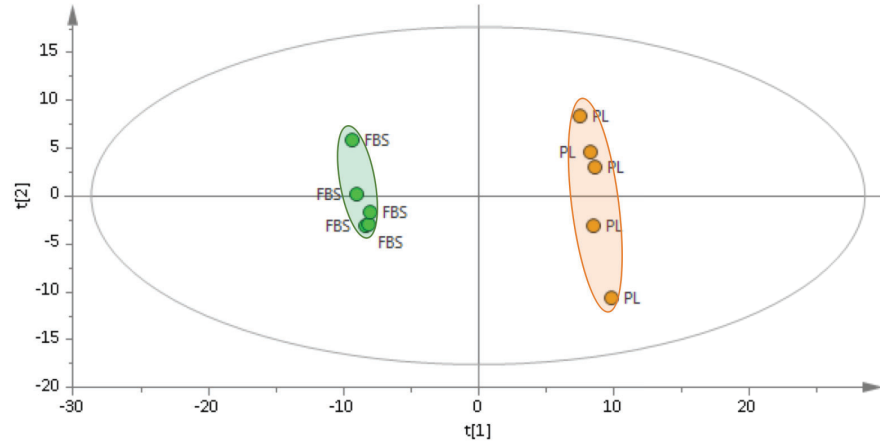
Metabolit Kısaltması	MKH kültür süpermatanlarının, kendi besiyerlerinin içerikleri ile karşılaştırılması				İnflamatuvar uyarım varlığında çoğaltılan MKH'lerin kültür süpermatanlarının, kendi besiyerlerinin içerikleri ile karşılaştırılması				MKH kültür süpermatanlarının içeriklerinin karşılaştırılması			
	DM FBS-FBS MED SUP	DM PL-PL MED SUP	DM KİP-KİP MED SUP	DM PPP-PPP MED SUP	DM FBS-LPS-FBS LPS MED SUP	DM PLLPS-PLLPS MED SUP	DM KİPLPS-KİPLPS MED SUP	DM PPPLPS-PPPLPS MED SUP	FBS MED SUP-PL MED SUP	FBS MED SUP-KİP MED SUP	FBS MED SUP-MED SUP	FBS MED SUP-PPP MED SUP
ESM 94	0.00	0.00	0.52	0.19	0.03	0.35	0.05	0.72	0.91	0.74	0.01	0.01
ESM 95	0.30	0.00	0.00	0.11	0.75	0.66	0.21	0.28	0.02	0.01	0.01	0.01
ESM 96	0.95	0.01	0.01	0.02	0.69	0.25	0.12	0.20	0.01	0.04	0.03	0.03
ESM 97	0.02	0.00	0.00	0.11	0.19	0.46	0.14	0.21	0.00	0.00	0.00	0.00
ESM 98	0.00	0.00	0.00	0.07	0.04	0.74	0.02	0.85	0.06	0.00	0.00	0.76
ESM 99	0.78	0.00	0.00	0.51	0.25	0.37	0.25	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
ESM 100	0.00	0.00	0.02	0.08	0.04	0.64	0.02	0.52	0.01	0.79	0.51	0.51
ESM 101	0.44	0.00	0.00	0.08	0.28	0.06	0.04	0.45	0.35	0.06	0.05	0.05
ESM 102	0.00	0.00	0.00	0.02	0.05	0.32	0.41	0.25	0.00	0.39	0.97	0.97
ESM 103	0.05	0.00	0.09	0.63	0.19	0.10	0.63	0.04	0.00	0.17	0.09	0.09
ESM 104	0.01	0.00	0.08	0.02	0.02	0.60	0.54	0.94	0.00	0.00	0.00	0.00
ESM 105	0.00	0.40	0.87	0.18	0.01	0.81	0.85	0.43	0.00	0.00	0.05	0.05
ESM 106	0.01	0.03	0.94	0.04	0.06	0.09	0.53	0.18	0.02	0.39	0.00	0.00
ESM 107	0.00	0.01	0.01	0.37	0.08	0.42	0.48	0.74	0.00	0.00	0.00	0.00
ESM 108	0.25	0.00	0.01	0.07	0.87	0.45	0.04	0.07	0.00	0.00	0.02	0.02
ESM 109	0.01	0.02	0.15	0.03	0.06	0.07	0.66	0.65	0.00	0.00	0.00	0.00
ESM 110	0.00	0.00	0.10	0.83	0.00	0.27	0.28	0.97	0.00	0.00	0.14	0.14
ESM 111	0.99	0.02	0.00	0.06	0.81	0.46	0.36	0.36	0.03	0.10	0.21	0.21
ESM 112	0.17	0.94	0.06	0.58	0.84	0.25	0.00	0.17	0.06	0.00	0.01	0.01
ESM 113	0.01	0.00	0.00	0.01	0.02	0.68	0.02	0.42	0.00	0.00	0.00	0.00
ESM 114	0.00	0.00	0.00	0.26	0.09	0.03	0.37	0.86	0.00	0.00	0.00	0.00
ESM 115	0.00	0.00	0.00	0.35	0.06	0.70	0.00	0.41	0.00	0.00	0.00	0.00
ESM 116	0.01	0.00	0.06	0.06	0.03	0.78	0.37	0.53	0.00	0.00	0.67	0.67

4.9. MKH'lerin Metabolik Karakterizasyonu, Metabolomiks Yolak Analizleri

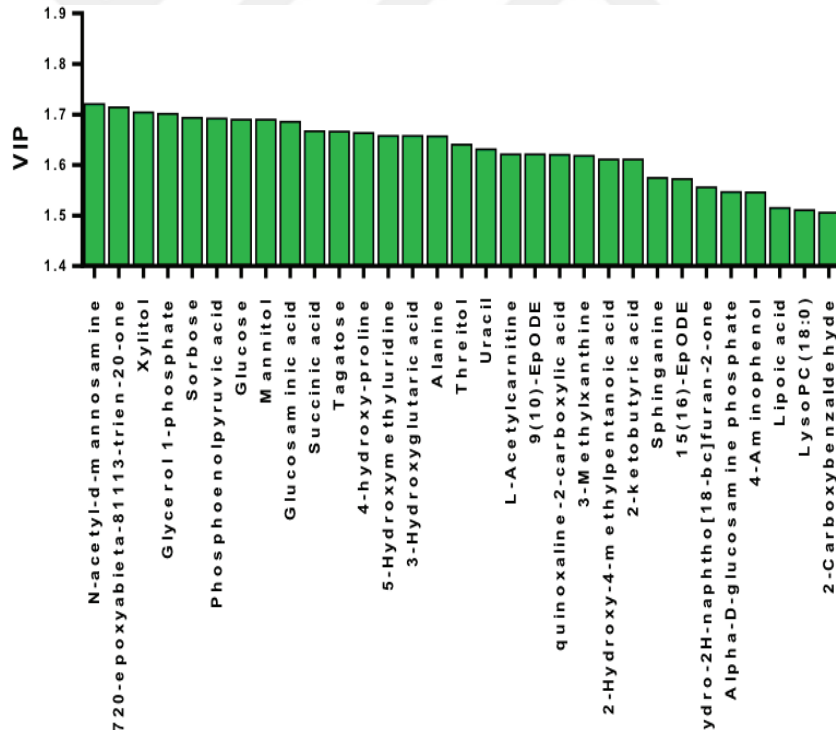
En yüksek VIP değerine sahip metabolit ayırimda en büyük etkiye sahip metabolittir. Dolayısıyla belirlenen gruplar arasında istatistiksel olarak en çok farklılık gösteren metabolittir ve bu metabolitler belirteç olarak değerlendirilir. VIP grafiklerinden önemli olan metabolitler bulunmasına rağmen hangi grup içinde hangi metabolitin derişiminin arttığı veya azaldığını bulmak regresyon analizi sonucunda elde edilen katsayılarla verilir. Pozitif olan kontrol grubunda yüksek derişimde iken negatif olan ise kontrol grubunda azalmıştır. Elde edilen metabolitler ile en son olarak yolak analizleri yapılarak, fenotiple en çok hangi yolağın değıştığı bulunmuştur. FBS, PL, KİP ve PPP varlığında ve inflamatuvar koşullar altında MKH'ler istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve anlamlı değışen metabolitler kullanılarak ($p < 0,05$) yolak analizleri (MetaboAnalyst, Kanada) gerçekleştirilmiştir.

4.9.1. PL Eklentisi ile Çoğaltılan MKH'lerin Metabolik Karakterizasyonu/FBS ile karşılaştırmalı analizi:

PL varlığında çoğaltılan MKH'ler ile standart kültür koşulları olan FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolitlerinin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerindeki farklılaşmaya neden olan metabolitlerin belirlenmesi için VIP (projede önemli değışken) grafiklerinden yararlanılmıştır. (Şekil 4.34 ve 4.35). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir

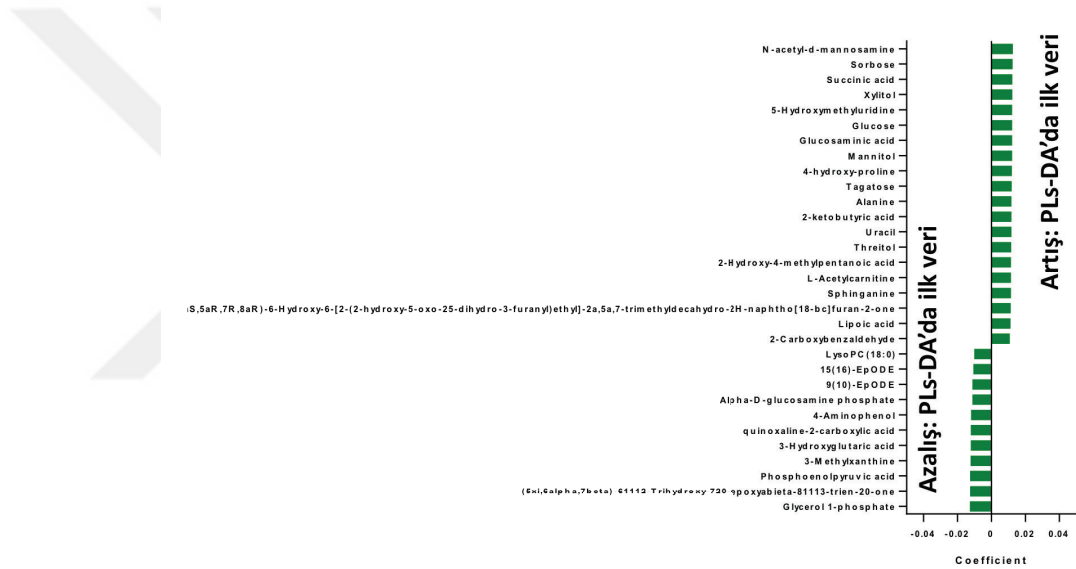


Şekil 4.34 PL ve FBS varlığında altında çoğaltılan MKH'lere ait metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0.581 ve Q^2 :0.971). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.35 PL ve FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

N-acetil-d-mannosamine, Sorbose, Succinic acid, Xylitol, 5-Hydroxymethyluridine, Glucose, Glucosaminic acid, Mannitol, 4-hydroxy prolin, Tagatose, Alanine, 2- ketobutyric acid, Uracil, Threitol, 2-hydroxy-4-methylpentanoic acid, L-acetylcarnitine, Sphinganine, Lipoic acid ve 2-carboxybenzaldehyde PL ile çoğaltılan MKH'lerde, FBS ile çoğaltılan MKH'lere göre artmış olarak bulunmuştur. Lyso PC, EpODE, Alpha-D-glucosamine phosphate, 4-aminophenol, quinoxaline-2-carboxylic acid, 3-hydroxyglutaric acid, 3-methylxanthine, Phosphoenolpurivic acid ve glycerol-1-phosphate ise PL ile çoğaltılan MKH'lerde, FBS ile çoğaltılan MKH'lere göre azalmış olarak bulunmuştur (Şekil 4.36).

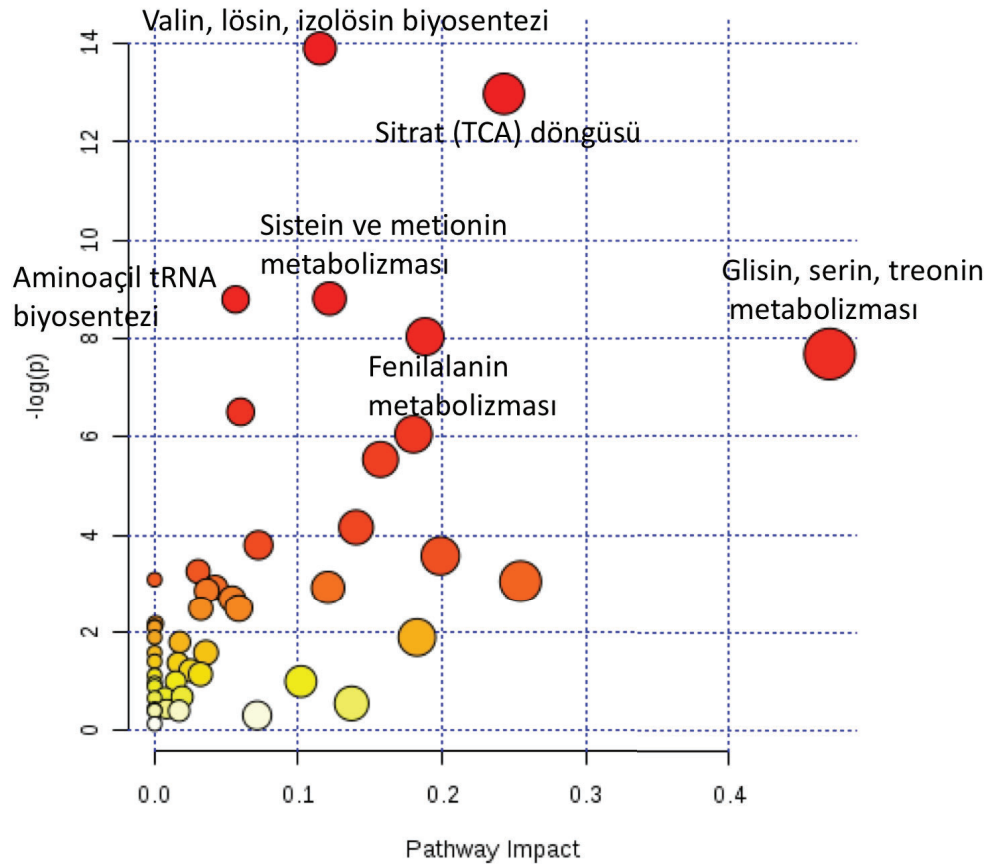


Şekil 4.36 PL ve FBS varlığında altında çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi.

PL varlığında çoğaltılan MKH'ler ile standart kültür koşulları olan FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolitlerinin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.14, Şekil 4.37 ve Şekil 4.38'de sunulmuştur.

Tablo 4.14 FBS-PL eklentileri ile çoğaltılan MKH'lerde istatistiksel olarak önemli değişen intrasellüler metabolitlerin yer aldıkları yollar

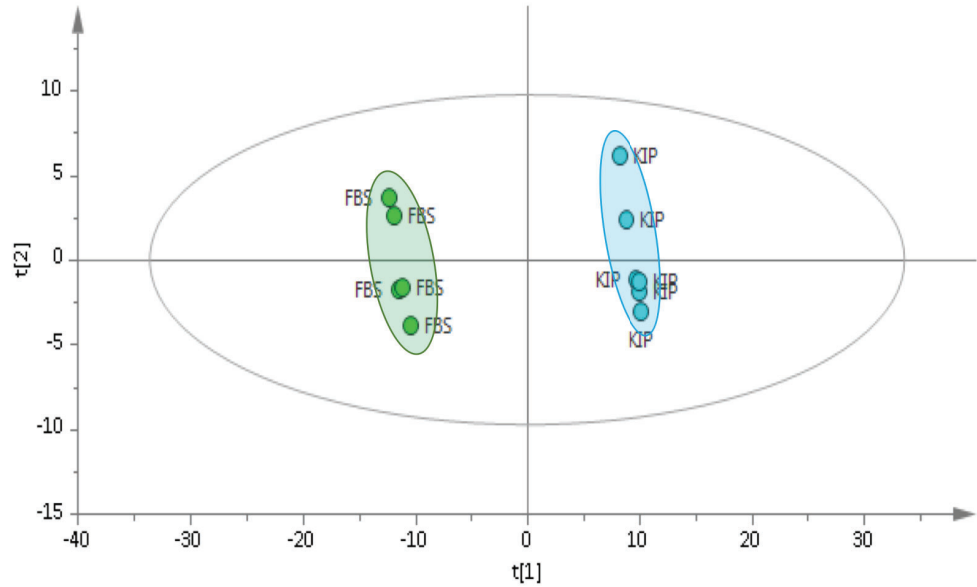
	Toplam metabolit sayısı	Anlamlı bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	27	7	0,58	0,00
Citrate cycle (TCA cycle)	20	6	0,43	0,00
Cysteine and methionine metabolism	56	7	1,21	0,00
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	75	8	1,62	0,00
Phenylalanine metabolism	45	6	0,97	0,00
Glycine, serine and threonine metabolism	48	6	1,04	0,00
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	4	0,52	0,00
Pantothenate and CoA biosynthesis	27	4	0,58	0,00
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	50	5	1,08	0,00
Sphingolipid metabolism	25	3	0,54	0,02
Tyrosine metabolism	76	5	1,64	0,02
Glycolysis or Gluconeogenesis	31	3	0,67	0,03
Propanoate metabolism	35	3	0,76	0,04



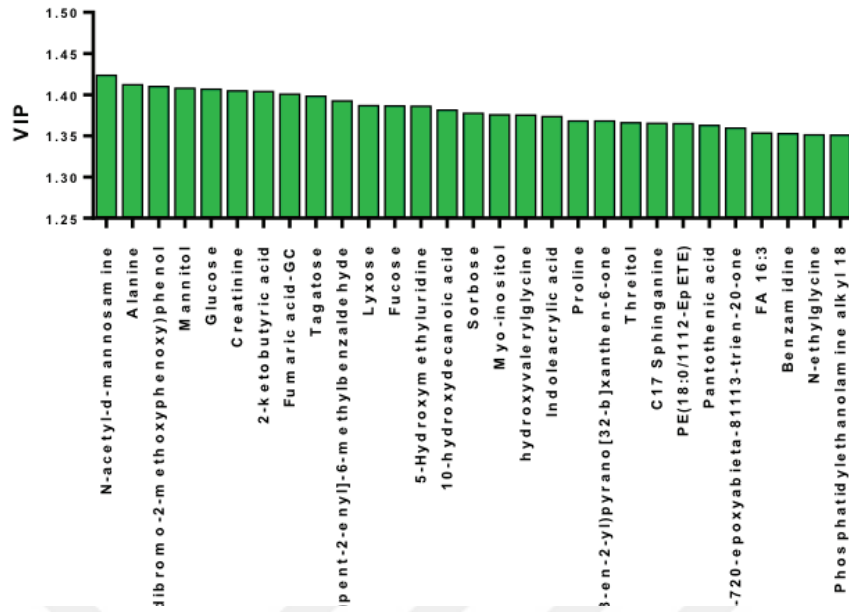
Şekil 4.37 FBS-PL eklentileri ile çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolomik yolak analizi (renkler p değerini (kırmızı: $p < 0,05$), halkaların büyüklüğü: yolağın impaktını, yani metabolitin etkilediği yolak sayısını ifade eder)

4.9.2. KİP Eklentisi ile Çoğaltılan MKH'lerin Metabolik Karakterizasyonu/FBS ile karşılaştırmalı analizi:

KİP varlığında çoğaltılan MKH'ler ile standart kültür koşulları olan FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolitlerinin metabolomik verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerindeki farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (projede önemli değişken) grafiklerinden yararlanılmıştır. (Şekil 4.39 ve 4.40). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.

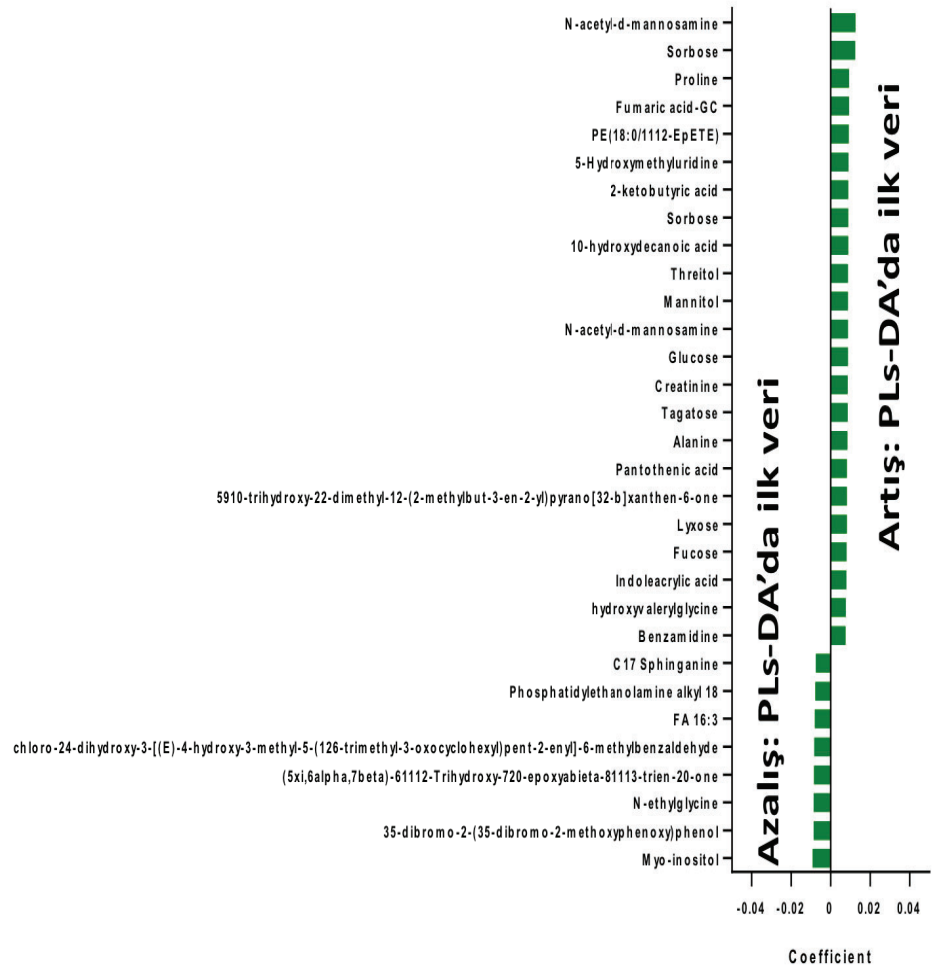


Şekil 4.39 KİP ve FBS varlığında altında çoğaltılan MKH'lere ait metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0.538 ve Q^2 :0.976). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir



Şekil 4.40 KİP ve FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu N-acetil-d-mannosamine, Sorbose, Proline, Fumaric acid, 5-hydroxymethyluridine, 2- ketobutyric acid, Sorbose, 10-hydroxydecanoic acid, Threitol, Mannitol, N-acetyl-d-mannosamine, Glucose, Creatinine, Tagatose, Alanine, Pantothenic acid, Lyxose, Fucose, Indoleacrylic acid ve Benzamide KİP ile çoğaltılan MKH'lerde, FBS ile çoğaltılan MKH'lere göre artmış olarak bulunmuştur. C 17 Sphinganine, Phosphatidylethanolamine alkyl 18, Methyl benzaldehyde, N-asetyl glisine, Phenol ve Myoinositol KİP ile çoğaltılan MKH'lerde, FBS ile çoğaltılan MKH'lere göre azalmış olarak bulunmuştur (Şekil 4.41).

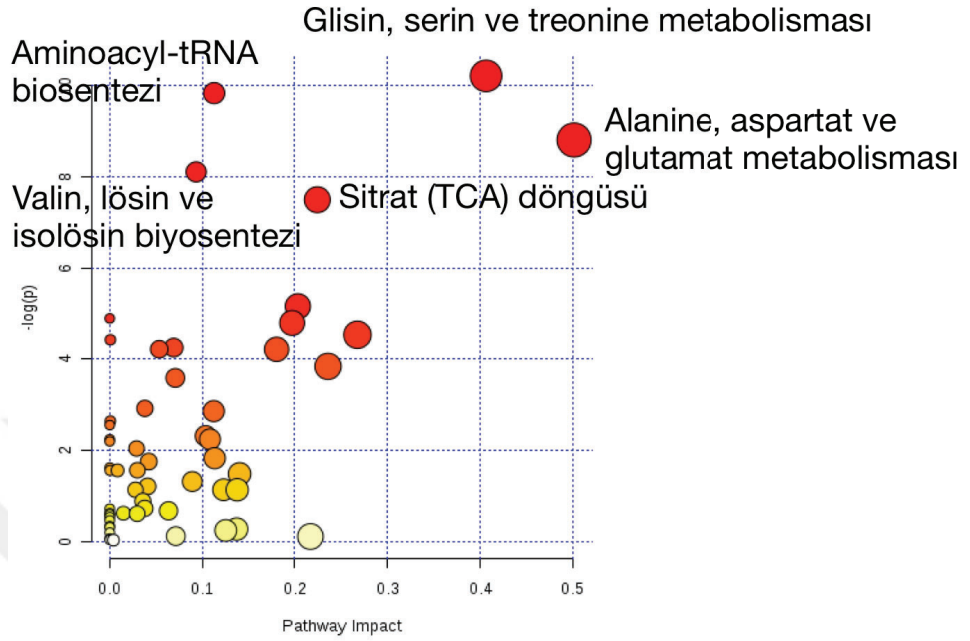


Şekil 4.41 KİP ve FBS varlığında altında çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi.

KİP varlığında çoğaltılan MKH'ler ile standart kültür koşulları olan FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolitlerinin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.15, Şekil 4.42 ve Şekil 4.43'de sunulmuştur.

Tablo 4.15 FBS-KIP eklentileri ile çoğaltılan MKH'lerde istatistiksel olarak önemli değişen intrasellüler metabolitlerin yer aldıkları yollar

	Toplam metabolit sayısı	Anımlı bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Glycine, serine and threonine metabolism	48	9	1,73	0,00
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	75	11	2,71	0,00
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	6	0,87	0,00
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	27	6	0,98	0,00
Citrate cycle (TCA cycle)	20	5	0,72	0,00
Arginine and proline metabolism	77	8	2,78	0,01
Fatty acid biosynthesis	49	6	1,77	0,01
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	50	6	1,81	0,01
Glutathione metabolism	38	5	1,37	0,01
Nitrogen metabolism	39	5	1,41	0,01
Cysteine and methionine metabolism	56	6	2,02	0,01
Galactose metabolism	41	5	1,48	0,01
Pantothenate and CoA biosynthesis	27	4	0,98	0,01
Phenylalanine metabolism	45	5	1,63	0,02
Fructose and mannose metabolism	48	5	1,73	0,03



Şekil 4.42 FBS-KiP eklentileri ile çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolomik yolak analizi

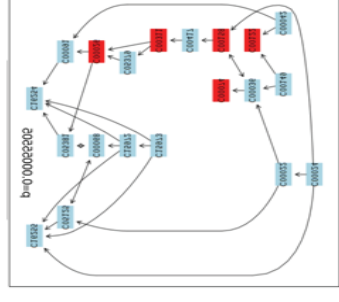
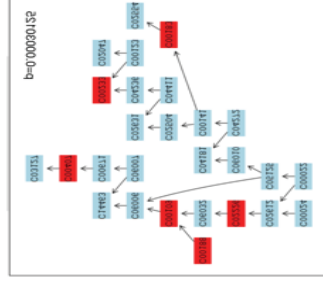
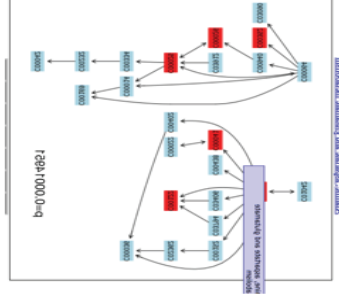
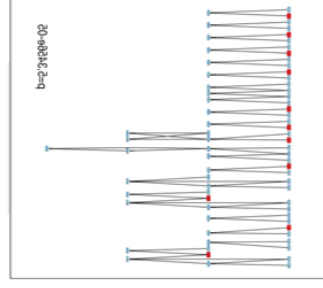
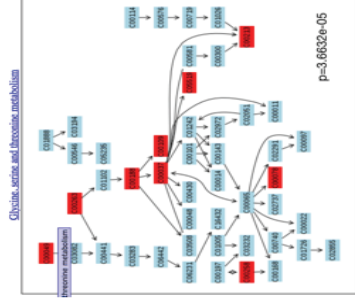
Glisin, serin, treonin
metabolizması

Aminoacyl-tRNA
biyosentezi

Alanin, aspartat ve
glutamat metabolizması

Valin, lösin ve izolösin
biyosentezi

Sitrat (TCA) döngüsü

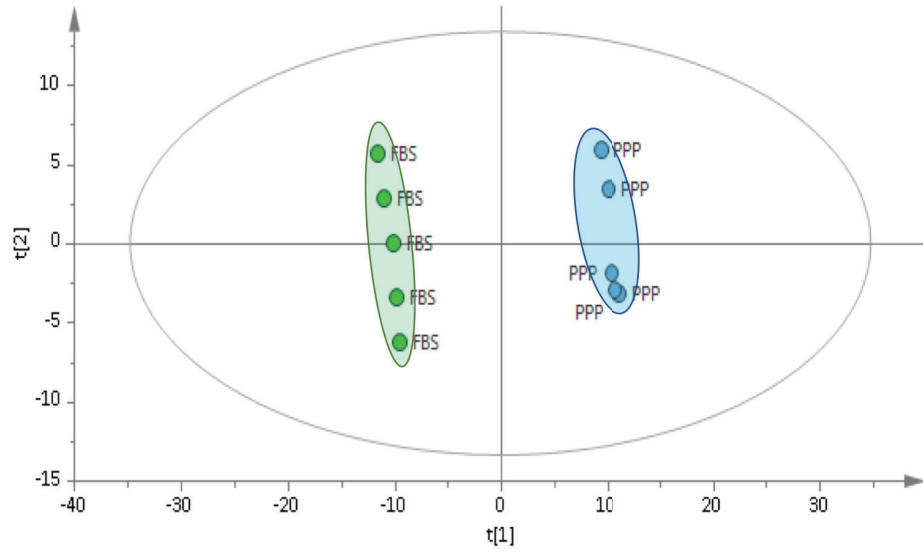


Şekil 4.43 FBS-KIP eklentileri ile çoğaltılan MKH'lerde istatistiksel olarak önemli değişen intrasellüler metabolitlerin yer aldıkları yollar

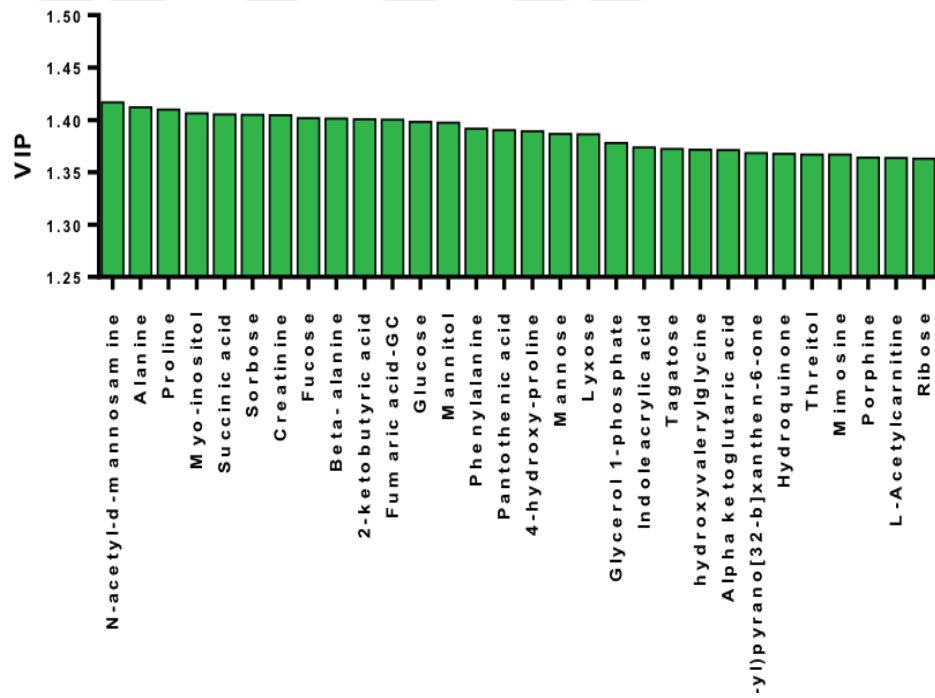
FBS ve KİP varlığında çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolitlerinin, anlamlı düzeyde farklılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptanan metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda eklentiye bağlı değişen yollar incelendiğinde (Tablo 4.15 ve Şekil 4.42, 4.43) en anlamlı değişiklik glisin, serin, treonin metabolizmasında görülmüştür. Ayrıca aminoaçil tRNA biyosentezi, alanin, aspartat glutamat metabolizması, valin, lösin, izolösin biyosentezi, sitrat (TCA) döngüsü, arginin ve prolin metabolizması, yağ asit biyosentezi, glioksilat ve dikarboksilat metabolizması, glutatyon metabolizması, nitrojen metabolizması, sistein, metyonin metabolizması, galaktoz metabolizması, pantotenat ve CoA biyosentezi, fenilalanin metabolizması, fruktoz ve mannoz metabolizması anlamlı değişiklik gösteren diğer yollardır.

4.9.3. PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolik karakterizasyonu/FBS ile karşılaştırmalı analizi:

PPP varlığında çoğaltılan MKH'ler ile standart kültür koşulları olan FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolitlerinin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerindeki farklılaşmaya neden olan metabolitlerin belirlenmesi için VIP (projede önemli değişken) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.44 ve 4.45). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir



Şekil 4.44 PPP ve FBS varlığında altında çoğaltılan MKH'lere ait metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0.576 ve Q^2 :0.983). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.45 PPP ve FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu Fumaric acid, Proline, Hydroquinone, N-acetyl-d-mannosamine, Mannitol, Glucose, Pantothenic acid, 4-hydroxy-proline, Creatinine, 2- ketobutyric acid, Alanine, Sorbose, Fucose, Alpha keto glutaric acid, Phenylalanine, Lyxose, Indoleacrylic acid, Glycerol 1-phosphate, Tagatose, L-acetylcarnitine, Threitol, Mimosine, Hydroxyvalerylglycine PPP ile çoğaltılan MKH'lerde, FBS ile çoğaltılan MKH'lere göre artmış olarak bulunmuştur. Porphine, Ribose, Mannose, Succinic acid, Beta-alanine ve Myoinositol ise PPP ile çoğaltılan MKH'lerde, FBS ile çoğaltılan MKH'lere göre azalmış olarak bulunmuştur (Şekil 4.46).

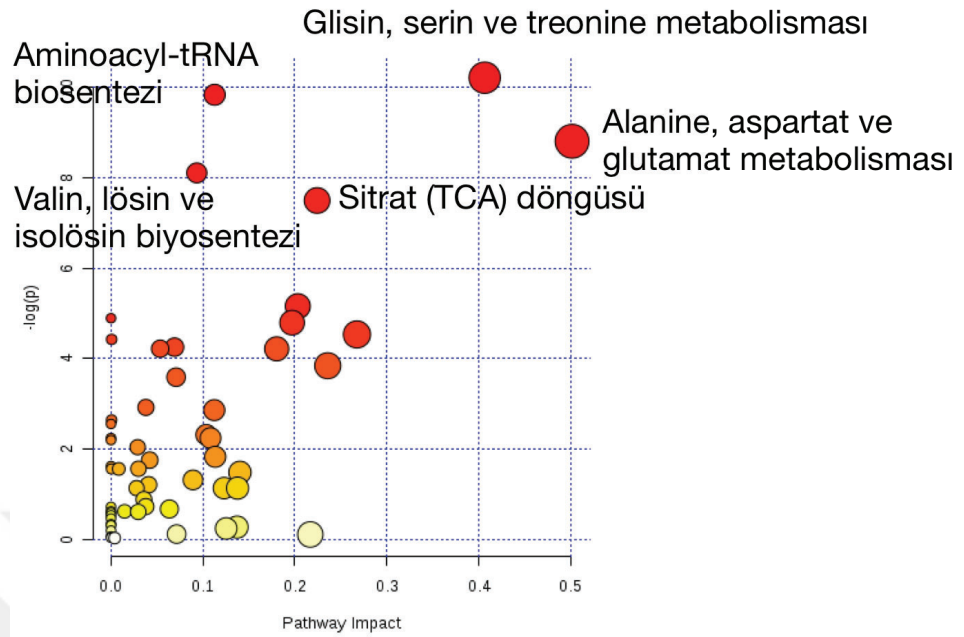


Şekil 4.46 PPP ve FBS varlığında altında çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi.

PPP varlığında çoğaltılan MKH'ler ile standart kültür koşulları olan FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolitlerinin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.16, Şekil 4.47 ve Şekil 4.48'de sunulmuştur.

Tablo 4.16 FBS-PPP eklentileri ile çoğaltılan MKH'lerde istatistiksel olarak önemli değişen intrasellüler metabolitlerin yer aldıkları yolaklar

	Toplam metabolit sayısı	Anlamli bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	7	0,84	0,00
Glycine, serine and threonine metabolism	48	9	1,68	0,00
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	75	11	2,62	0,00
Citrate cycle (TCA cycle)	20	6	0,70	0,00
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	27	6	0,94	0,00
Arginine and proline metabolism	77	9	2,69	0,00
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	50	7	1,74	0,00
Cysteine and methionine metabolism	56	7	1,95	0,00
Phenylalanine metabolism	45	6	1,57	0,00
Fatty acid biosynthesis	49	6	1,71	0,01
Glutathione metabolism	38	5	1,33	0,01
Nitrogen metabolism	39	5	1,36	0,01
Butanoate metabolism	40	5	1,40	0,01
Galactose metabolism	41	5	1,43	0,01
Pantothenate and CoA biosynthesis	27	4	0,94	0,01
Propanoate metabolism	35	4	1,22	0,03



Şekil 4.47 FBS-PPP eklentileri ile çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolomik yolak analizi

Alanin, aspartat ve

glutamat metabolizması

Glisin, serin, treonin

metabolizması

Aminoacyl-tRNA

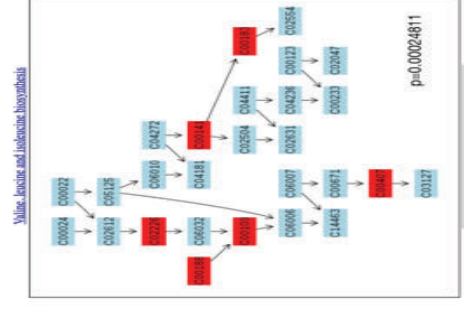
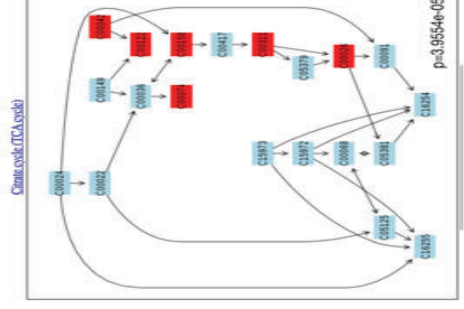
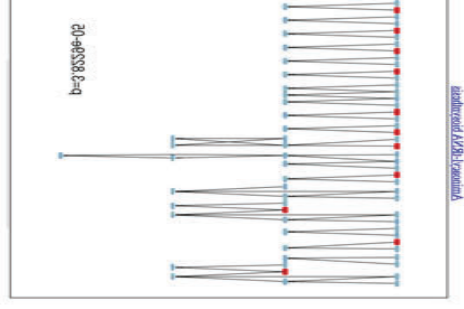
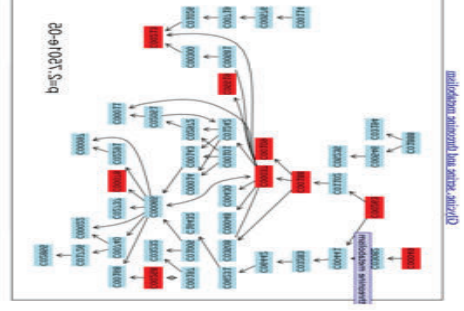
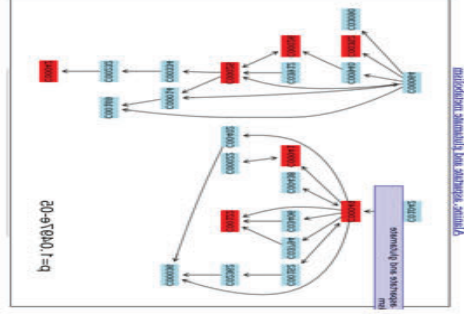
biosentezi

Sitrat (TCA) döngüsü

biosentezi

Valin, lösin and izolösin

biosentezi

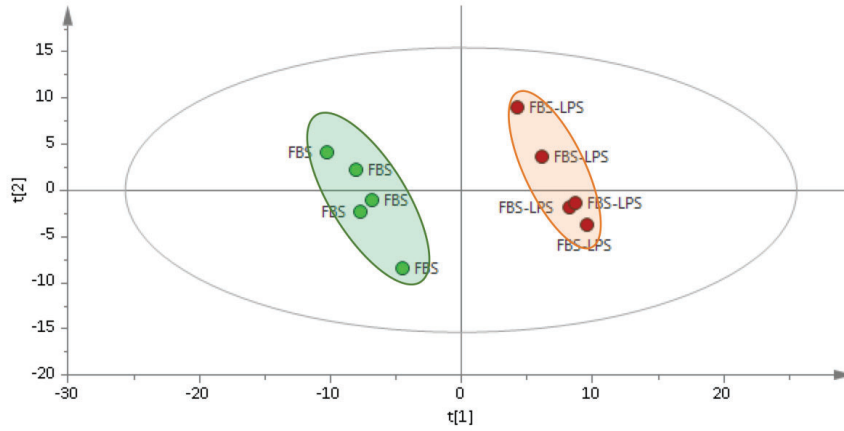


Şekil 4.48 FBS-PPP eklenmeleri ile çoğaltılan MKH'lerde istatistiksel olarak önemli değişen intrasellüler metabolitlerin yer aldıkları yollar

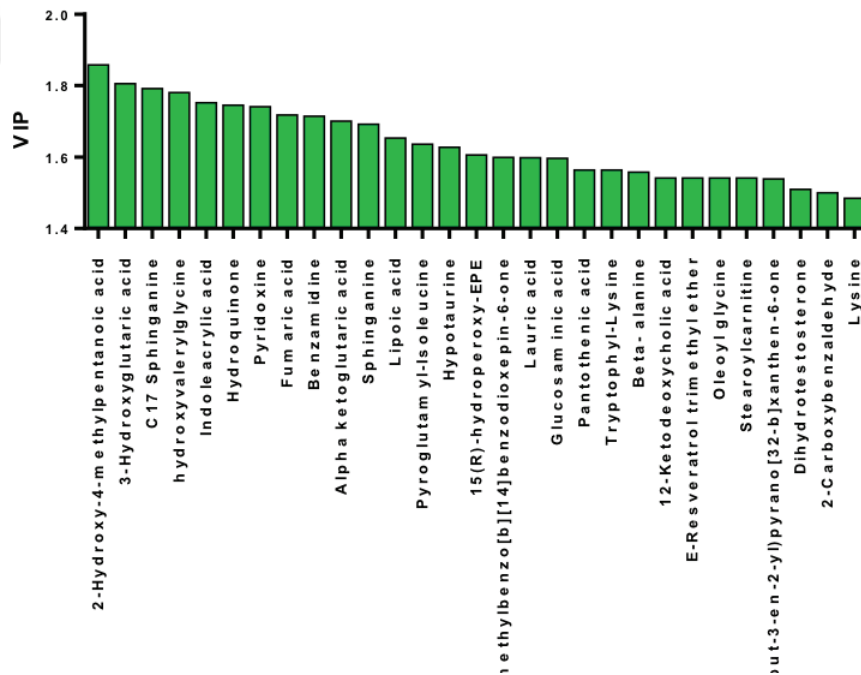
FBS ve PPP varlığında çoğaltılan MKH'lerin anlamlı düzeyde farklılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptanan intrasellüler metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda ise anlamlı değişen yollar Tablo 4.16 ve Şekil 4.49, 4.50'de sunulmuş olup, en anlamlı değişiklik alanın, aspartat glutamat metabolizmasında görülmüştür. Glisin, serin, treonin metabolizması, aminoasit tRNA biyosentezi, sitrat (TCA) döngüsü, valin, lösin, izolösin biyosentezi, arginin ve prolin metabolizması, glioksilat ve dikarboksilat metabolizması, sistein, metyonin metabolizması, fenilalanin metabolizması, yağ asit biyosentezi, glutatyon metabolizması, nitrojen metabolizması, butanoat metabolizması, galaktoz metabolizması, pantotenat ve CoA biyosentezi ve propanoat metabolizması anlamlı değişiklik gösteren diğer yollardır.

4.9.4. İnflamasyon varlığında FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolomik karakterizasyonu:

Standart kültür koşulları olan FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin metabolomik verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılaşma gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.49 ve 4.50). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.

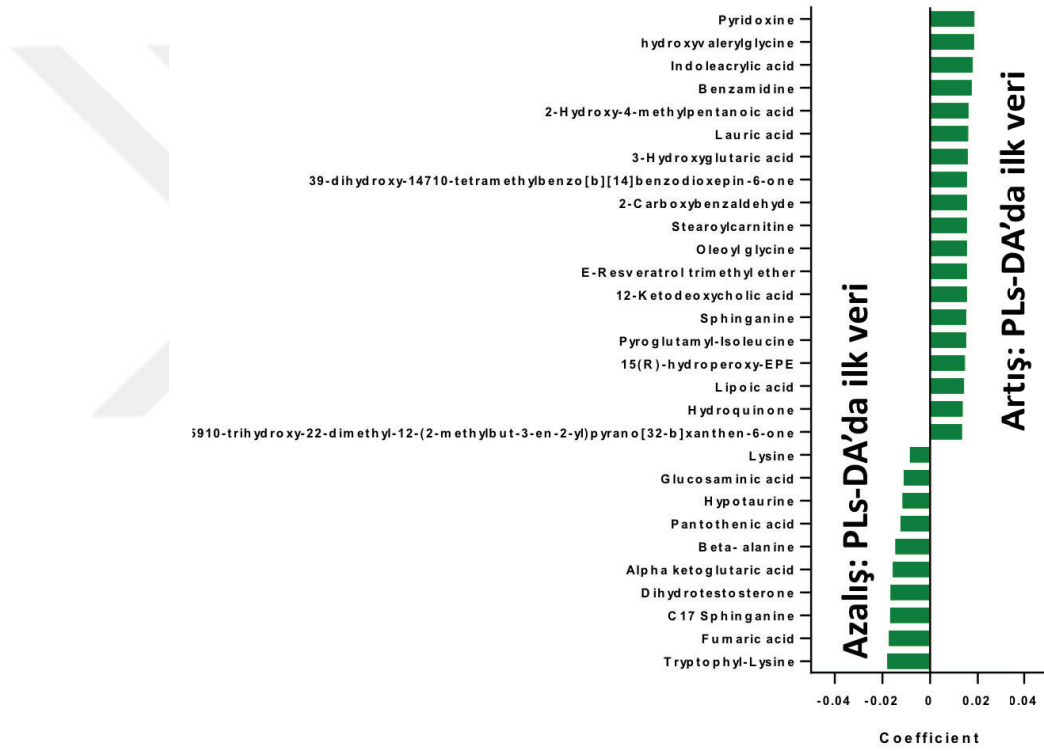


Şekil 4.49 İnflamatuvar uyarım varlığında FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0.628 ve Q^2 :0.956). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.50 İnflamatuvar uyarım varlığında FBS eklentisi içeren besiyerinde çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu inflamatuvar uyarım varlığında Pyridoxine, Hydroxyvalerylglycine, Indoleacrylic acid, Benzamidine, Pentanoic acid, Lauric acid, 3-hydroxyglutaric acid, 2-carboxybenzaldehyde, Stearoylcarnitine, Oleoylglycine, E-Resveratrol trimethyl ether, 12-Ketodeoxycholic acid, Sphinganine, Pyroglutamyl-Isoleucine, Lipoic acid, Hydroquinone artan intrasellüler metabolitlerdir. Lysine, Glucosaminic acid, Hypotaurine, Pantothenic acid, Beta alanine, Alpha ketoglutaric acid, Dihydrotestosterone, C17 Sphinganine, Fumaric acid, Tryptophyl lysine ise FBS ile çoğaltılan MKH'lerde inflamasyon varlığında azalmaktadır (Şekil 4.51).

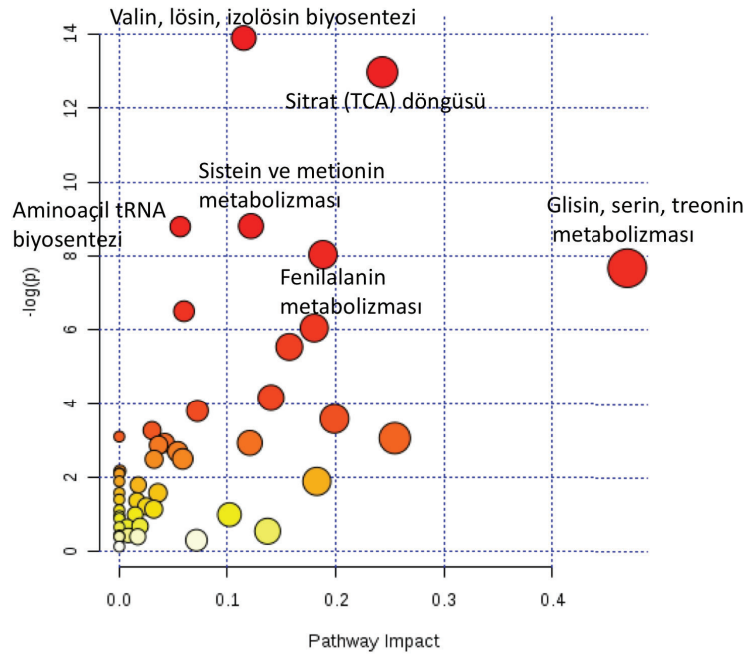


Şekil 4.51 İnflamatuvar uyarım varlığında FBS eklentisi içeren besiyerinde çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi.

Standart kültür koşulları olan FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.17, Şekil 4.52 ve Şekil 4.53'te sunulmuştur.

Tablo 4.17 Standart kültür koşulları olan FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar

	Toplam metabolit sayısı	Anlamli bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Butanoate metabolism	40	3	0,33	0,00
Citrate cycle (TCA cycle)	20	2	0,17	0,01
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	2	0,20	0,02
Pantothenate and CoA biosynthesis	27	2	0,22	0,02
beta-Alanine metabolism	28	2	0,23	0,02
Vitamin B6 metabolism	32	2	0,27	0,03
Glutathione metabolism	38	2	0,32	0,04



Şekil 4.52 Standart kültür koşulları olan FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yolak analizi

Butanoate metabolizm

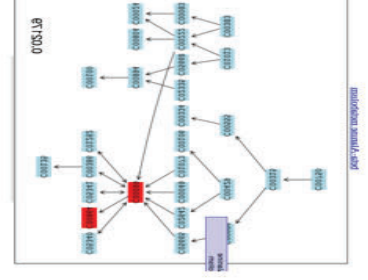
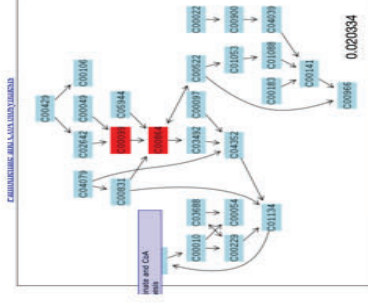
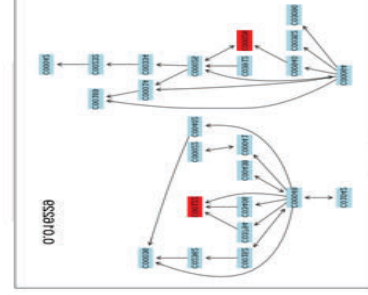
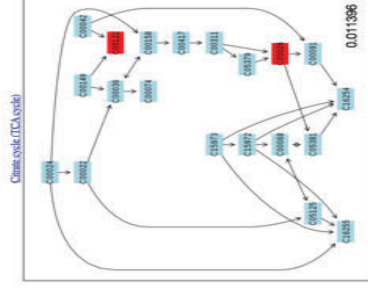
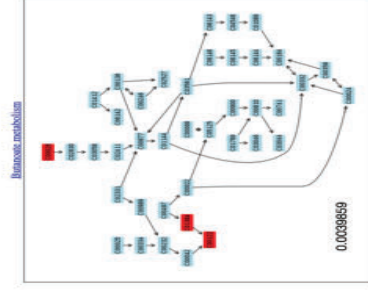
Sitrat (TCA) döngüsü

**Alanine, aspartate
glutamate metabolizm**

**Pantothenate
biosynthesis**

and CoA

**Beta-Alanine
metabolizm**

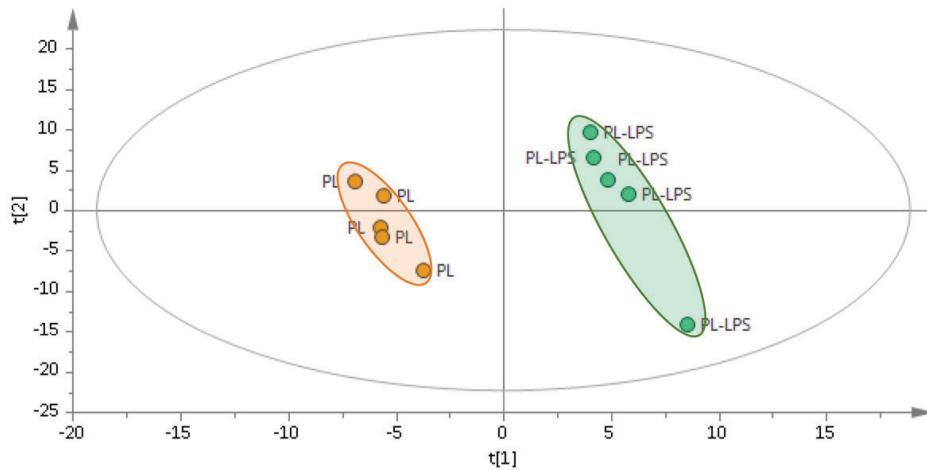


Şekil 4.53 Standart kültür koşulları olan FBS eklenmesi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar

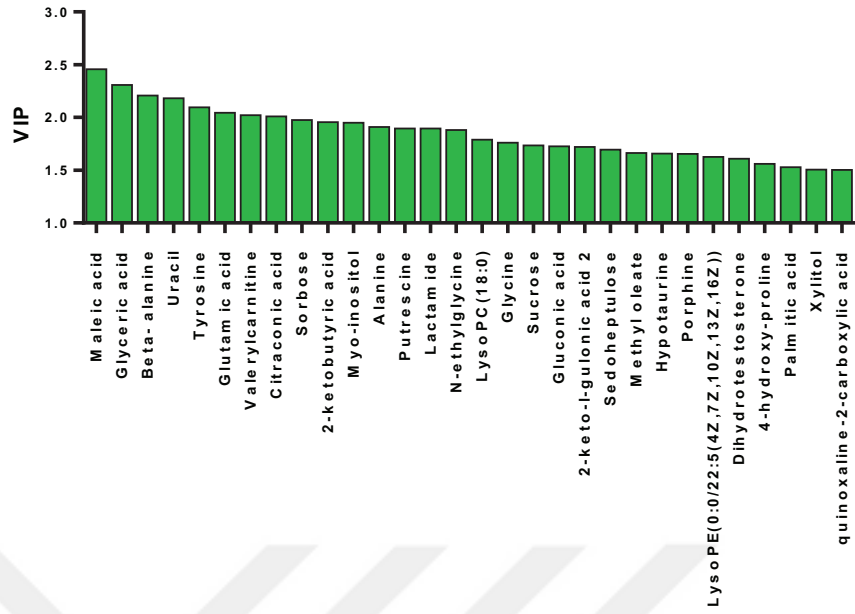
Standart kültür koşulları olan FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar butanoat metabolizması, sitrat (TCA) döngüsü, alanin, aspartat glutamat metabolizması, pantotenat ve CoA biyosentezi, beta-Alanin metabolizması, Vitamin B6 metabolizması ve glutatyon metabolizması olarak bulunmuştur (Tablo 4.17, Şekil 4.52, 53).

4.9.5. İnflamasyon varlığında PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolomik karakterizasyonu:

MKH kültüründe insan kaynaklı PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin metabolomik verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.54 ve 4.55). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir

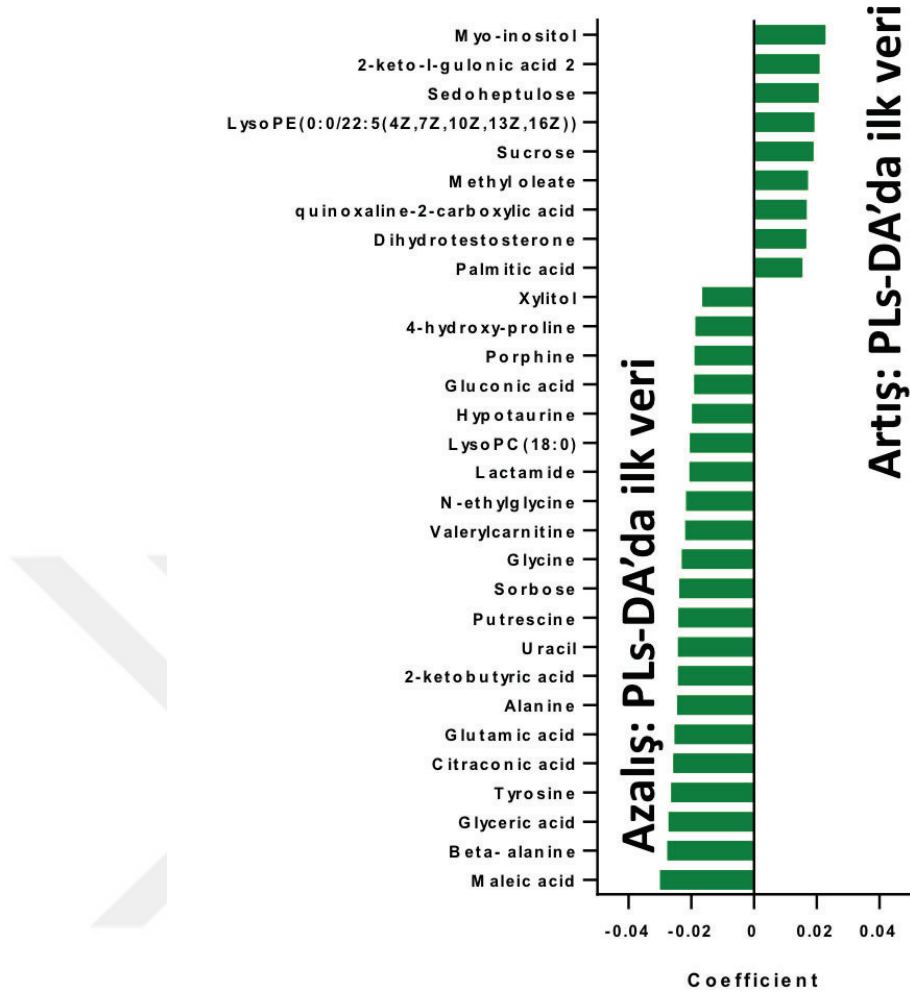


Şekil 4.54 İnflamatuvar uyarım varlığında PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0.604 ve Q^2 :0.929). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir



Şekil 4.55 İnflamatuvar uyarım varlığında PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu PL ile çoğaltılan MKH'lerde inflamatuvar uyarım varlığında Myoinositol, 2-keto-l-gulonic acid 2, Sedoheptulose, Sucrose, Methyl oleate, Quinoxaline-2-carboxylic acid, Dihydrotestosterone, Palmitic acid artmış bulunurken, Xylitol, 4-hydroxyproline, Porphine, Gluconic acid, Hypotaurine, Lactamide, N-ethylglycine, Valeryl carnitine, Glycine, Sorbose, Putrescine, Uracil, 2-ketobutyric acid, Alanine, Glutamic acid, Citraconic acid, Tyrosine, Glyceric acid, Beta alanine, Maleic acid azalmıştır (Şekil 4.56).

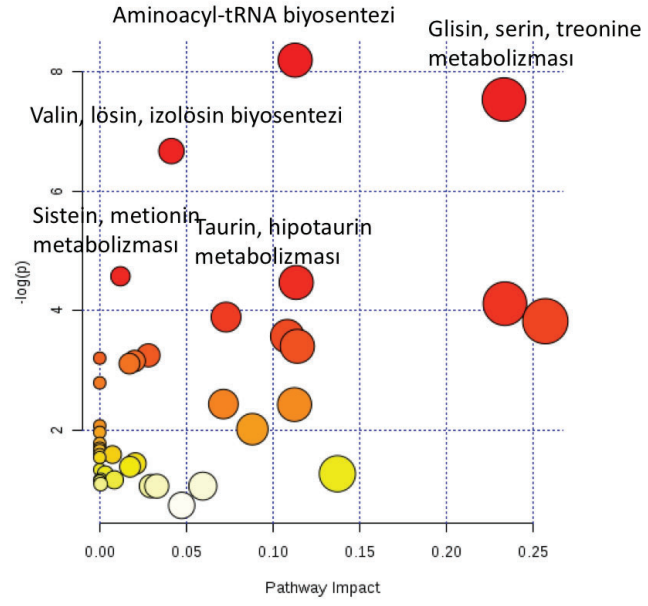


Şekil 4.56 İnflamatuvar uyarım varlığında PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi.

Besiyerine PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.18, Şekil 4.57 ve Şekil 4.58'de sunulmuştur.

Tablo 4.18 Besiyerine PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar

	Toplam metabolit sayısı	Anlamli bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	75	5	0,62	0,00
Glycine, serine and threonine metabolism	48	4	0,40	0,00
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	27	3	0,22	0,00
Cysteine and methionine metabolism	56	3	0,47	0,01
Taurine and hypotaurine metabolism	20	2	0,17	0,01
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	2	0,20	0,02
Pantothenate and CoA biosynthesis	27	2	0,22	0,02
beta-Alanine metabolism	28	2	0,23	0,02
Pentose phosphate pathway	32	2	0,27	0,03
Propanoate metabolism	35	2	0,29	0,03
Glutathione metabolism	38	2	0,32	0,04
Nitrogen metabolism	39	2	0,32	0,04
Butanoate metabolism	40	2	0,33	0,04
Galactose metabolism	41	2	0,34	0,04



Şekil 4.57 Besiyerine PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar

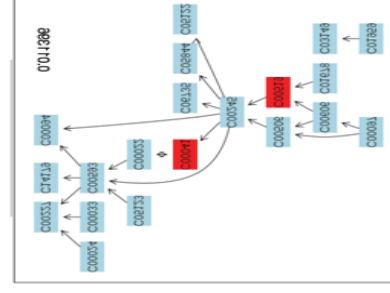
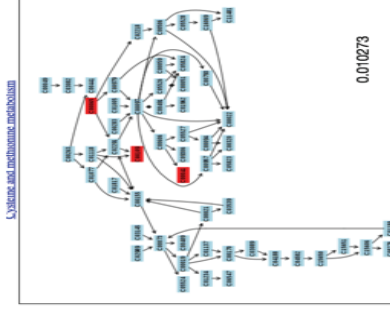
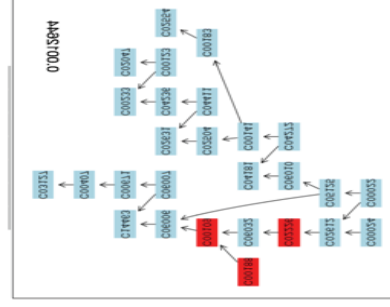
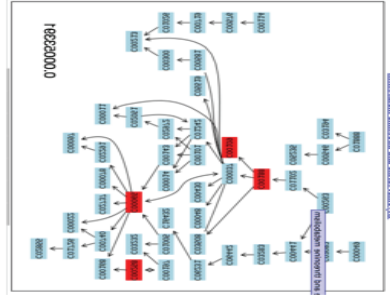
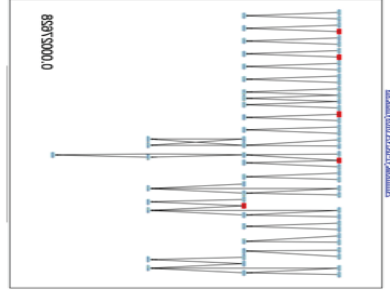
Aminoacyl-tRNA biosynthesis

Glycine, serine and threonine metabolism

Valine, leucine and isoleucine biosynthesis

Cysteine and methionine metabolism

Taurine and hypotaurine metabolism

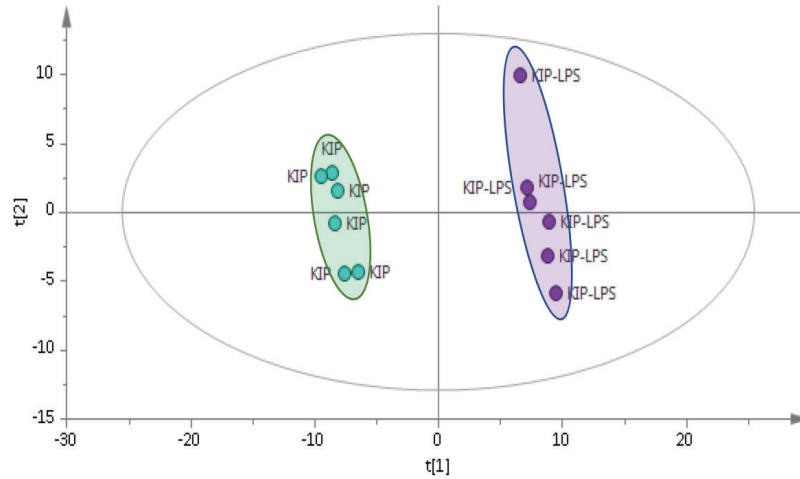


Şekil 4.58 Besiyerine PL eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar

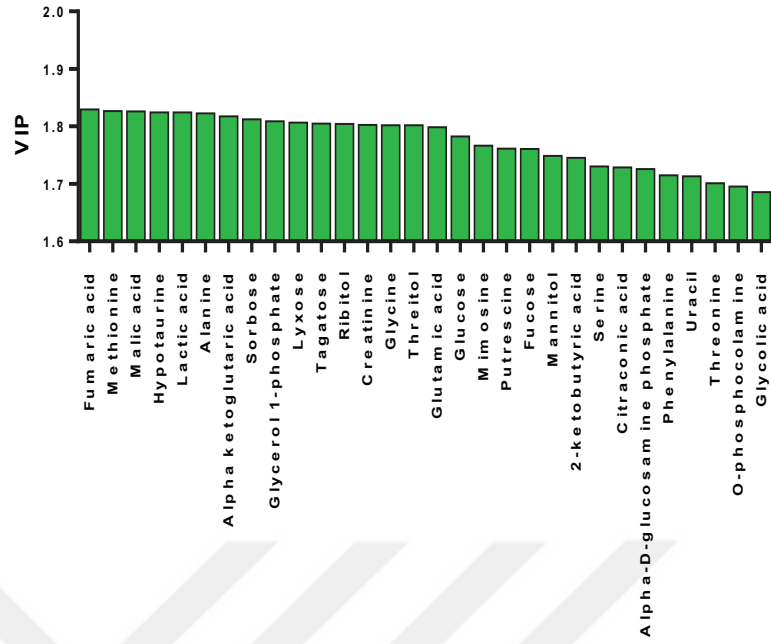
İnflamatuvar uyarım varlığı, PL ile çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollarda aminoasit tRNA biyosentezi, glisin, serin, treonin metabolizması, valine, lösin ve izolösin biyosentezi, sistein ve metionin metabolizması, taurin ve hipotaurin metabolizması, alanin, aspartat glutamat metabolizması, pantotenat ve CoA metabolizması, beta-alanin metabolizması, pentoz fosfat yolağı, propanoat, glutatyon, nitrojen, butanoat, galaktoz metabolizmasını değiştirmiştir (Tablo 4.18, Şekil 4.57, 58).

4.9.6. İnflamasyon varlığında KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolomik karakterizasyonu:

MKH kültüründe insan kaynaklı KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin metabolomik verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerindeki farklılaşmaya neden olan metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.59 ve 4.60). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir

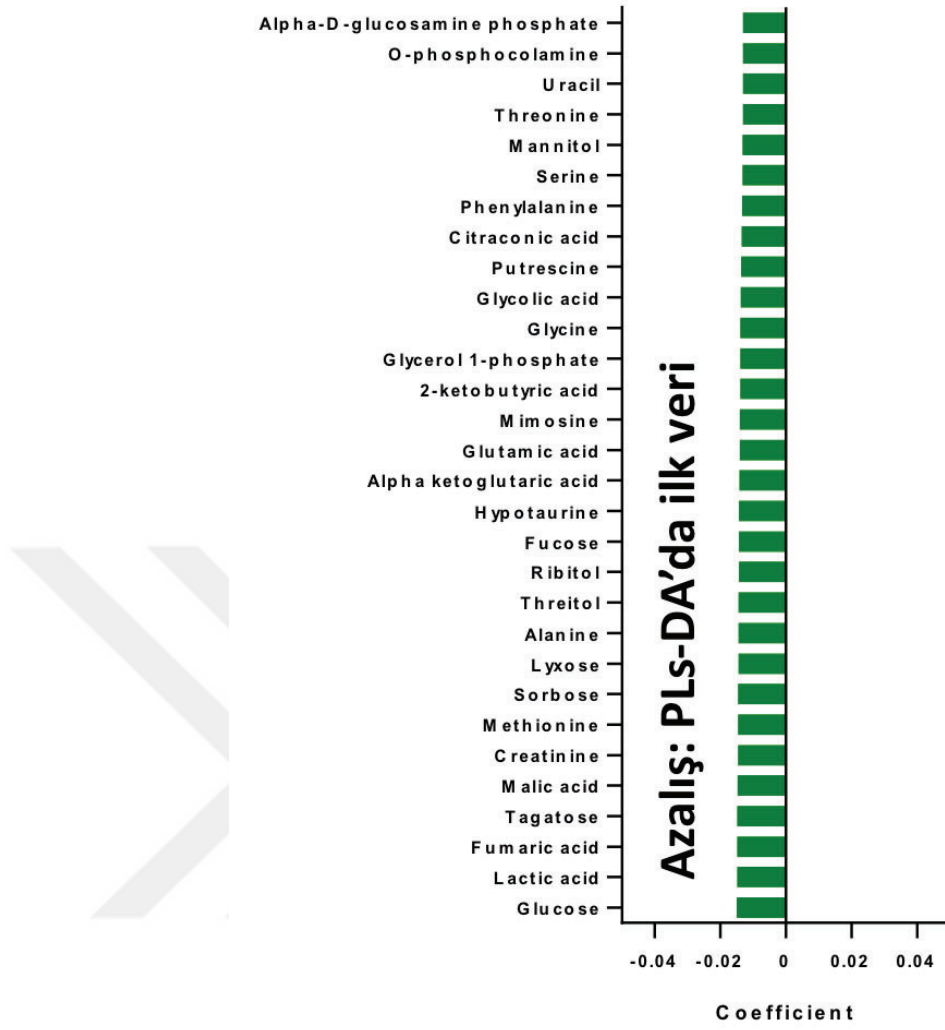


Şekil 4.59 İnflamatuvar uyarım varlığında KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0.594 ve Q^2 :0.961). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.60 İnflamatuvar uyarım varlığında KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu KİP ile çoğaltılan MKH'lerde inflamatuvar uyarım varlığında artan metabolit olmamış, Alpha-D-glucosamine phosphate, O-Phosphocolamine, Uracil, Threonine, Mannitol, Serine, Phenylalanine, Citraconic acid, Putrescine, Glycolic acid, Glycine, Glycerol-1-phosphate, 2-ketobutyric acid, Mimosine, Glutamic acid, Alpha-ketoglutaric acid, Hypotaurine, Fucose, Ribitol, Threitol, Alanine, Lyxose, Sorbose, Methionine, Creatinine, Malic acid, Tagatose, Fumaric acid, Lactic acid, Glucose azalmıştır (Şekil 4.61).

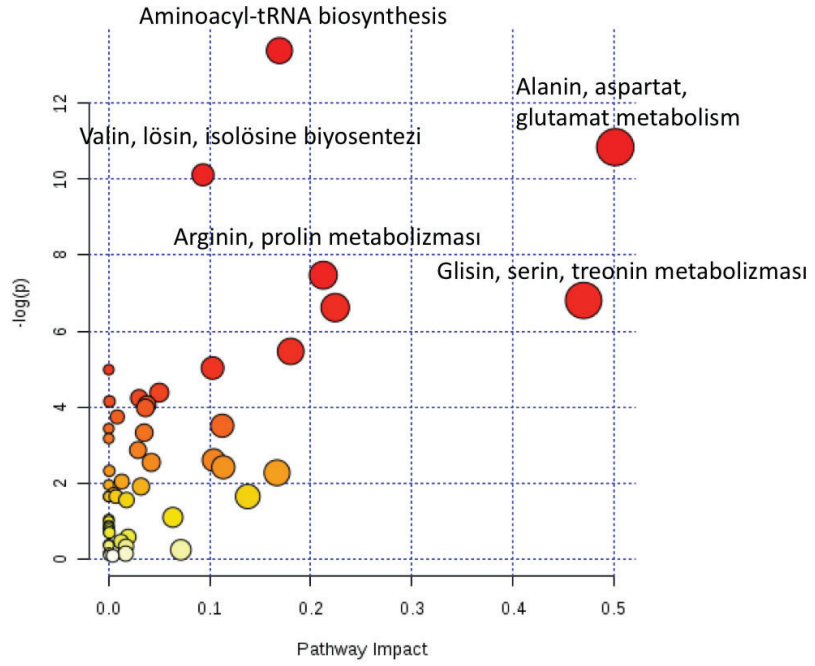


Şekil 4.61 İnflamatuvar uyarım varlığında KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi.

Besiyerine KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.19, Şekil 4.62 ve Şekil 4.63'de sunulmuştur.

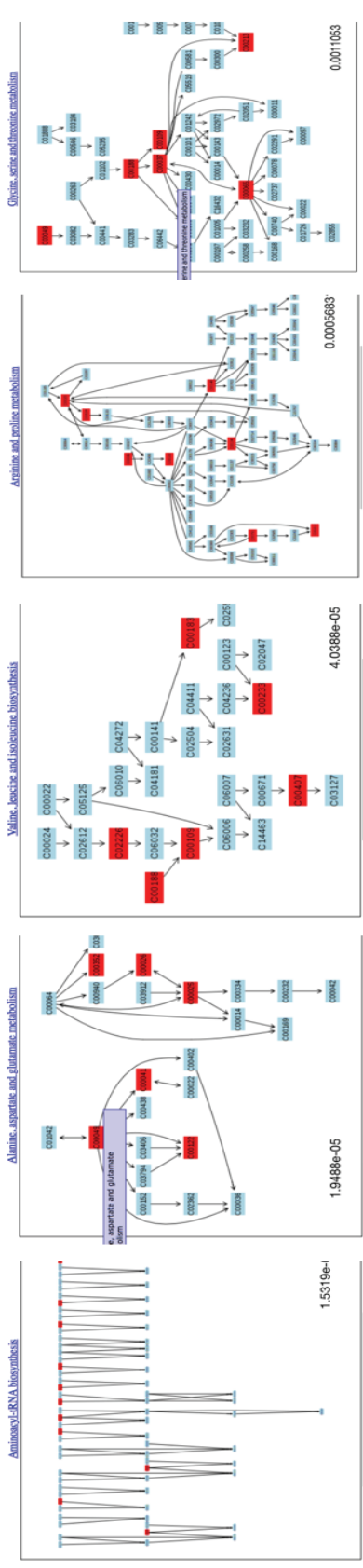
Tablo 4.19 Besiyerine KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar

	Toplam metabolit sayısı	Anlamli bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	75	11	1,90	0,00
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	6	0,61	0,00
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	27	6	0,68	0,00
Arginine and proline metabolism	77	8	1,95	0,00
Glycine, serine and threonine metabolism	48	6	1,22	0,00
Citrate cycle (TCA cycle)	20	4	0,51	0,00
Pantothenate and CoA biosynthesis	27	4	0,68	0,00
Fructose and mannose metabolism	48	5	1,22	0,01
Cyanoamino acid metabolism	16	3	0,41	0,01
Cysteine and methionine metabolism	56	5	1,42	0,01
Glutathione metabolism	38	4	0,96	0,01
Nitrogen metabolism	39	4	0,99	0,02
Butanoate metabolism	40	4	1,01	0,02
Galactose metabolism	41	4	1,04	0,02
Nicotinate and nicotinamide metabolism	44	4	1,12	0,02
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	11	2	0,28	0,03
beta-Alanine metabolism	28	3	0,71	0,03
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	50	4	1,27	0,04
Glycolysis or Gluconeogenesis	31	3	0,79	0,04



Şekil 4.62 Kültür medyumuna KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar

Aminoacyl-tRNA biosynthesis **Alanine, aspartate and glutamate metabolism** **Valine, leucine and isoleucine biosynthesis** **Arginine and proline metabolism** **Glycine, serine and threonine metabolism**

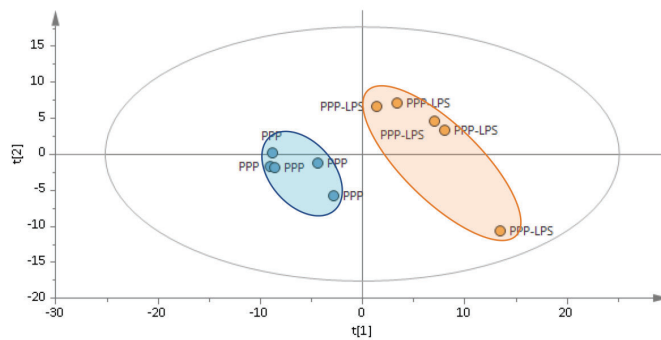


Şekil 4.63 Besiyerine KIP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar

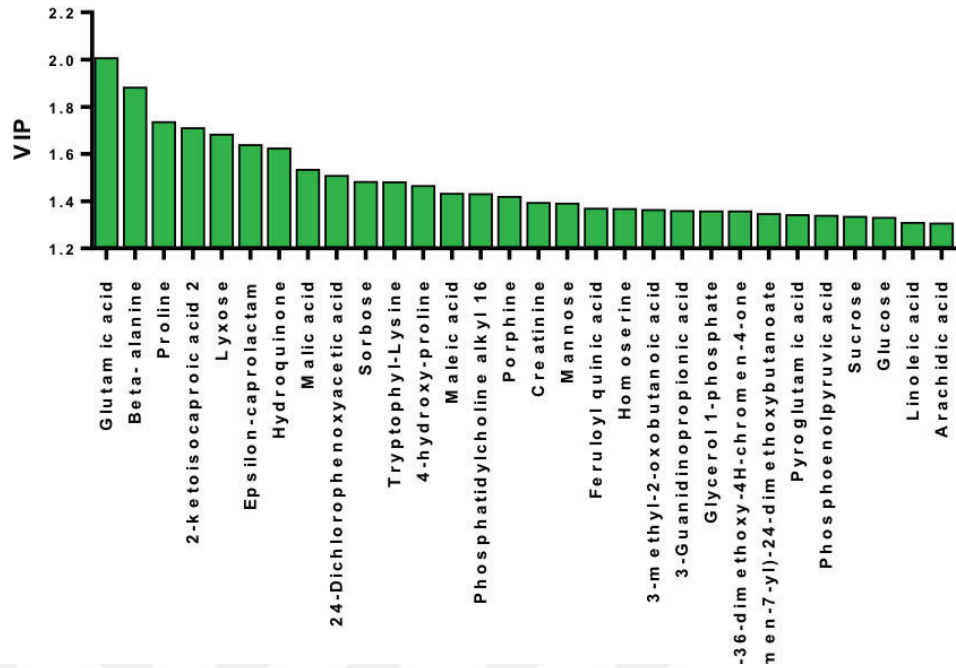
İnflamatuvar uyarım varlığında, KİP ile çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollardan aminoasit tRNA biyosentezi, alanin, aspartat glutamat metabolizması, valine, lösin ve izolösin biyosentezi, glisin, serin, treonin metabolizması, sitrat (TCA) döngüsü, pantotenat ve CoA metabolizması, fruktoz, mannoz metabolizması, syanoaminoasid metabolizması, sistein ve metionin metabolizması, glutatyon, nitrojen, butanoat, galaktoz metabolizmaları, nikotinad ve nikotinamid metabolizması, D-glutamin ve D-glutomat metabolizması, beta-alanin metabolizması, gliksilat ve dikarboksilat metabolizması, glikoliz ve glikoneogenezis anlamlı değişmiştir (Tablo 4.19, Şekil 4.62, 63).

4.9.7. İnflamasyon varlığında PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolomik karakterizasyonu:

MKH kültüründe insan kaynaklı PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır. (Şekil 4.64 ve 4.65). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir

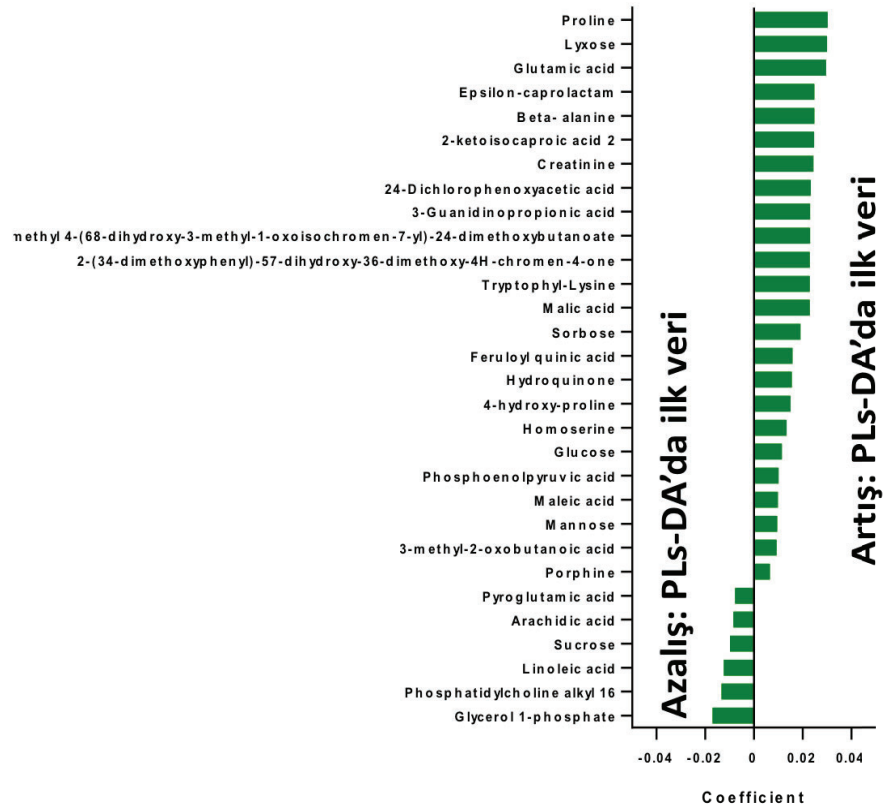


Şekil 4.64 İnflamatuvar uyarım varlığında PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0,627 ve Q^2 :0,920). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.65 İnflamatuvar uyarım varlığında PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu PPP ile çoğaltılan MKH'lerde inflamatuvar uyarım varlığında Proline, Lyxose, Glutamic acid, Epsilon-caprolactam, Beta-alanine, 2-ketoisocaproic acid 2, Creatinine, 24-Dichlorophenoxyacetic acid, 3-Guanidinopropionic acid, Dimethoxybutanoate, Tryptophyl-Lysine, Malic acid, Sorbose, Feruloil quinic acid, Hydroquinone, 4-hydroxy-proline, Homoserine, Glucose, Phosphoenolpyruvic acid, Maleic acid, Mannose, 2-methyl-2-oxobutanoic acid, Porphine artarken, Pyroglutamic acid, Arachidic acid, Sucrose, Linoleic acid, Phosphatidylcholine alkyl 16, Glycerol 1-phosphate azalan metabolitlerdir (Şekil 4.66).

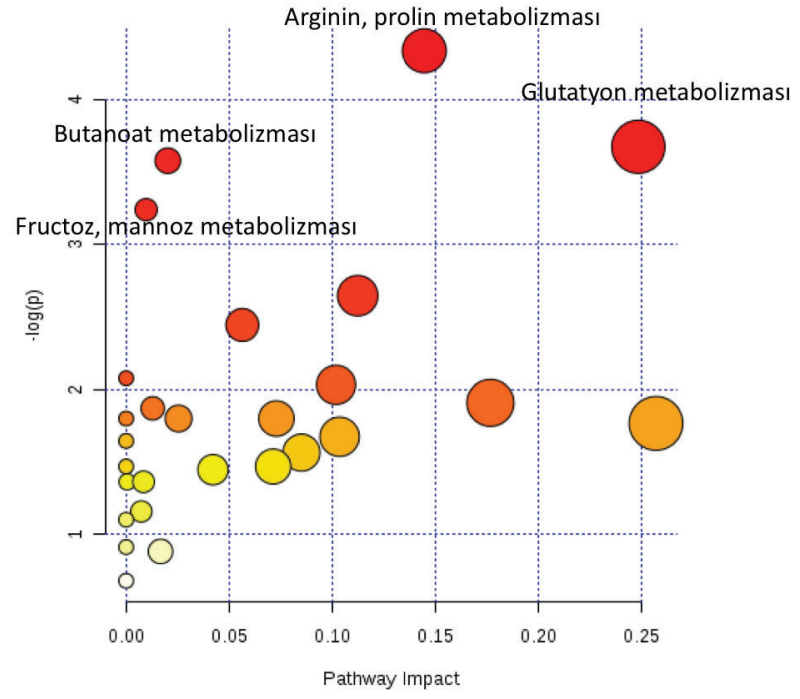


Şekil 4.66 İnflamatuvar uyarım varlığında PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi

PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.20, Şekil 4.67 ve Şekil 4.68'de sunulmuştur.

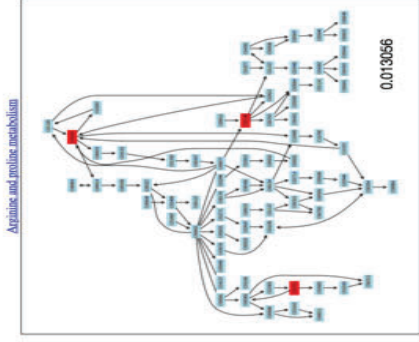
Tablo 4.20 Kültür medyumuna PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar

	Toplam metabolit sayısı	Anlamli bulan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Arginine and proline metabolism	77	3	0,51	0,01
Glutathione metabolism	38	2	0,25	0,03
Butanoate metabolism	40	2	0,27	0,03
Fructose and mannose metabolism	48	2	0,32	0,04

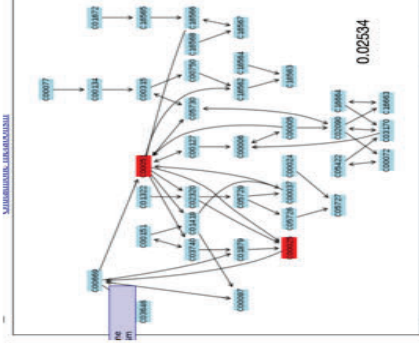


Şekil 4.67 PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar

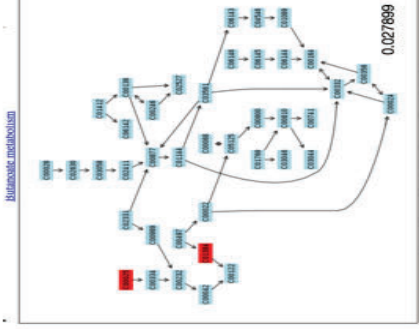
Arginine and proline metabolism



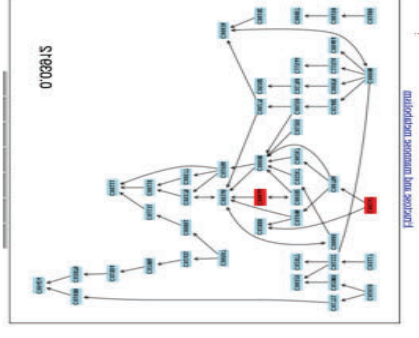
Glutathione metabolism



Butanoate metabolism



Fructose and mannose metabolism



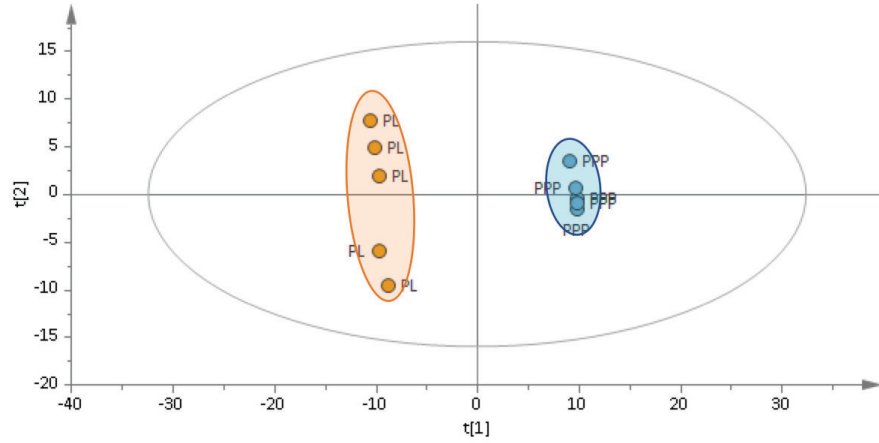
Şekil 4.68 PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin inflamasyon varlığında değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar

İnflamatuar uyarım varlığı, PPP ile çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollardan arginin ve prolin metabolizması, glutatyon metabolizması, butanoat metabolizması, früktoz ve mannoz metabolizmasını anlamlı değiştirmiştir (Tablo 4.20, Şekil 4.67, 68).

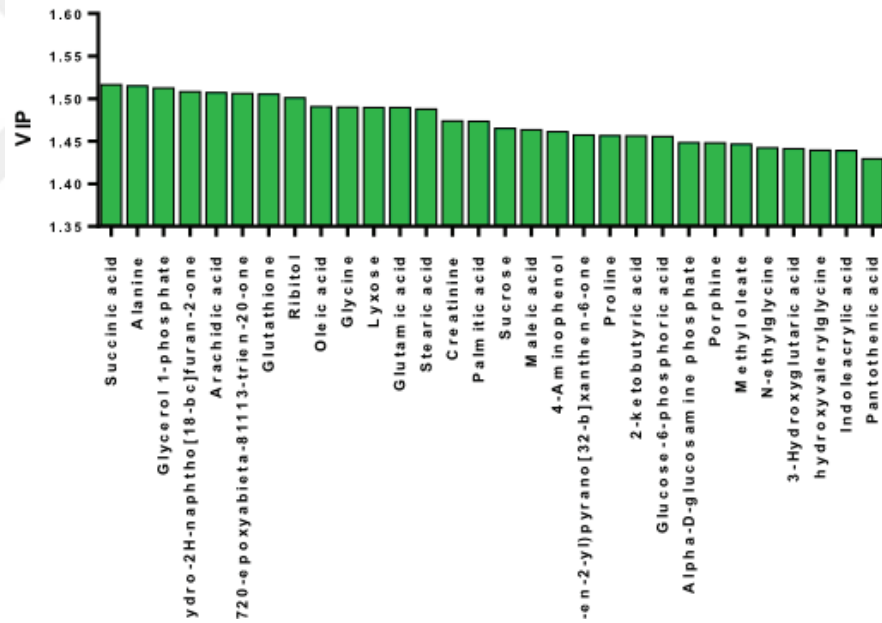
İnflamatuar uyarım varlığında glutatyon ve butanoat metabolizması dört grupta da değişirken, arginin, prolin metabolizması ve fruktoz, mannoz metabolizması KİP ve PPP grubunda benzer olarak değişmiştir. Alanin, aspartat, glutomat metabolizması ise PPP hariç diğer üç grupta değişmiş olarak bulunmuştur.

4.9.8. PL ve PPP eklentisinin MKH'lerin metabolik özelliklerine etkilerinin karşılaştırılması:

Çalışmamızda kullandığımız PL'in PPP'dan en belirgin farkı, hazırlık aşamasında santrifügasyonla ayrıştırılan platelet içeriğidir. Öte yandan PPP'nın hızla (1 saat içinde) dondurulmasıyla labil koagülasyon faktörlerinin korunması da belirgin fark oluşturmaktadır. Bu iki eklentinin MKH kültüründe değişen intrasellüler metabolitlerinin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır. (Şekil 4.69 ve 4.70). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R²) ve tahmin edebilme (Q²) değerleri ile gösterilmiştir.

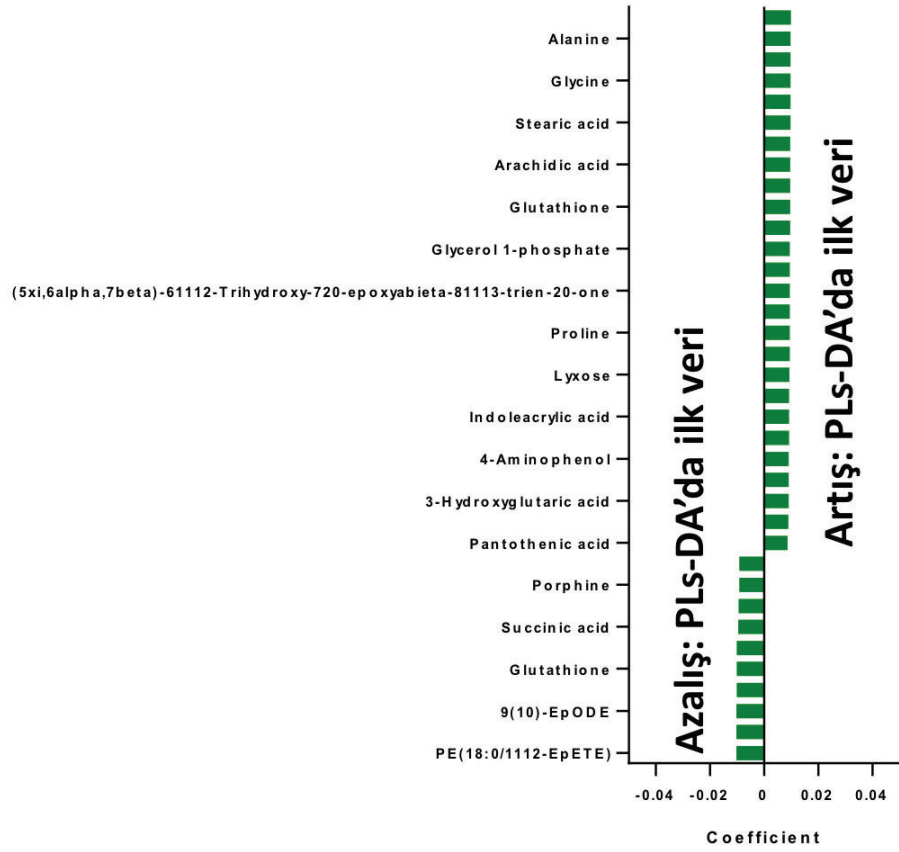


Şekil 4.69 PL - PPP varlığında çoğaltılan MKH'lerin metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R²: 0,635 ve Q²:0,987). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.70 PL-PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu PL ile çoğaltılan MKH'lerde PPP ile çoğaltılan MKH'lere göre Alanine, Glycine, Stearic acid, Arachidic acid, Glutathione, Glycerol 1-phosphate, Proline, Lyxose, Indoleacrylic acid, 4-Aminophenol, 2-Hydroxyglutaric acid, Pantothenic acid artmış, Porphine, Succinic acid, Glutathione ise azalmış olarak bulunmuştur (Şekil 4.71).

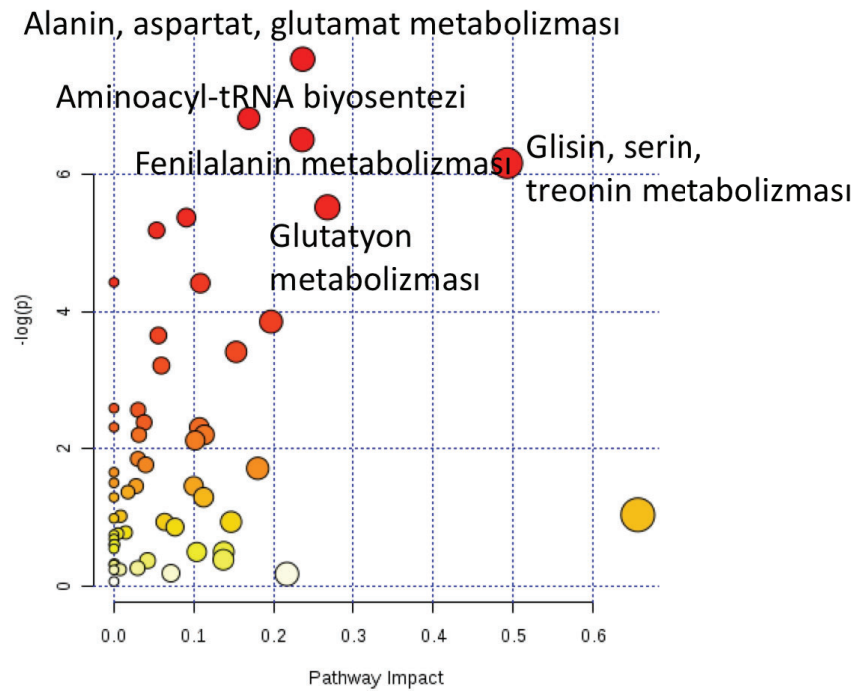


Şekil 4.71 PL-PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi

PL veya PPP eklentisi ile çoğaltılan değişen intrasellüler metabolitlerinin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.21, Şekil 4.72 ve Şekil 4.73'de sunulmuştur.

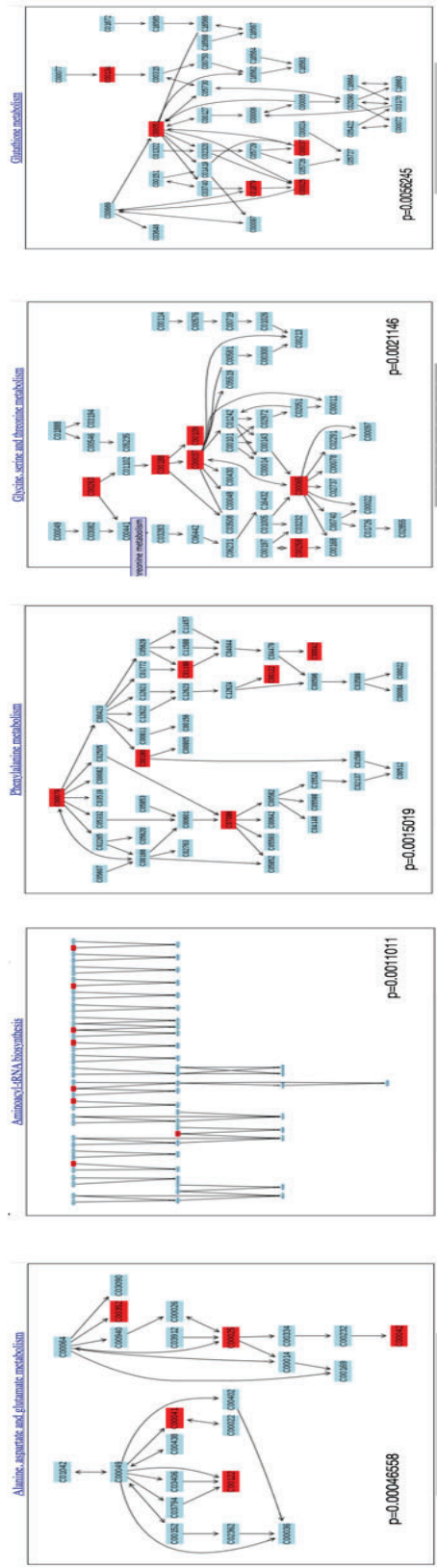
Tablo 4.21 Besiyerine PL ve PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar

	Toplam metabolit sayısı	Anlamli bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	5	0,69	0,00
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	75	8	2,15	0,00
Phenylalanine metabolism	45	6	1,29	0,00
Glycine, serine and threonine metabolism	48	6	1,38	0,00
Glutathione metabolism	38	5	1,09	0,00
Cysteine and methionine metabolism	56	6	1,61	0,00
Galactose metabolism	41	5	1,18	0,01
Fatty acid biosynthesis	49	5	1,40	0,01
Pentose phosphate pathway	32	4	0,92	0,01
Arginine and proline metabolism	77	6	2,21	0,02
Butanoate metabolism	40	4	1,15	0,03
Sphingolipid metabolism	25	3	0,72	0,03
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	27	3	0,77	0,04



Şekil 4.72 Besiyerine PL veya PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar

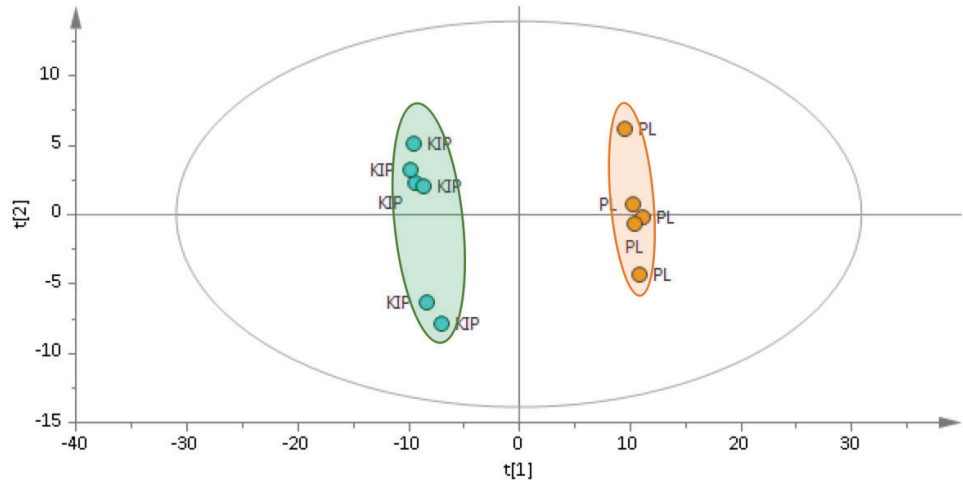
Alanine, aspartate and glutamate metabolism **Aminoacyl-tRNA biosynthesis** **Phenylalanine metabolism** **Glycine, serine and threonine metabolism** **Glutathione metabolism**



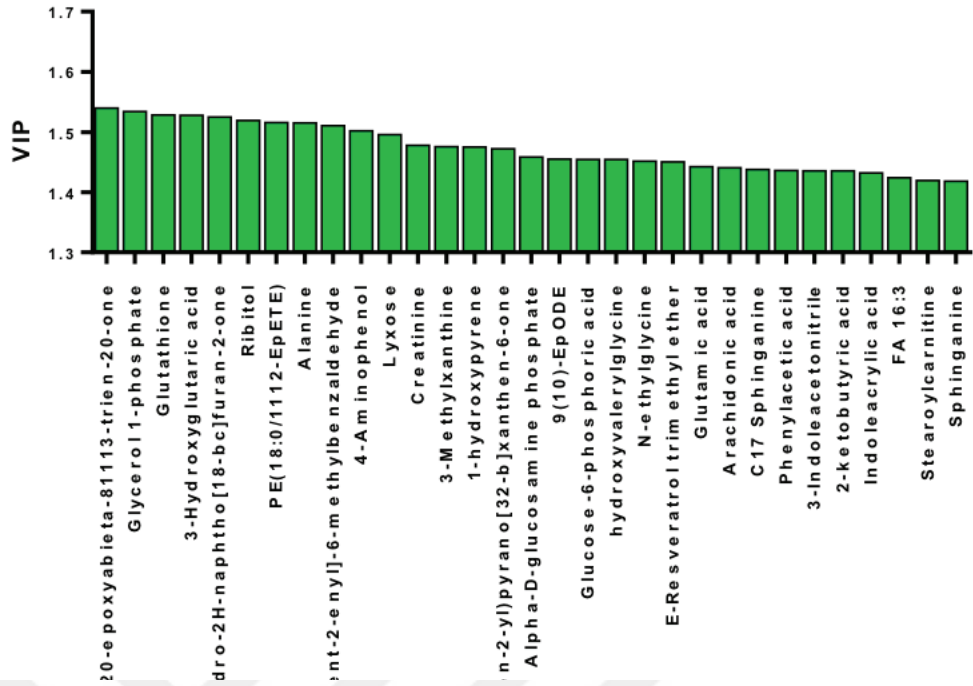
Şekil 4.73 Besiyerine PL ve PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar

4.9.9. PL ve KİP eklentisinin MKH'lerin metabolik karakterizasyonuna etkilerinin karşılaştırılması:

Çalışmamızda kullandığımız KİP'lar sağlıklı donörlerin kemik iliklerinin hastaya kullanılmayacak olan kısımlarından elde edilmiştir. Kullandığımız KİP'ların PL'lardan en temel farkı PL'ların zengin platelet içeriği, PPP'lardan farkı ise, dondurulma zamanlarının PPP gibi standart olmamasıdır. PL ve KİP eklentilerinin MKH kültürüne etkileri değişen intrasellüler metabolitlerinin metabolomiks verileri karşılaştırmalı analizi ile incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.74 ve 4.75). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir

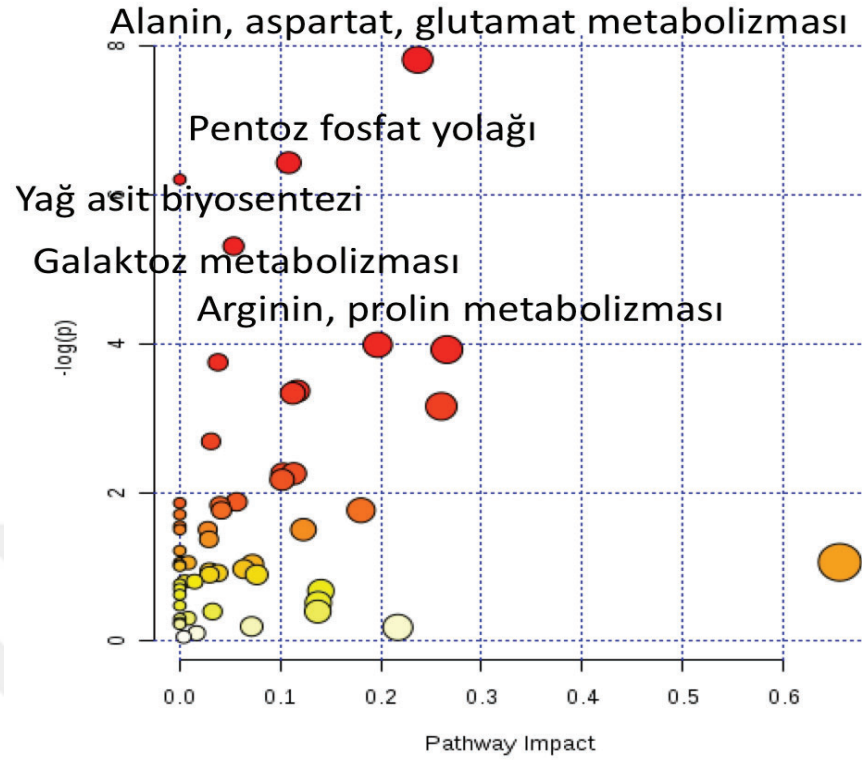


Şekil 4.74 PL ve KİP varlığında çoğaltılan MKH'lerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0,648 ve Q^2 :0,99). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.

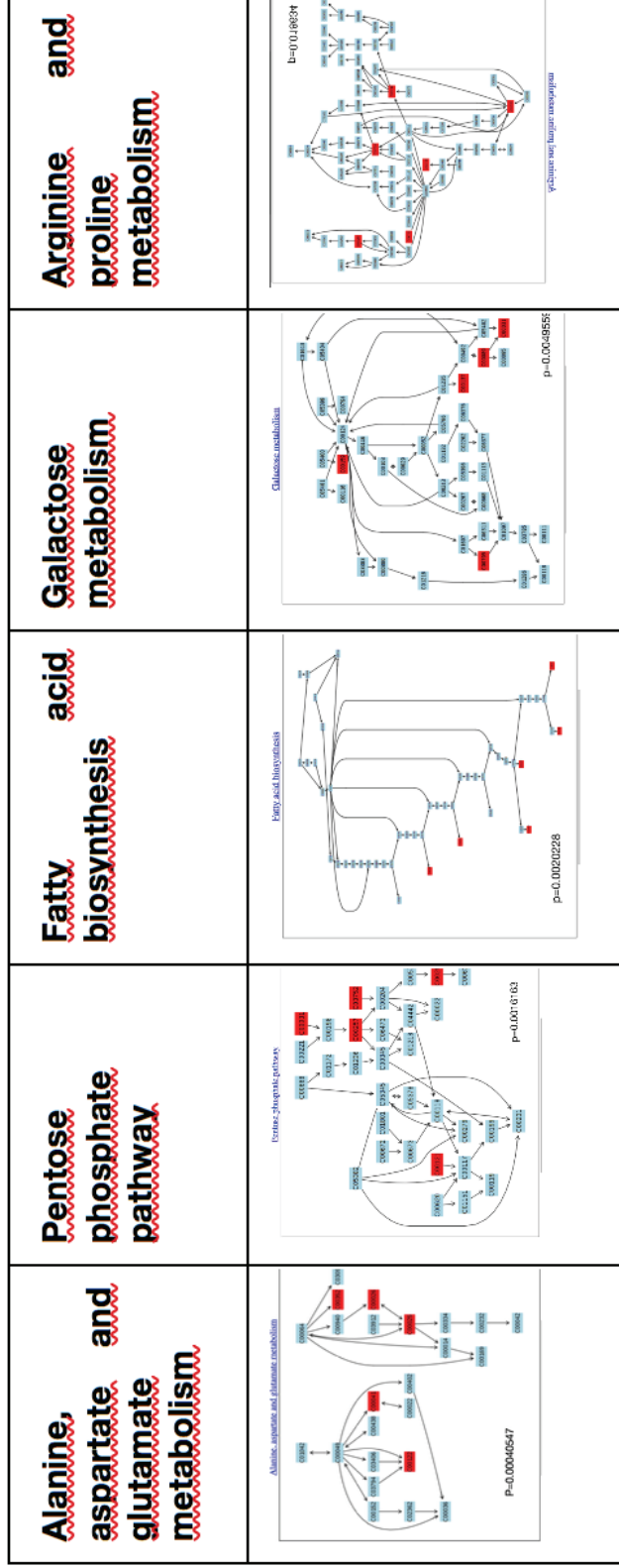


Şekil 4.75 PL ve KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu KİP ile çoğaltılan MKH'lerde PL ile çoğaltılan MKH'lere göre 1-hydroxypyrene, 6-methylbenzaldehyde, FA16:3, Stearoylcarnitine, N-ethylglycine, Sphinganine, E-Resveratrol trimethyl ether, 3-Indoleacetonitrile, C17 Sphinganine artmışken, Indoleacrylic acid, Hydroxyvalerylglycine, 2-ketobutyric acid, 3-Methylxanthine, Alpha-D-glucosamineLyxose, phosphate, Glutamic acid, 4-Aminophenol, Glucose-6-phosphoric acid, Phenylacetic acid, Lyxose, Creatinine, Arachidonic acid, Alanine, Ribitol, Glycerol 1-phosphate, Glutathione, 3-Hydroxyglutaric acid azalmış olarak bulunmuştur (Şekil 4.76).



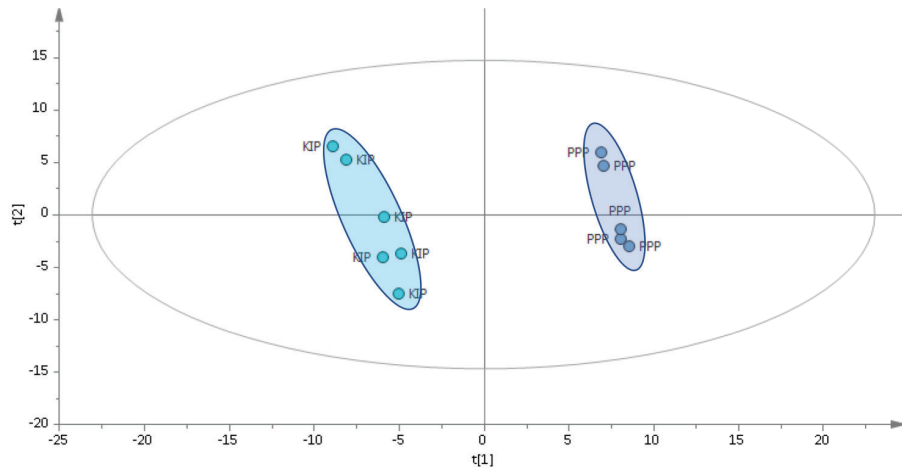
Şekil 4.77 Besiyerine PL ve KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar



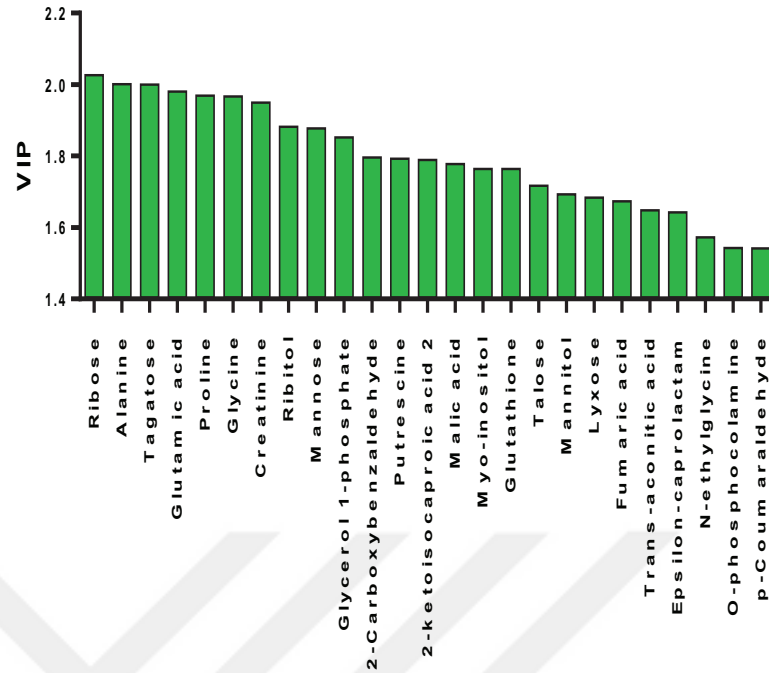
Şekil 4.78 Besiyerine PL ve KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar

4.9.10. KİP ve PPP eklentisinin MKH'lerin metabolik karakterizasyonuna etkilerinin karşılaştırılması:

Çalışmamızda kullandığımız KİP'lar sağlıklı donörlerin kemik iliklerinin hastaya kullanılmayacak olan kısımlarından elde edilmiştir. Kullandığımız KİP'ların PPP'lardan farkı, dondurulma zamanlarının PPP gibi standart olmamasıdır. KİP ve PPP eklentilerinin MKH kültürüne etkileri değişen intrasellüler metabolitlerinin metabolomiks verileri karşılaştırmalı analizi ile incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.79 ve 4.80). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir

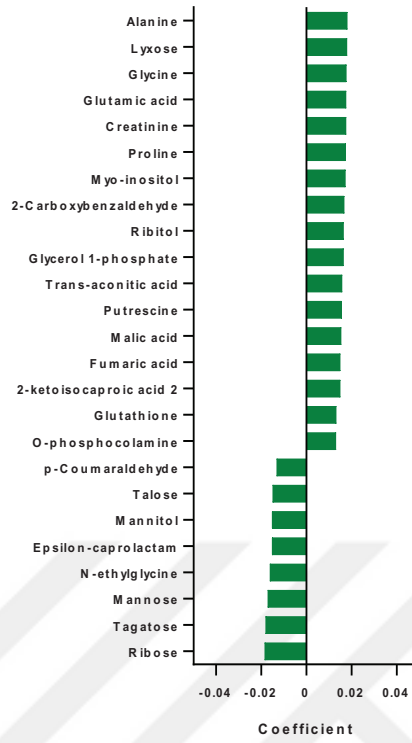


Şekil 4.79 KİP ve PPP varlığında çoğaltılan MKH'lerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 :0.996 ve Q^2 :0.818). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.80 KİP ve PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu KİP ile çoğaltılan MKH'lerde PPP ile çoğaltılan MKH'lere göre Alanine, Lysoze, Glisine, Glutamic acid, Proline, Myoinositol, 2-karboksibenzaldehyde, ribitol, Gliserol 1-phosphate, transaconitik acid, Putrescine, Malik acid, Fumarik acid, 2-ketoisokaproik acid 2, Glutathione, O-phosphocolamine artmış, p-Coumaraldehyde, Talose, Mannitol, Epsilon-caprolactam, N-ethylglycine, Mannose, Tagatose, Ribose azalmış olarak bulunmuştur (Şekil 4.81).

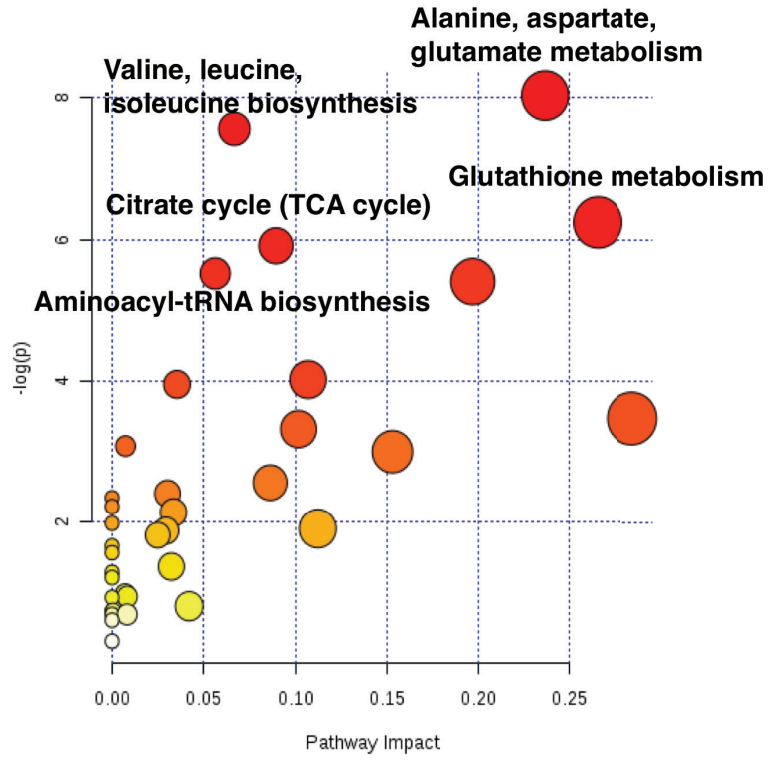


Şekil 4.81 KİP ve PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lere ait VIP grafiği, regresyon analizi.

Besiyerine KİP veya PPP eklentisi ile çoğaltılan değişen intrasellüler metabolitlerinin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.23, Şekil 4.82 ve Şekil 4.83'te sunulmuştur.

Tablo 4.23 Besiyerine KİP ve PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar

	Toplam metabolit sayısı	Anlamli bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	4	0,35	0,00
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	27	4	0,39	0,00
Glutathione metabolism	38	4	0,55	0,00
Citrate cycle (TCA cycle)	20	3	0,29	0,00
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	75	5	1,09	0,00
Arginine and proline metabolism	77	5	1,12	0,00
Glycerophospholipid metabolism	39	3	0,57	0,02
Butanoate metabolism	40	3	0,58	0,02
Glycine, serine and threonine metabolism	48	3	0,70	0,03
Riboflavin metabolism	21	2	0,31	0,04



Şekil 4.82 Besiyerine KİP ve PPP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerin değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar

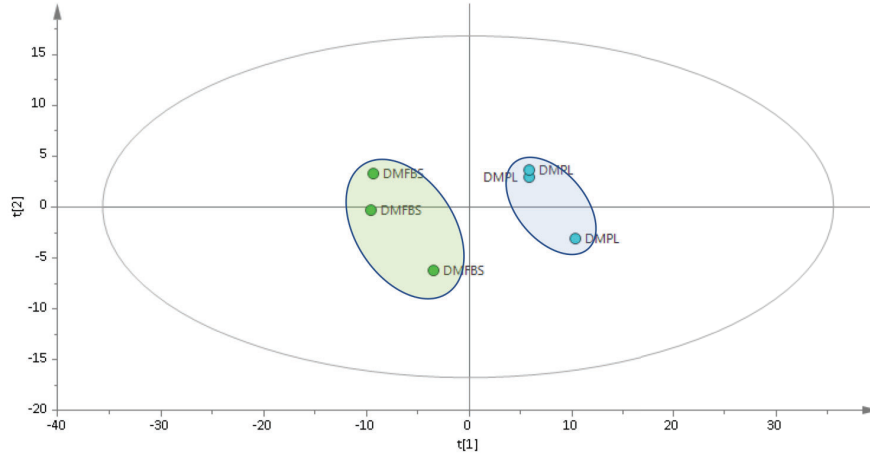
KİP ve PPP varlığında çoğaltılan MKH'lerin, PL ile çoğaltılan MKH'lere göre anlamlı düzeyde farklılık ($p<0.05$) gösterdiği saptanan intrasellüler metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda her iki grupta da anlamlı değişen yollar alanin, aspartat glutamat metabolizması, yağ asit biyosentezi, arginin ve prolin metabolizması, glutatyon metabolizması, butanoat metabolizması, fenilalanin metabolizması, glisin, serin, treonin metabolizması olmuştur (Tablo 4.21, 22, Şekil 4.72, 73, 77, 78). KİP ile çoğaltılan MKH'lerde pentoz fosfat yolağı, galaktoz metabolizması, D-glutamin ve D-glutamat metabolizması farklı bulunurken (Tablo 4.22, Şekil 4.77, 78), PPP ile çoğaltılan MKH'lerde aminoasit tRNA biyosentezi, sistein ve metyonin metabolizması, galaktoz metabolizması, pentoz fosfat yolağı, sfingolipid metabolizması, valin, lösin, izolösin biyosentezi PL ile çoğaltılan MKH'lerden farklı bulunmuştur (Tablo 4.21, Şekil 4.72, 73).

KİP ve PPP varlığında çoğaltılan MKH'lerin anlamlı düzeyde farklılık ($p<0.05$) gösterdiği saptanan intrasellüler metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda ise alanin, aspartat glutamat metabolizması, valin, lösin ve izolösin biyosentezi, glutatyon metabolizması, sitrat (TCA) döngüsü, aminoasit tRNA biyosentezi, arginin ve prolin metabolizması, gliserofosfolipid metabolizması, butanoat metabolizması, glisin, serin, treonin metabolizması, riboflavin metabolizması anlamlı değişiklik gösteren yollar olarak bulunmuştur (Tablo 4.23, Şekil 4.82, 83).

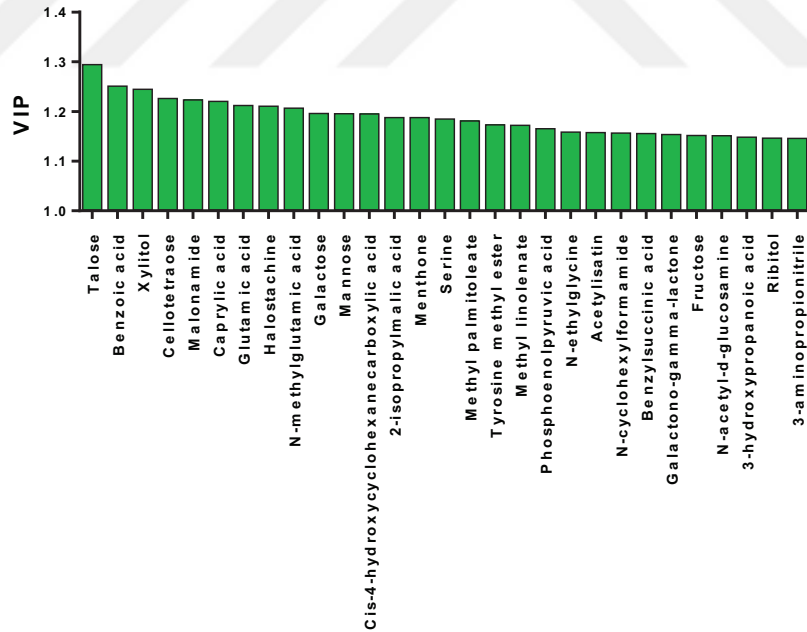
4.9.11. DMFBS ve DMPL besiyerlerinin istatistiksel anlamlı etkilediği metabolik yollar: (DMFBS-DMPL)

Çalışmamızın bu aşamasında besiyerlerinin içerdiği metabolitlerin karşılaştırılması yapılmıştır. MKH kültüründe kullanılan temel besi yeri DMFBS ile DMPL'in içerdikleri metabolitlerinin metabolomik verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.84 ve 4.85).

Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.



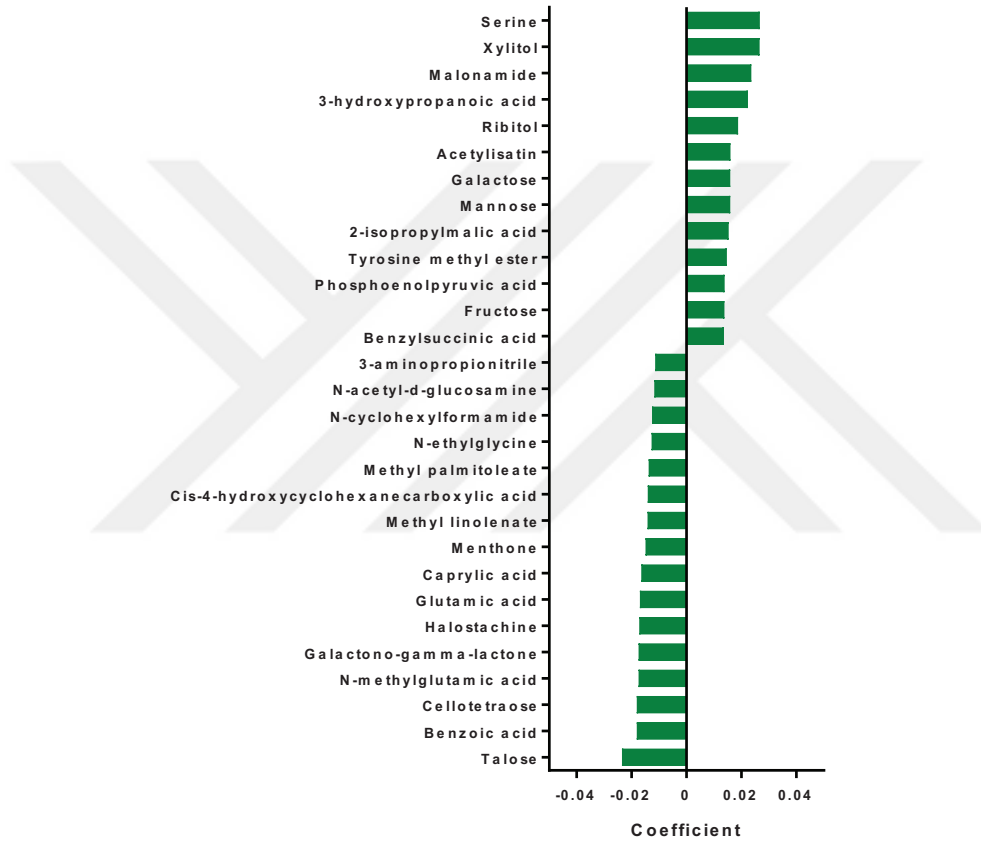
Şekil 4.84 DMFBS ve DMPL'in içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0,795 ve Q^2 :0,943). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.85 DMFBS ve DMPL'in veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu DMFBS'de daha fazla bulunan metabolitler Serine, Xylitol, Malonamide, 2-hydroxy propanoic acid, Ribitol,

Acetylisatin, Galactose, Mannose, 2-isopropilmalic acid, Tyrosin methyl ester, Phophoenolepyruvic acid, Fructose, Benzyl succinic acid'tir. DMPL'ta ise 3-aminopropionitril, N-acetyl-d-glucosamine, N-cyclohexylformamide, N-ethylglycine, Methyl palmitoleate, Carboxylic acid, Methyl linolenate, Menthone, Caprylic acid, Glutamic acid, Halostachine, Galactono gamma lactone, N-methylglutamic acid, Cellotetraose, Benzoic acid, Talose'dur (Şekil 4.86).

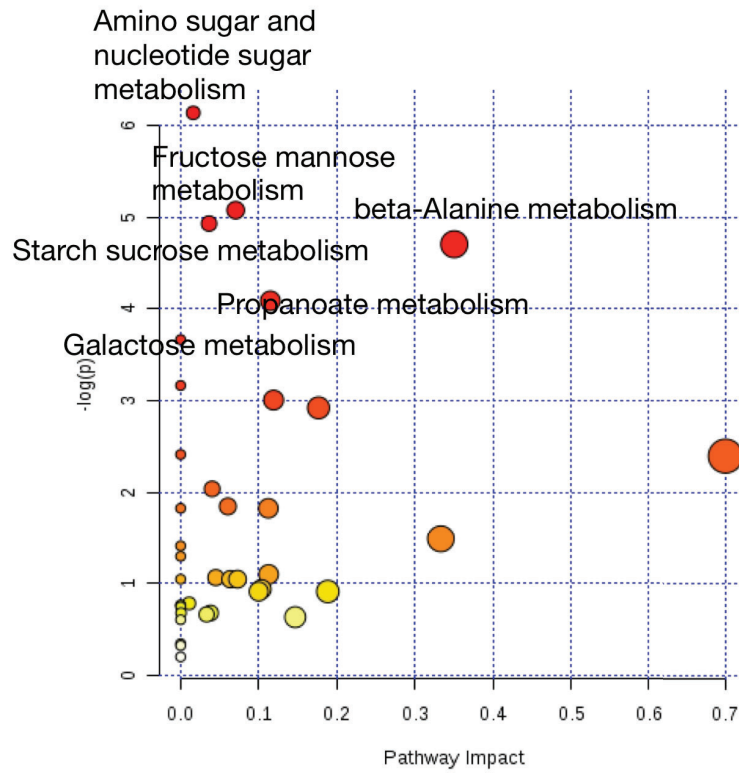


Şekil 4.86 DMFBS ve DMPL ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.

DMFBS ve DMPL besiyerlerinin içerdikleri metabolitlerinin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.24 ve Şekil 4.87'de sunulmuştur.

Tablo 4.24 DMFBS ve DMPL besiyerlerinin istatistiksel olarak anlamlı değişen metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar

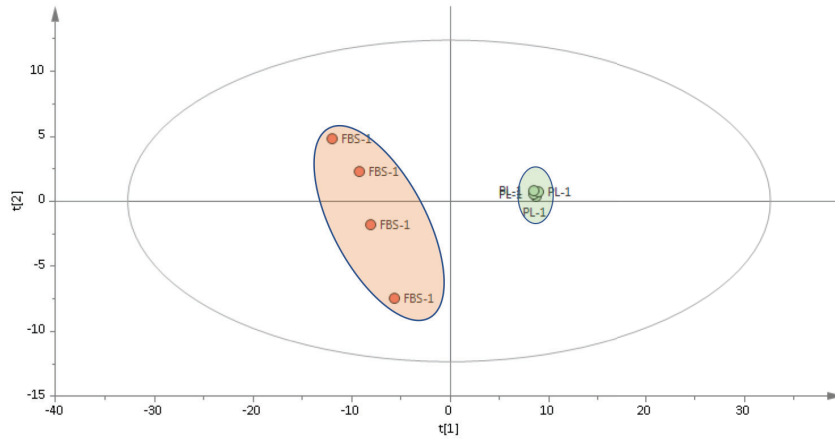
	Toplam metabolit sayısı	Anlamlı bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	88	6	1,39	0,00
Fructose and mannose metabolism	48	4	0,76	0,01
Starch and sucrose metabolism	50	4	0,79	0,01
beta-Alanine metabolism	28	3	0,44	0,01
Propanoate metabolism	35	3	0,55	0,02
Galactose metabolism	41	3	0,65	0,03
Riboflavin metabolism	21	2	0,33	0,04



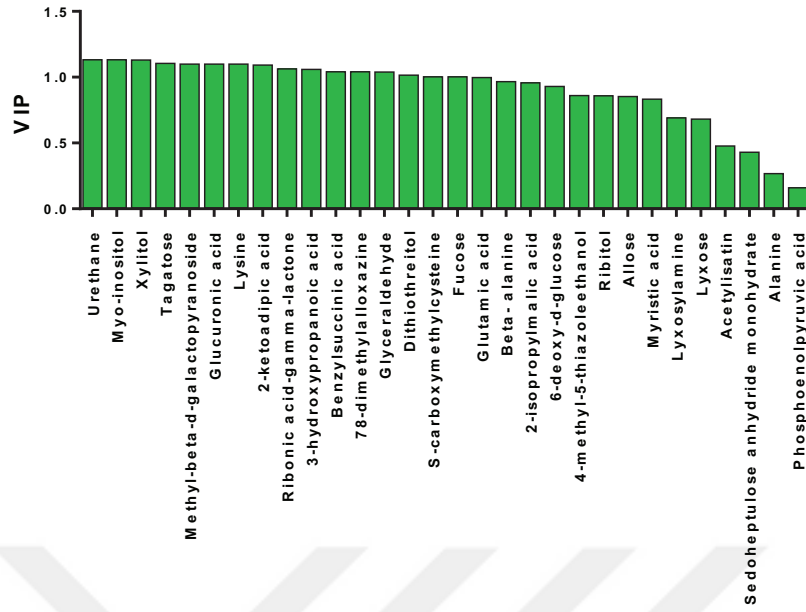
Şekil 4.87 DMFBS ve DMPL besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yolaklar

4.9.12. DMFBS ve DMPL besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılan metabolitler; kültür süpernatantları: (FBS1-PL1)

DMFBS ve DMPL besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitlerin metabolomik verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.88 ve 4.89). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.

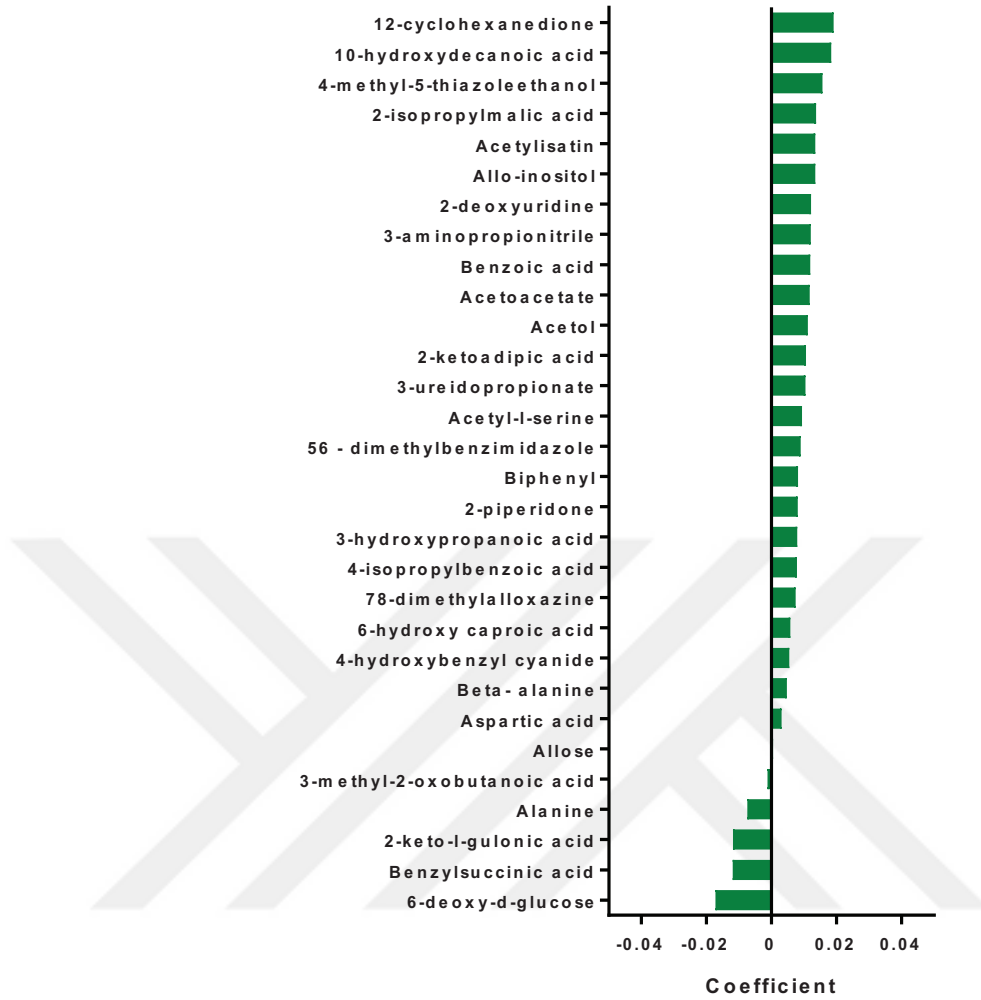


Şekil 4.88 DMFBS ve DMPL besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitlerin metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0,883 ve Q^2 :0,985). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.89 DMFBS ve DMPL besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu DMFBS ile çoğaltılmış MKH'lerde daha fazla bulunan ekstrasellüler metabolitleri 12-cyclohexanedione, 10-hydroxydecanoic acid, Thiazoleethanol, Malic acid, Acetylisatin, Allo-inosiyol, 2-deoxyuridine, 3-amino propionitrile, Benzoic acid, Acetoasetat, Acetol, 2-ketoadipic acid, 3-ureido propionate, Acetyl-l-serine, Benzimidazole, Biphenile, 2-piperidone, 3-hidroksiopropanoik acid, 4-isopropil benzoic acid, Allozazine, 6-hydroxy caproic acid, 4-hydroxybenzyl cyanide, Beta-alanine, Aspartic acid, Allose'dur. DMPL ile çoğaltılmış MKH'lerde ise Butanoic acid, Alanine, 2-keto-l-gulonic acid, Benzyl succinic acid, 6-deoxy-d-glucose fazla bulunmuştur (Şekil 4.90).

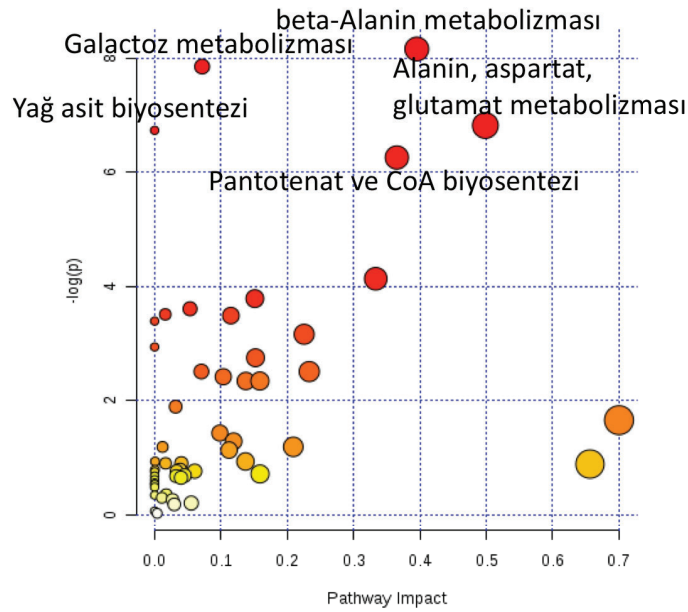


Şekil 4.90 DMFBS ve DMPL besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatanlarının içerdiği ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.

DMFBS ve DMPL besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatanlarının içerdiği metabolitlerin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.25 ve Şekil 4.91'de sunulmuştur.

Tablo 4.25 DMFBS ve DMPL besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan akstrasellüler metabolitlere bağlı değişen yollar

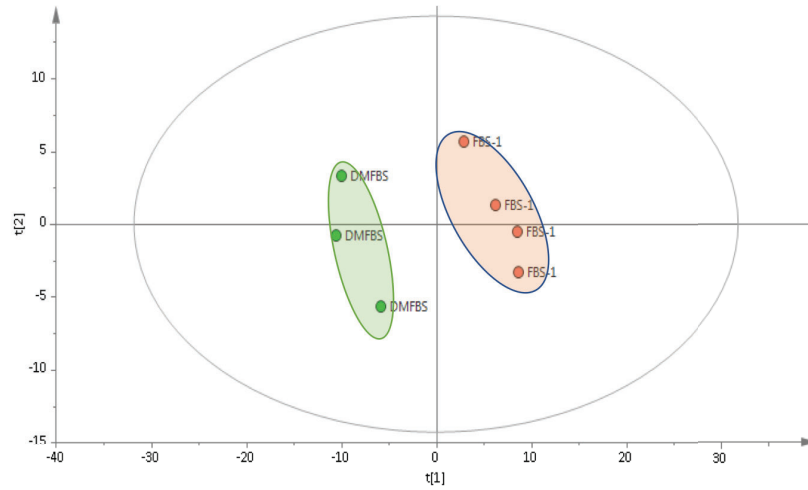
	Toplam metabolit sayısı	Anlamli bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
beta-Alanine metabolism	28	6	0,97	0,00
Galactose metabolism	41	7	1,41	0,00
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	5	0,83	0,00
Fatty acid biosynthesis	49	7	1,69	0,00
Pantothenate and CoA biosynthesis	27	5	0,93	0,00
Cyanoamino acid metabolism	16	3	0,55	0,02
Pentose phosphate pathway	32	4	1,10	0,02
Starch and sucrose metabolism	50	5	1,72	0,03
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	88	7	3,03	0,03
Propanoate metabolism	35	4	1,21	0,03
Riboflavin metabolism	21	3	0,72	0,03
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	75	6	2,59	0,04



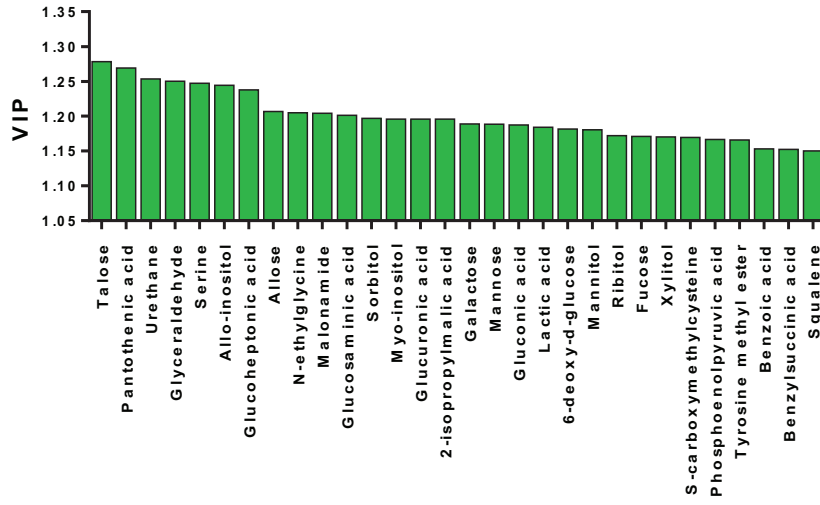
Şekil 4.91 DMFBS ve DMPL besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitlere bağlı değişen yollar

4.9.13. DMFBS besiyeleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları metabolitlerin; DMFBS ile karşılaştırması: (DMFBS-FBS1)

DMFBS besiyeri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitler ve DMFBS'un içerdiği metabolitlerin metabolomik verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.92 ve 4.93). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.

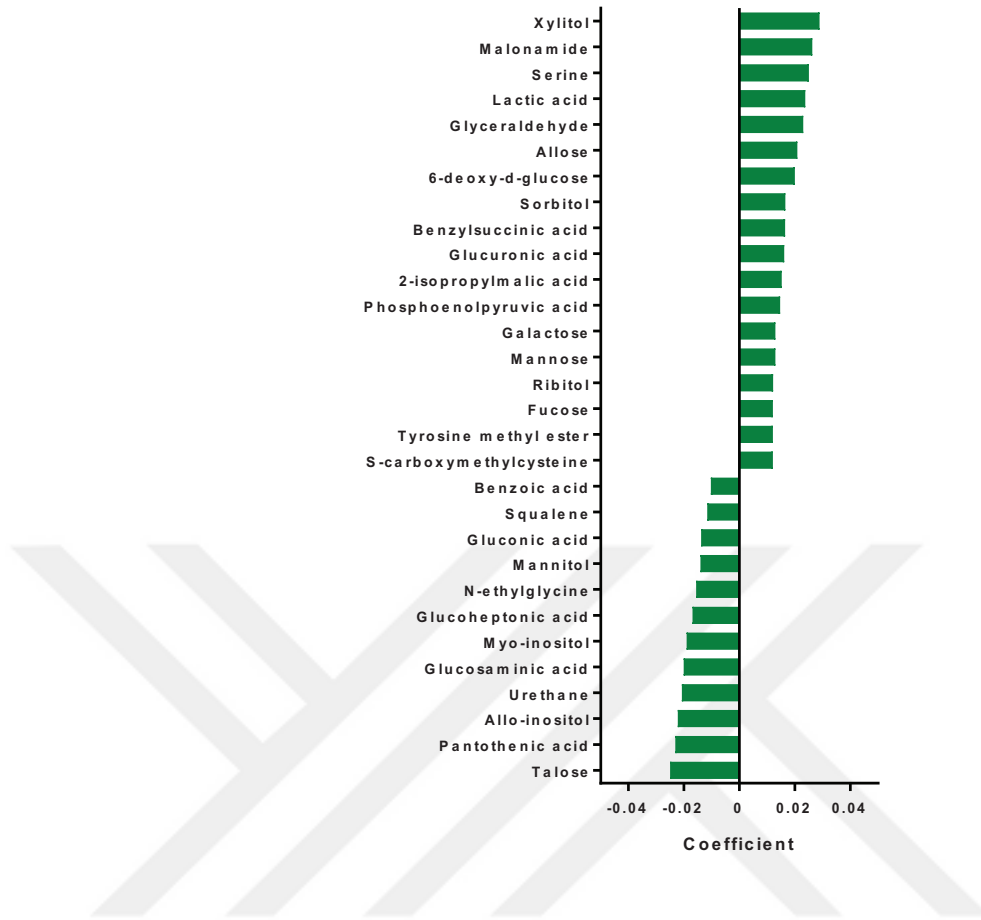


Şekil 4.92 DMFBS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlerin ve DMFBS'un içerdiği metabolitlerin metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0,854 ve Q^2 :0,974). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.93 DMFBS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMFBS'un içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu DMFBS ile çoğaltılmış MKH'lerde DMFBS'a göre daha fazla bulunan ekstrasellüler metabolitler Xylitole, Malonamide, Serine, Lactic acid, Glyceraldehyde, Allose, 6-deoxy-d-glucose, Sorbitol, Benzyl succinic acid, Glucuronic acid, 2-isopropil malic acid, Phosphoenolpyruvic acid, Galactose, Mannose, Ribitol, Fucose, Tyrosine methyl ester, S-carboxymethyl cysteine'dir. Benzoic acid, Squalene, Gluconic acid, Mannitol, N-ethylglycine, Glucoheptonic acid, Urethane, Allo-inositole, Panthothenic acid ve Talose ise daha az bulunmuştur (Şekil 4.94).

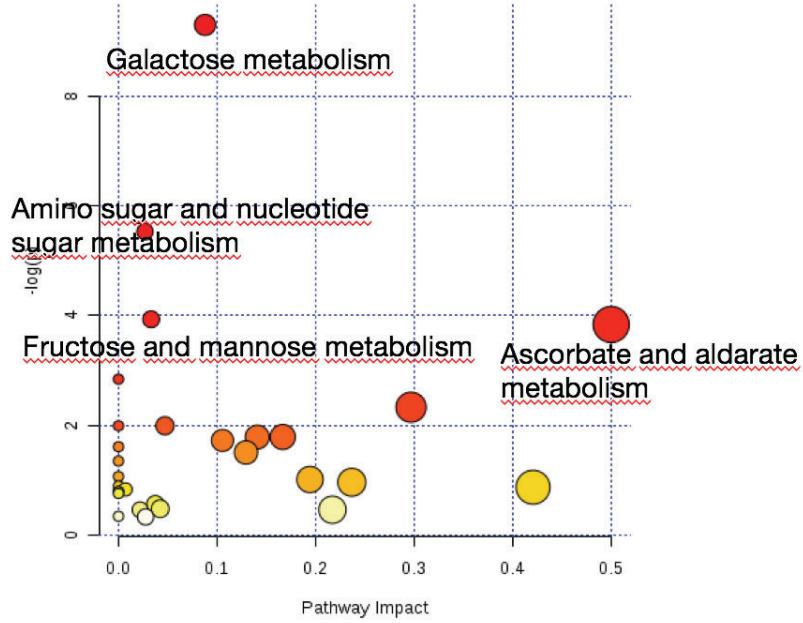


Şekil 4.94 DMFBS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMFBS'un içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği, regresyon analizi

DMFBS besiyeri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitler ve DMFBS'un içerdiği metabolitlerin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.26 ve Şekil 4.95'te sunulmuştur.

Tablo 4.26 DMFBS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMFBS'un içerdiği metabolitlere bağlı değişen yolaklar

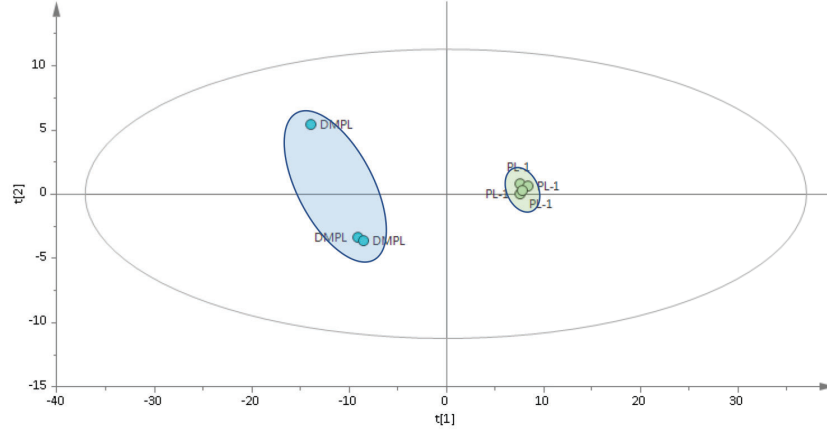
	Toplam metabolit sayısı	Anlamli bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Galactose metabolism	27	6	0.80	0.00
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	37	5	1.10	0.00
Fructose and mannose metabolism	20	3	0.59	0.02
Ascorbate and aldarate metabolism	8	2	0.24	0.02



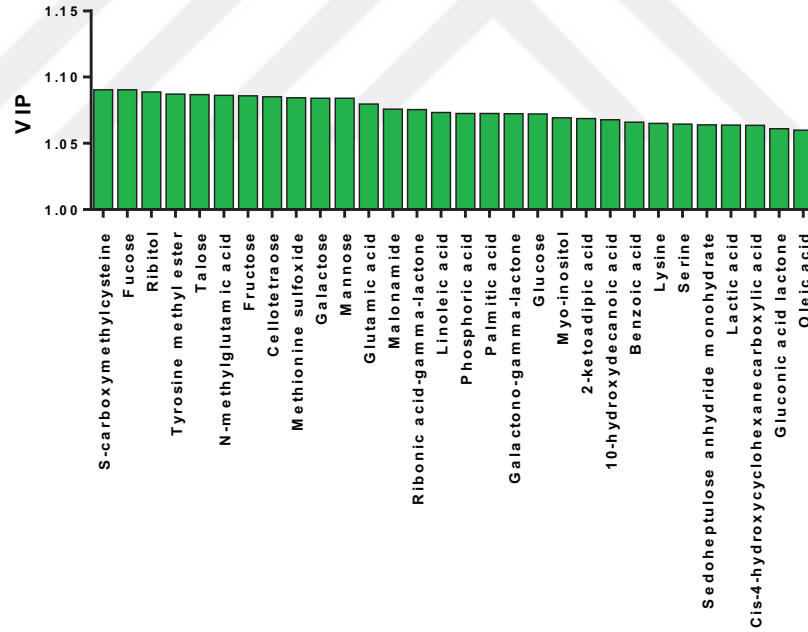
Şekil 4.95 DMFBS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMFBS'un içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar

4.9.14. DMPL besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları metabolitlerin; DMPL ile karşılaştırması: (DMPL-PL1)

DMPL besiyeri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitler ve DMPL'in içerdiği metabolitlerin metabolomik verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.95 ve 4.96). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.

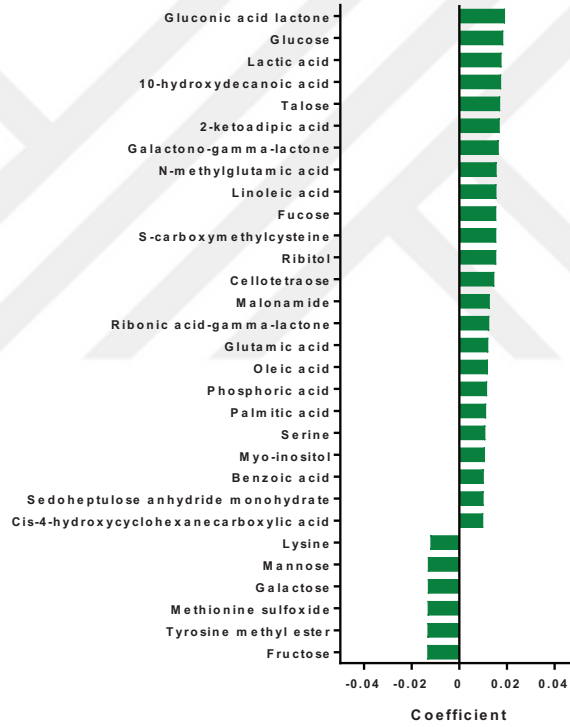


Şekil 4.96 DMPL besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlerin ve DMPL'in içerdiği metabolitlerin metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0,934 ve Q^2 :0,995). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir



Şekil 4.97 DMPL besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMPL'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu DMPL ile oğaltılmış MKH'lerde DMPL'a göre daha fazla bulunan ekstrasellüler metabolitler Glukonic acid lactone, Glucose, Lactic acid, 10- hydroxydecanoic acid, Talose, 2- ketoadipic acid, Galactone-gamma-lactone, N-methylglutamic acid, Linoleic acid, Fucose, S-carboxymethylcysteine, Ribitol, Cellotetraose, Malonamide, Ribonic acid-gamma-lactone, Glutamic acid, Oleic acid, Phosphoric acid, Palmitic acid, Serine, Myo-inositol, Benzoic acid, Sedoheptulose anhydride monohydrate, Cis-4-hydroxycyclohexanecarboxylic acid'dir. Lysine, Mannose, Galactose, Methionine sulfoxide, Tyrosine methyl ester, Fructose ise daha az bulunmuştur (şekil 4.98).

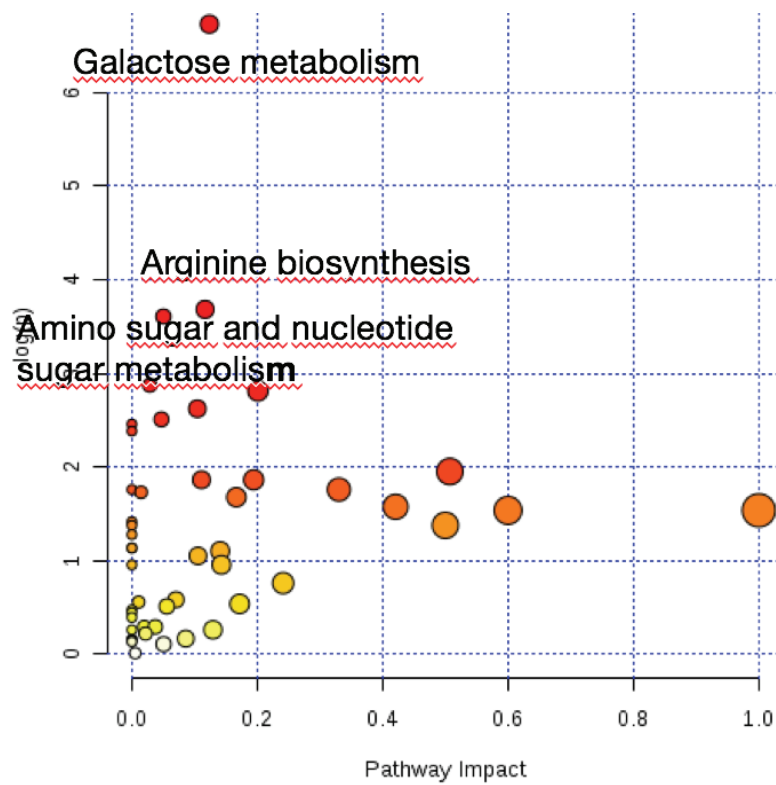


şekil 4.98 DMPL besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatanlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMPL'ın içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği, regresyon analizi.

DMPL besiyeri ile oğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatanlarının içerdiği metabolitler ve DMPL'ın içerdiği metabolitlerin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.27 ve şekil 4.99'da sunulmuştur.

Tablo 4.27 DMPL besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMPL'in içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar

	Toplam metabolit sayısı	Anlamli bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Galactose metabolism	27	6	1.27	0.00
Arginine biosynthesis	14	3	0.66	0.03
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	37	5	1.74	0.03



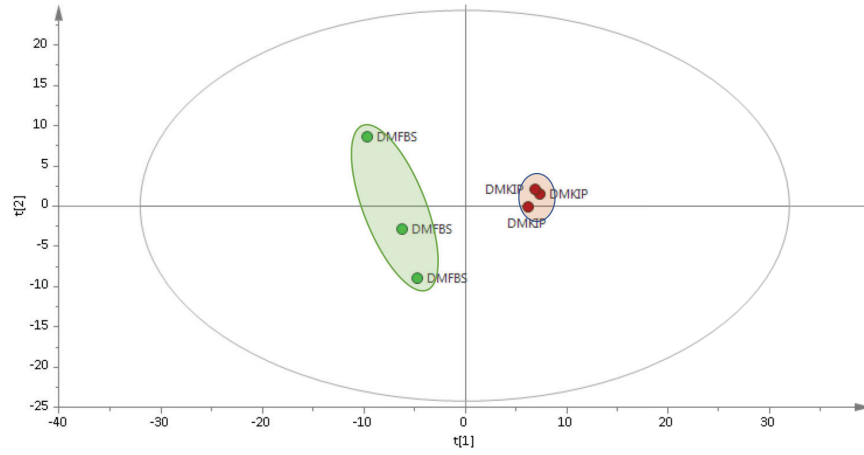
Şekil 4.99 DMPL besi yeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMPL'in içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar

MKH kültüründe kullandığımız besiyerlerinin ve kültür süpernatantlarının metabolik analizlerle saptanan ekstrasellüler metabolitlerinin karşılaştırılan gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptanan metabolitleri ile yolak analizleri belirlenmiştir. Öncelikle FBS ve PL eklenerek hazırlanan besiyerleri; DMFBS ve DMPL'in anlamlı düzeyde farklılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptanan ekstrasellüler metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda eklentiye bağlı değişen

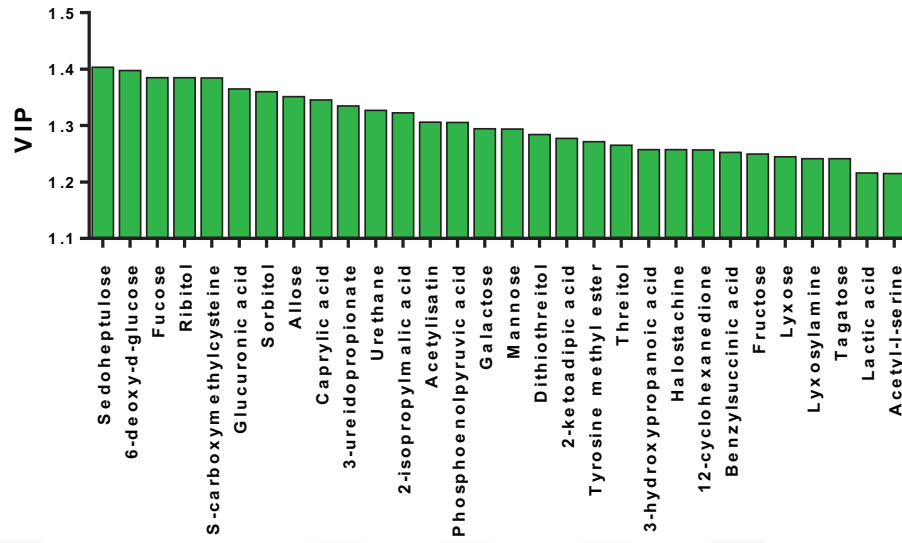
yolakları belirlenmiştir. İki besi yeri arasında anlamlı farklılık gösteren yolaklar; amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması, fruktoz ve mannoz metabolizması, nişasta ve sükroz metabolizması, beta-alanin, propanoat, galaktoz ve riboflavin metabolizmasıdır (Tablo 4.24, Şekil 4.87). DMFBS ve DMPL besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatanlarının içerdiği anlamlı düzeyde farklılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptanan ekstrasellüler metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizlerine göre de; beta-alanin metabolizması, galaktoz metabolizması, alanin, aspartat glutamat metabolizması, yağ asit biyosentezi, pantotenat ve CoA biyosentezi, siyanoaminoasit biyosentezi, pentoz fosfat yolağı, nişasta ve sükroz metabolizması, amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması, propanoat ve riboflavin metabolizması, aminoasit tRNA biyosentezidir (Tablo 4.25, Şekil 4.91). Ayrıca FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerin kültür süpernatanlarının DMFBS besiyerinin ekstrasellüler metabolitlerine göre değişen yolakları; galaktoz metabolizması, amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması, fruktoz ve mannoz metabolizması, askorbat ve aldatat metabolizması olarak bulunmuştur. PL varlığında çoğaltılan MKH'lerin kültür süpernatanlarının DMPL besiyerinin ekstrasellüler metabolitlerine göre değişen yolakları; galaktoz metabolizması, arginin metabolizması, amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması olarak bulunmuştur (Tablo 4.27, Şekil 4.99). Sonuçlardan görüldüğü gibi, DMFBS ve DMPL besiyeri içeriklerine göre genel olarak şeker metabolizması değişiyorken (amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması, nişasta ve sükroz metabolizması, beta-alanin, propanoat, galaktoz ve riboflavin metabolizması) bu besiyerleri ile çoğaltılan MKH'lerden salgılanan ekstrasellüler metabolitlerde ek olarak alanin, aspartat glutamat metabolizması, yağ asit biyosentezi, pantotenat ve CoA biyosentezi, siyanoaminoasit biyosentezi, pentoz fosfat yolağı ve aminoasit tRNA biyosentezi de anlamlı olarak değişmektedir.

4.9.15. DMFBS ve DMKİP besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yollar: (DMFBS-DMKİP)

MKH kültüründe kullandığımız DMFBS ile DMKİP'nin içerdikleri metabolitlerinin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.100 ve 4.101). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.

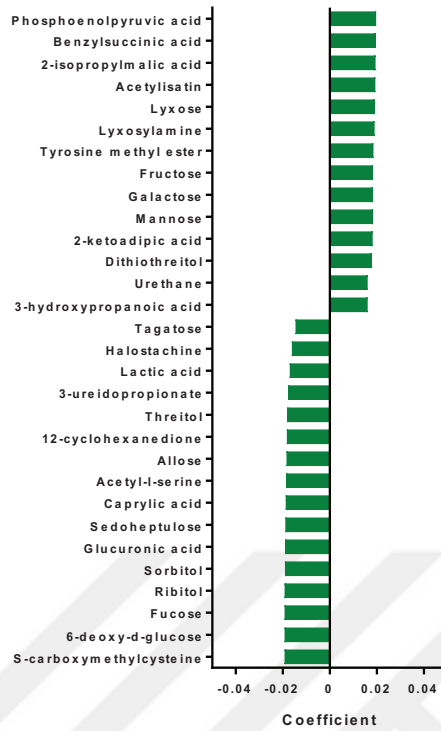


Şekil 4.100 DMFBS ve DMKİP'nin içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0,817 ve Q^2 :0,974). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.101 DMFBS ve DMKİP'nin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu DMFBS'da daha fazla bulunan ekstrasellüler metabolitler Phosphoenolpyruvic acid, Benzylsuccinic acid, 2-isopropylmalic acid, Acetylisatin, Lyxose, Lyxosylamine, Tyrosine methyl ester, Fructose, Galactose, Mannose, 2-ketoadipic acid, Dithiothreitol, Urethane, 3-hydroxypropanoic acid iken, Tagatose, Halostachine, Lactic acid, 3-ureidopropionate, Threitol, 12-cyclohexanedione, Allose, Acetyl-l-serine, Caprylic acid, Sedoheptulose, Glucuronic acid, Sorbitol, Ribitol, Fucose, 6-deoxy-d-glucose, S-carboxymethylcysteine DMKİP'da daha fazla bulunmaktadır (Şekil 4.102).

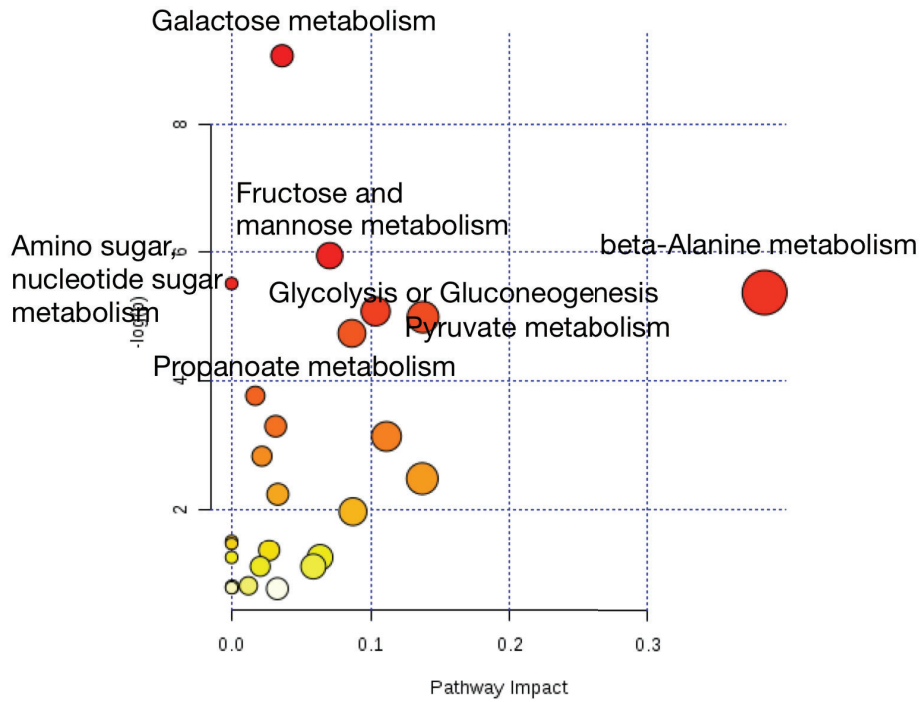


Şekil 4.102 DMFBS ve DMKİP ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.

DMFBS ve DMKİP besiyerlerinin içerdikleri metabolitlerinin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.28 ve Şekil 4.103'te sunulmuştur.

Tablo 4.28 DMFBS ve DMKİP besiyerlerinin istatistiksel olarak anlamlı değişen metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar

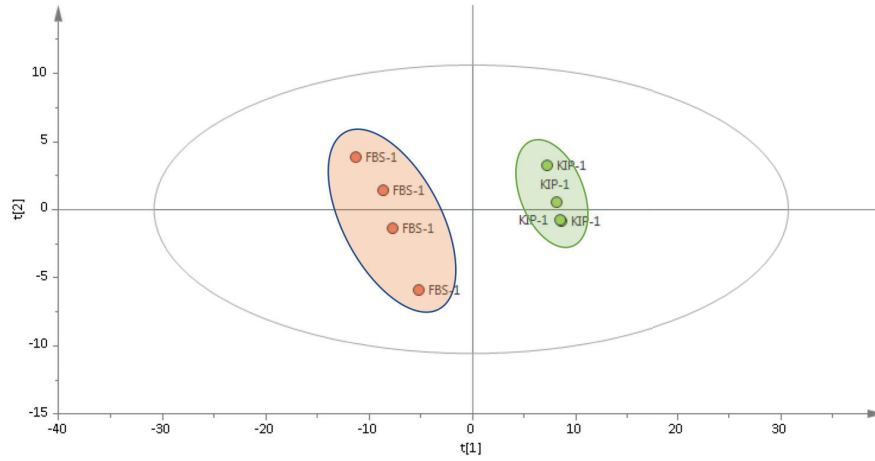
	Toplam metabolit sayısı	Anlamlı bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Galactose metabolism	41	5	0,51	0,00
Fructose and mannose metabolism	48	4	0,60	0,00
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	88	5	1,10	0,00
beta-Alanine metabolism	28	3	0,35	0,00
Glycolysis or Gluconeogenesis	31	3	0,39	0,01
Pyruvate metabolism	32	3	0,40	0,01
Propanoate metabolism	35	3	0,44	0,01
Starch and sucrose metabolism	50	3	0,62	0,02
Pyrimidine metabolism	60	3	0,75	0,04
Pantothenate and CoA biosynthesis	27	2	0,34	0,04



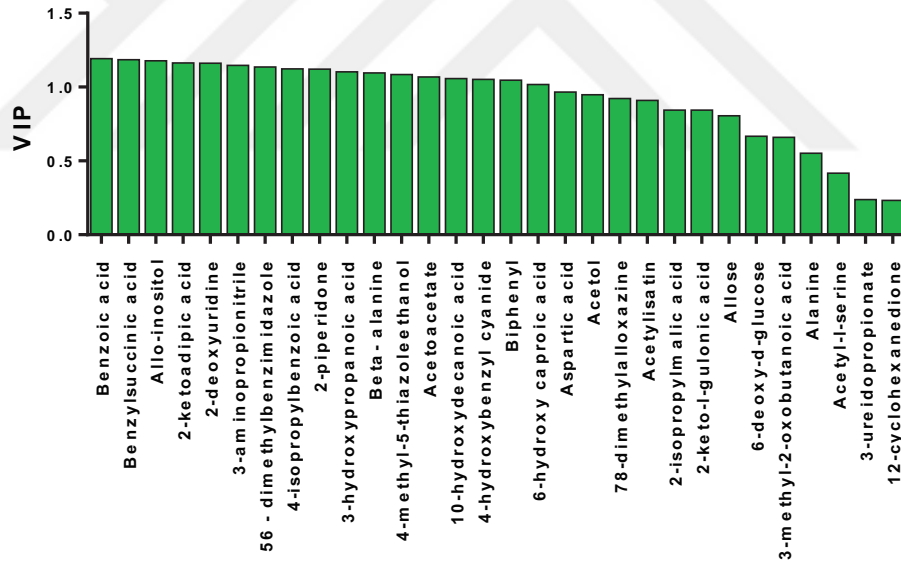
Şekil 4.103 DMFBS ve DMKİP besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yollar

4.9.16. DMFBS ve DMKİP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler; kültür süpernatantları: (FBS1-KİP1)

DMFBS ve DMKİP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitlerin metabolomik verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.104 ve 4.105). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.



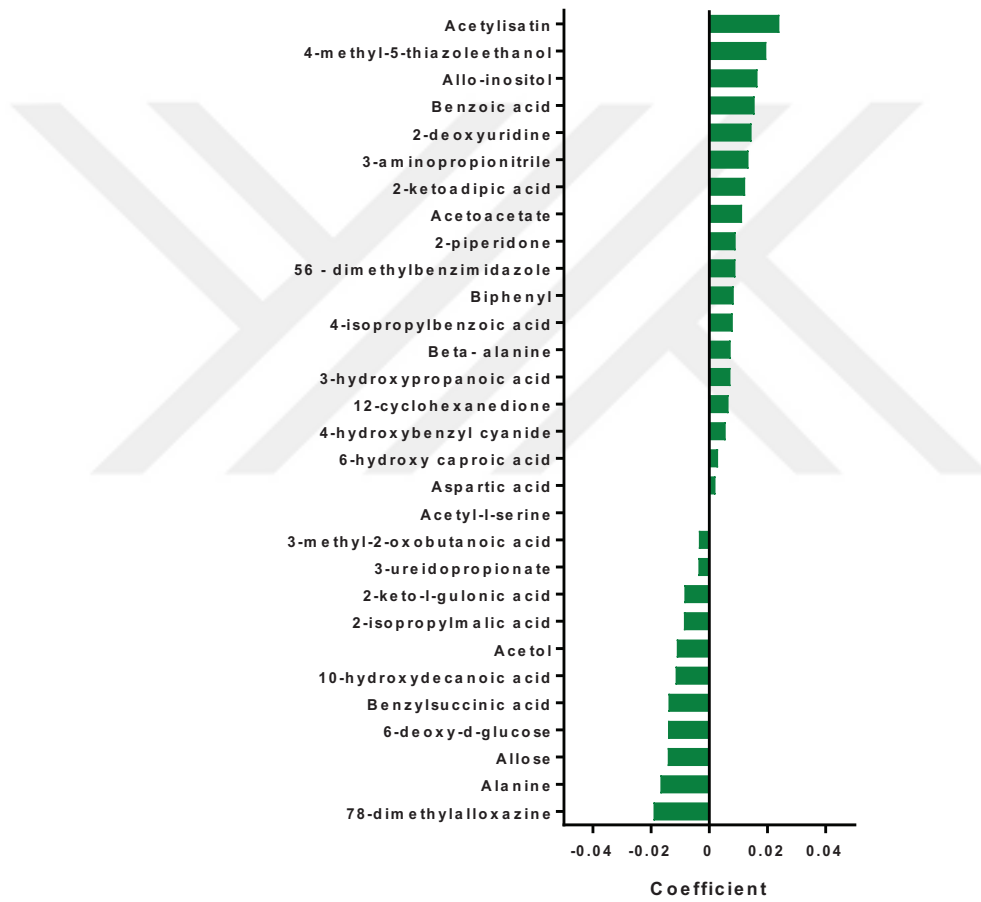
Şekil 4.104 DMFBS ve DMKİP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitlerin metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R²: 0,767 ve Q²:0,998). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.105 DMFBS ve DMKİP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu DMFBS ile çoğaltılan MKH'lerin süpernatantlarında daha fazla bulunan ekstrasellüler metabolitler Acetylsatin, 4-methyl-5-thiazoleethanol, Allo-inositol, Benzoic acid, 2-deoxyuridine, 3-aminopropionitrile, 2-ketoadipic acid, Acetoacetate, 2-piperidone, 5,6-

dimethylbenzimidazole, Biphenyl, 4-isopropylbenzoic acid, Beta-alanine, 3-hydroxypropanoic acid, 12-cyclohexanedione, 4-hydroxybenzyl cyanide, 6-hydroxy caproic acid, Aspartic acid, Acetyl-l-serine'dir. 3-methyl-2-oxobutanoic acid, 3-ureidopropionate, 2-keto-l-gulonic acid, 2-isopropylmalic acid, Acetol, 10-hydroxydecanoic acid, Benzylsuccinic acid, 6-deoxy-d-glucose, Allose, Alanine, 78-dimethylalloxazine ise DMKİP ile çoğaltılan MKH'lerin süpernatantlarında daha fazla bulunmuştur (Şekil 4.106).

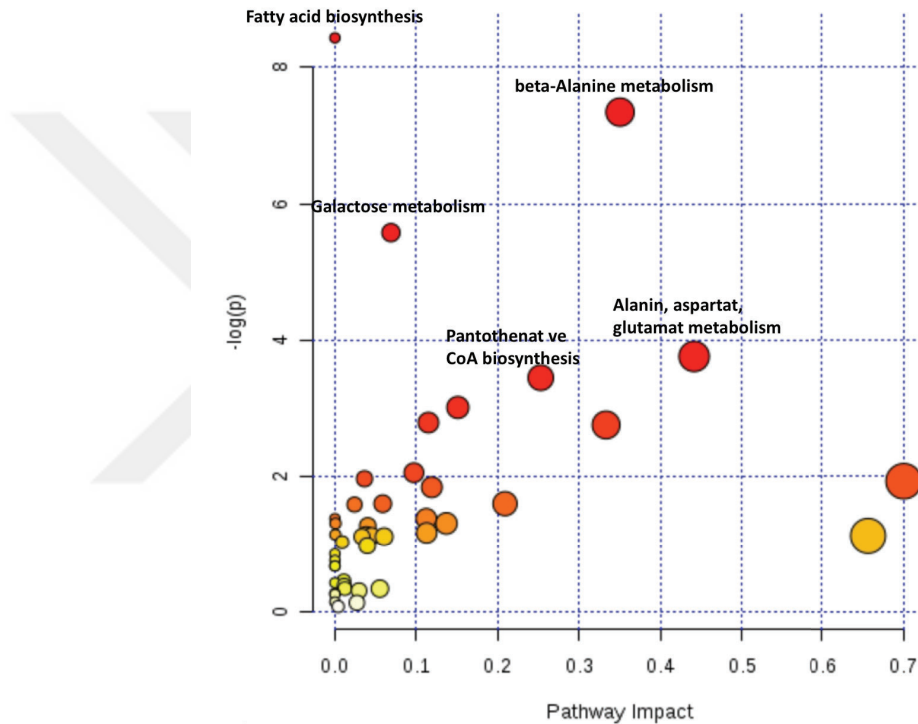


Şekil 4.106 DMFBS ve DMKİP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.

DMFBS ve DMKİP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitlerin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.29 ve Şekil 4.107'de sunulmuştur.

Tablo 4.29 DMFBS ve DMKİP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitlere bağlı değişen yollar

	Toplam metabolit sayısı	Anlamli bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Fatty acid biosynthesis	49	7	1,28	0,00
beta-Alanine metabolism	28	5	0,73	0,00
Galactose metabolism	41	5	1,07	0,00
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	3	0,63	0,02
Pantothenate and CoA biosynthesis	27	3	0,71	0,03

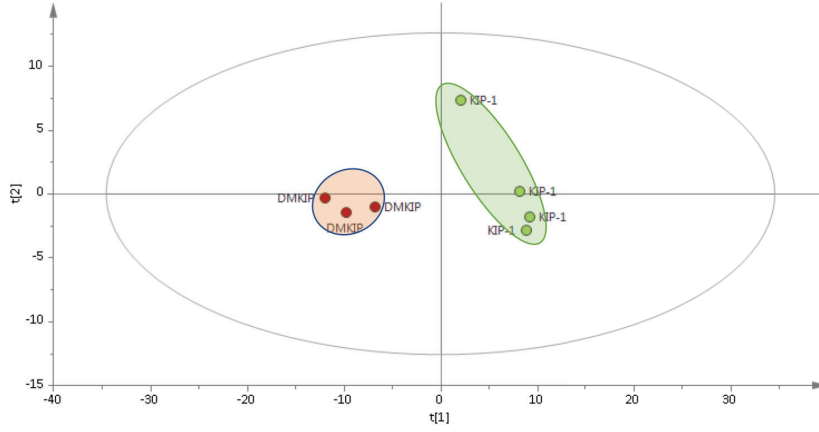


Şekil 4.107 DMFBS ve DMKİP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitlere bağlı değişen yollar

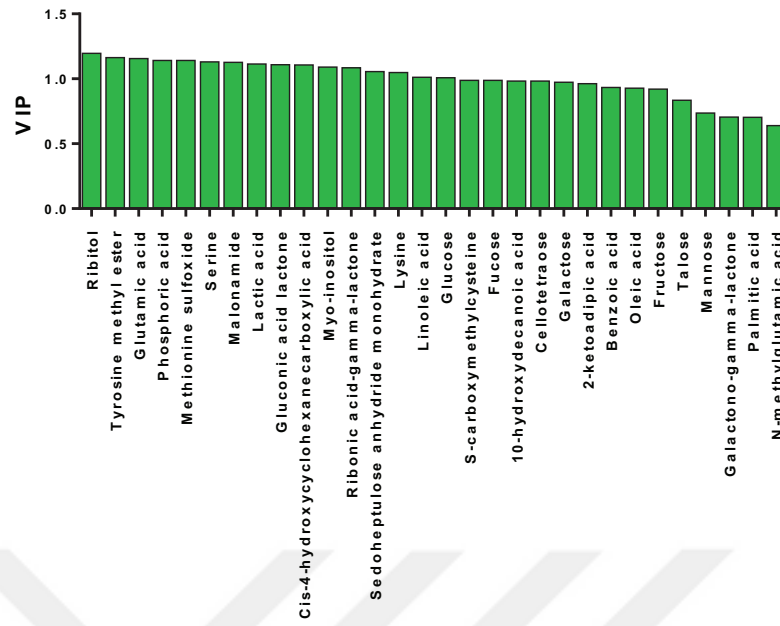
4.9.17. DMKİP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları metabolitlerin; DMKİP ile karşılaştırması: (DMKİP-KİP1)

DMKİP besiyeri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitler ve DMKİP'nin içerdiği metabolitlerin metabolomik verileri

karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.108 ve 4.109). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.

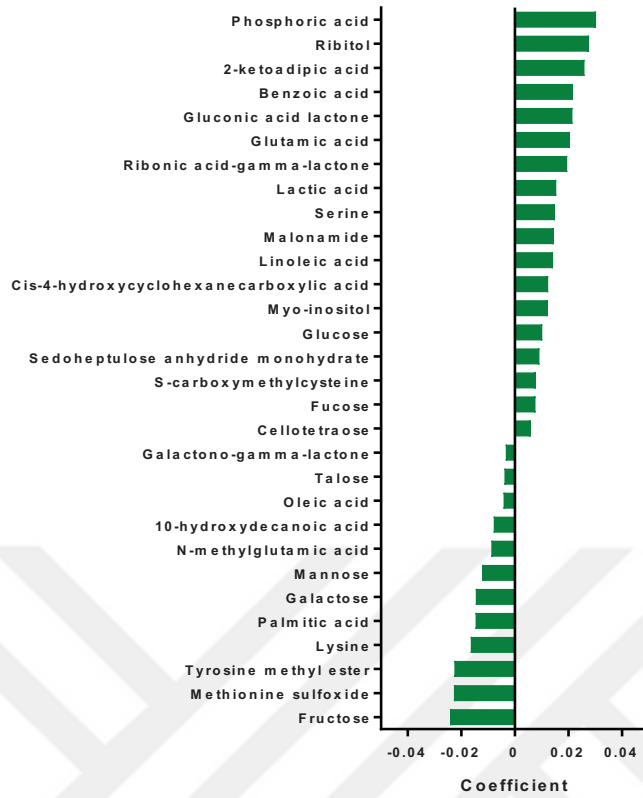


Şekil 4.108 DMKİP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlerin ve DMKİP'nin içerdiği metabolitlerin metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0,901 ve Q^2 : 0,956)



Şekil 4.109 DMKİP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMKİP'nin içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucuna göre DMKİP besiyeri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitlerden Phosphoric acid, Ribitol, 2- ketoadipic acid, Benzoic acid, Gluconic acid lactone, Glutamic acid, Ribonic acid-gamma-lactone, Lactic acid, Serine, Malonamide, Linoleic acid, Cis-4-hydroxycyclohexanecarboxylic acid, Myo-inositol, Glucose, Sedoheptulose anhydride monohydrate, S-carboxymethylcysteine, Fucose, Cellotetraose DMKİP'nin içerdiği metabolitlere göre daha fazladır. Galactone-gamma-lactone, Talose, Oleic acid, 10-hydroxydecanoic acid, N-methylglutamic acid, Mannose, Galactose, Palmitic acid, Lysine, Tyrosine methyl ester, Methionine sulfoxide, Fructose ise DMKİP'nin içerdiği ekstrasellüler metabolitleri arasında, DMKİP besiyeri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitlere göre daha fazladır (Şekil 4.110).

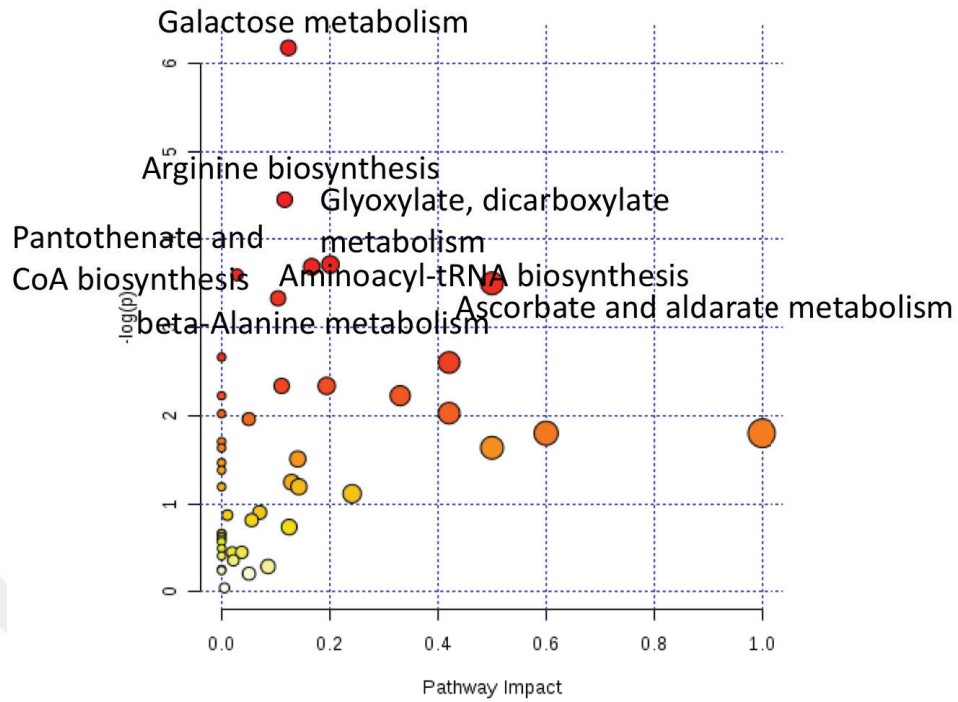


Şekil 4.110 DMKİP besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMKİP'nin içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği, regresyon analizi.

DMKİP besiyeri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitler ve DMKİP'nin içerdiği metabolitlerin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.30 ve Şekil 4.111'de sunulmuştur.

Tablo 4.30 DMKİP besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMKİP'nin içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar

	Toplam metabolit sayısı	Anlamli bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Galactose metabolism	27	5	0.96	0.00
Arginine biosynthesis	14	3	0.50	0.01
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	4	1.14	0.02
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	48	5	1.70	0.03
Pantothenate and CoA biosynthesis	19	3	0.67	0.03
Ascorbate and aldarate metabolism	8	2	0.28	0.03
beta-Alanine metabolism	21	3	0.75	0.04



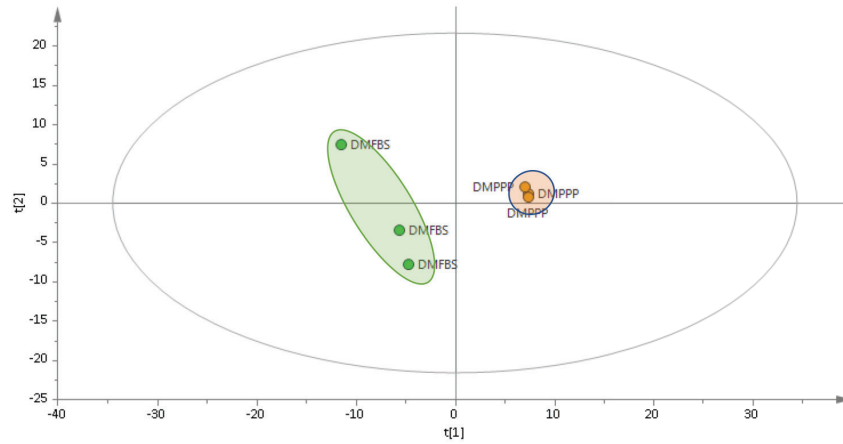
Şekil 4.111 DMKİP besi yeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMKİP'nin içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar

DMFBS ve DMKİP'nin anlamlı düzeyde farklılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptanan ekstrasellüler metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda iki besi yeri arasında anlamlı farklılık gösteren yollar; galaktoz metabolizması, fruktoz ve mannoz metabolizması, amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması, beta-alanin metabolizması, glikoliz ve glikoneogenezis, pirüvat metabolizması, propanoat, metabolizması, nişasta ve sükroz metabolizması, pirimidin metabolizması ve pantotenat ve CoA biyosentezidir (Tablo 4.28, Şekil 4.103). DMFBS ve DMKİP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatanlarının içeriğindeki anlamlı düzeyde farklılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptanan ekstrasellüler metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizlerine göre de; yağ asit biyosentezi, beta-alanin metabolizması, galaktoz metabolizması, alanin, aspartat glutamat metabolizması, pantotenat ve CoA biyosentezi etkilenmektedir (Tablo 4.29, Şekil 4.107). Besiyeri içeriklerine göre, DMFBS ve DMKİP MKH kültür süpernatanlarının metabolitleri arasında farklı olarak yağ asidi biyosentezi ve alanin, aspartat glutamat metabolizmasının etkilendiği görülmektedir. DMKİP ile çoğaltılmış MKH'lerden

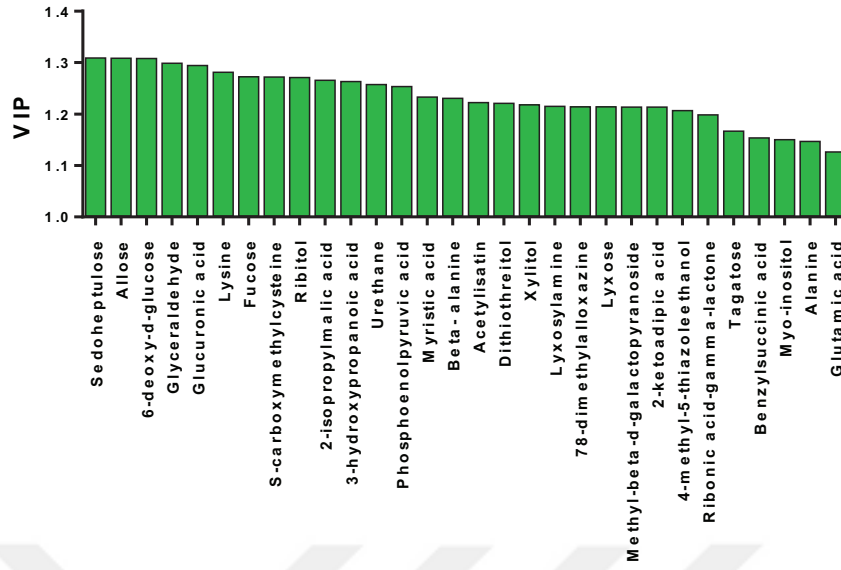
salgılanan ekstrasellüler metabolitler ile DMKİP'nın içerdiği metabolitler arasında anlamlı düzeyde farklılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptananlarla yapılan analizler sonucu, galaktoz metabolizması, arginin biyosentezi, glioksilat ve dikarboksilat metabolizması, aminoaçil tRNA biyosentezi, pantotenat ve CoA biyosentezi, askorbat ve aldarat metabolizması ve beta-alanin metabolizması anlamlı etkilenmiştir (Tablo 4.30, Şekil 4.111).

4.9.18. DMFBS ve DMPPP Besiyerlerinin Anlamlı Etkilediği Metabolik Yolaklar: (DMFBS-DMPPP)

MKH kültüründe kullandığımız DMFBS ile DMPPP'nın içerdikleri metabolitlerinin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.112 ve 4.113). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.

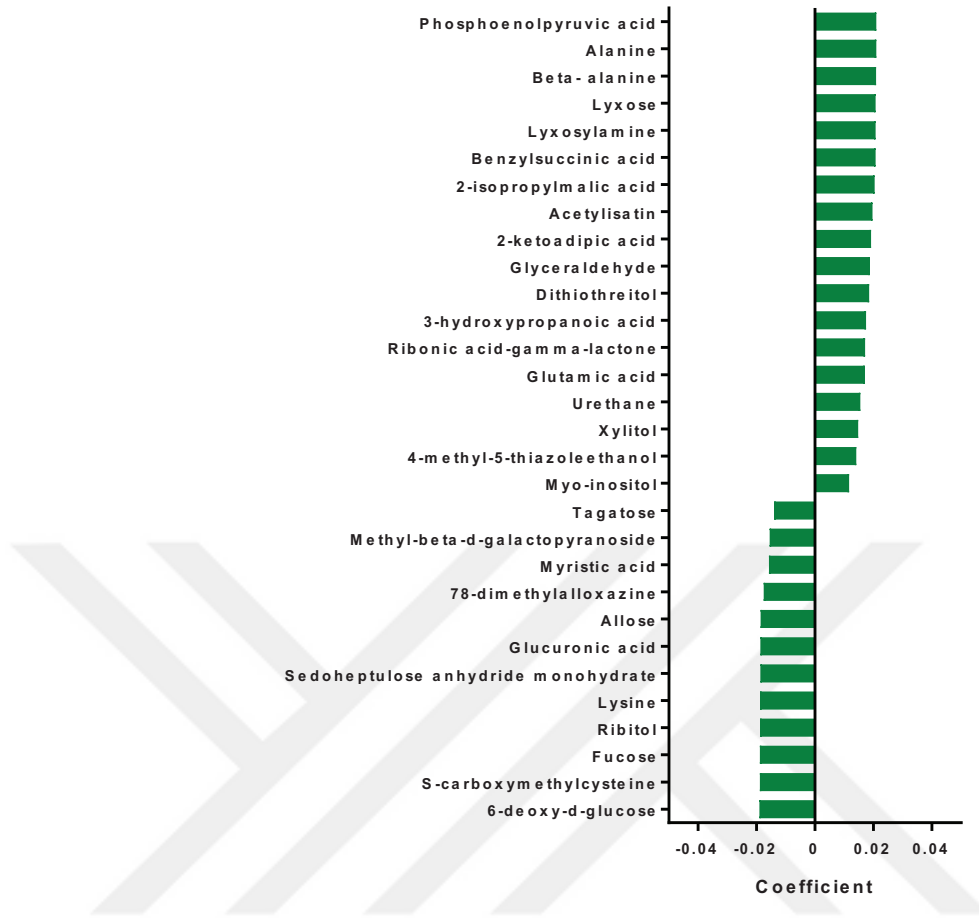


Şekil 4.112 DMFBS ve DMPPP'nın içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0,843 ve Q^2 :0,985). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir



Şekil 4.113 DMFBS ve DMPPP'nin veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucuna göre Phosphoenolpyruvic acid, Alanine, Beta-alanine, Lyxose, Lyxosylamine, Benzylsuccinic acid, 2-isopropylmalic acid, Acetylisatin, 2-ketoadipic acid, Glyceraldehyde, Dithiothreitol, 3-hydroxypropanoic acid, Ribonic acid-gamma-lactone, Glutamic acid, Urethane, Xylitol, 4-methyl-5-thiazoleethanol, Myo-inositol DMFBS içeriğinde DMPPP'na göre daha fazla bulunan metabolitlerdir. Tagatose, Methyl-beta-d-galactopyranoside, Myristic acid, 78-dimethylalloxazine, Allose, Glucuronic acid, Sedoheptulose anhydride monohydrate, Lysine, Ribitol, Fucose, S-carboxymethylcysteine, 6-deoxy-d-glucose ise DMPPP'da DMFBS'a göre daha fazla bulunmaktadır (Şekil 4.114).

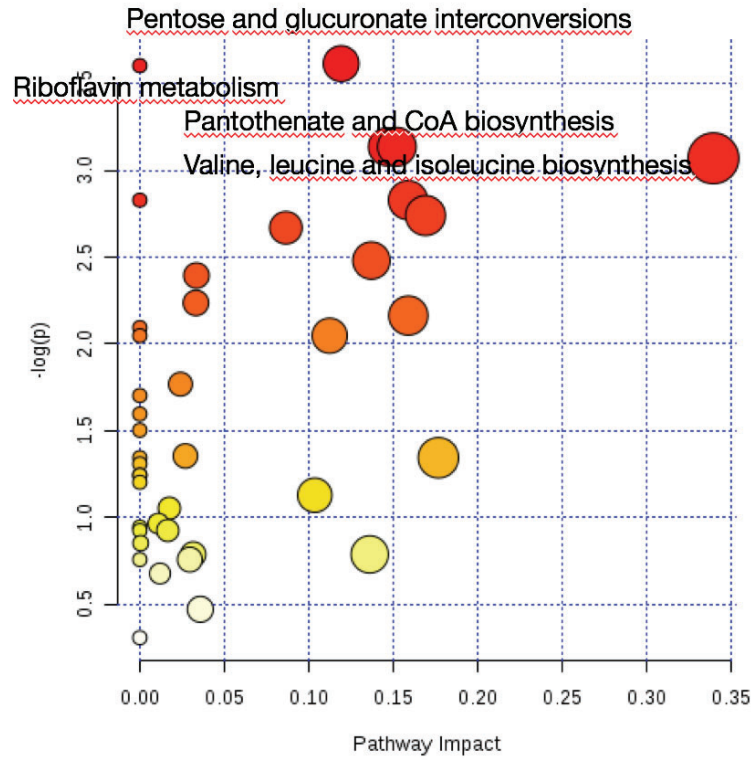


Şekil 4.114 DMFBS ve DMPPP ekstrasetülör metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.

DMFBS ve DMPPP besiyerlerinin içerdikleri metabolitlerinin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.31 ve Şekil 4.115'te sunulmuştur.

Tablo 4.31 DMFBS ve DMPPP besiyerlerinin istatistiksel olarak anlamlı değişen metabolitlerinin yer aldıkları yolaklar

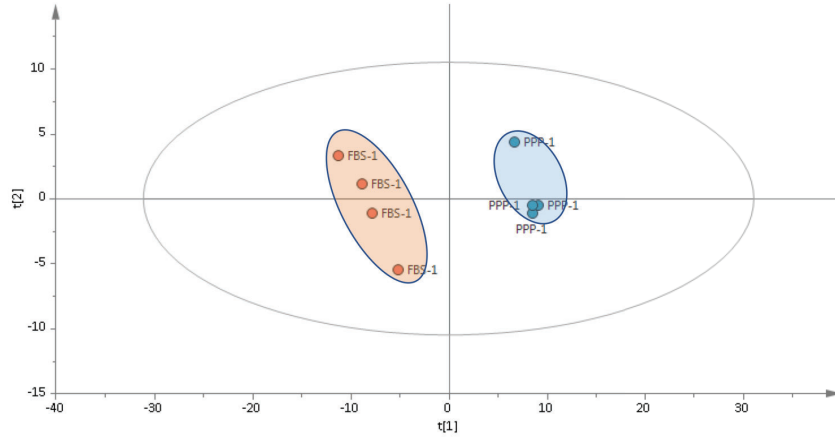
	Toplam metabolit sayısı	Anlamlı bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Pentose and glucuronate interconversions	53	3	0,66	0,03
Riboflavin metabolism	21	2	0,26	0,03
Pantothenate and CoA biosynthesis	27	2	0,34	0,04
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	27	2	0,34	0,04



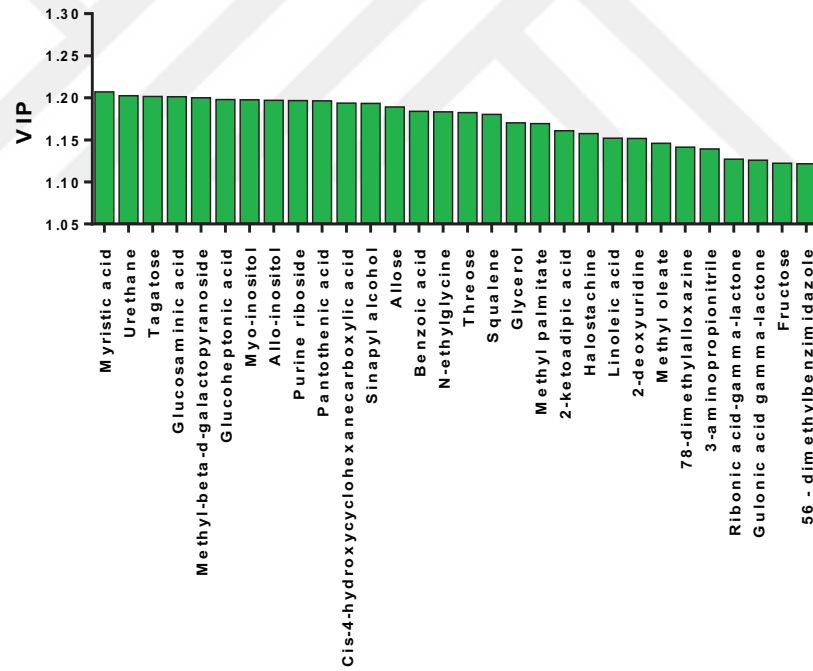
Şekil 4.115 DMFBS ve DMPPP'nın anlamlı etkilediği metabolik yollar

4.9.19. DMFBS ve DMPPP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler; kültür medyum süpernatantları: (FBS1-PPP1)

DMFBS ve DMPPP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitlerin metabolomik verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.116 ve 4.117). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.



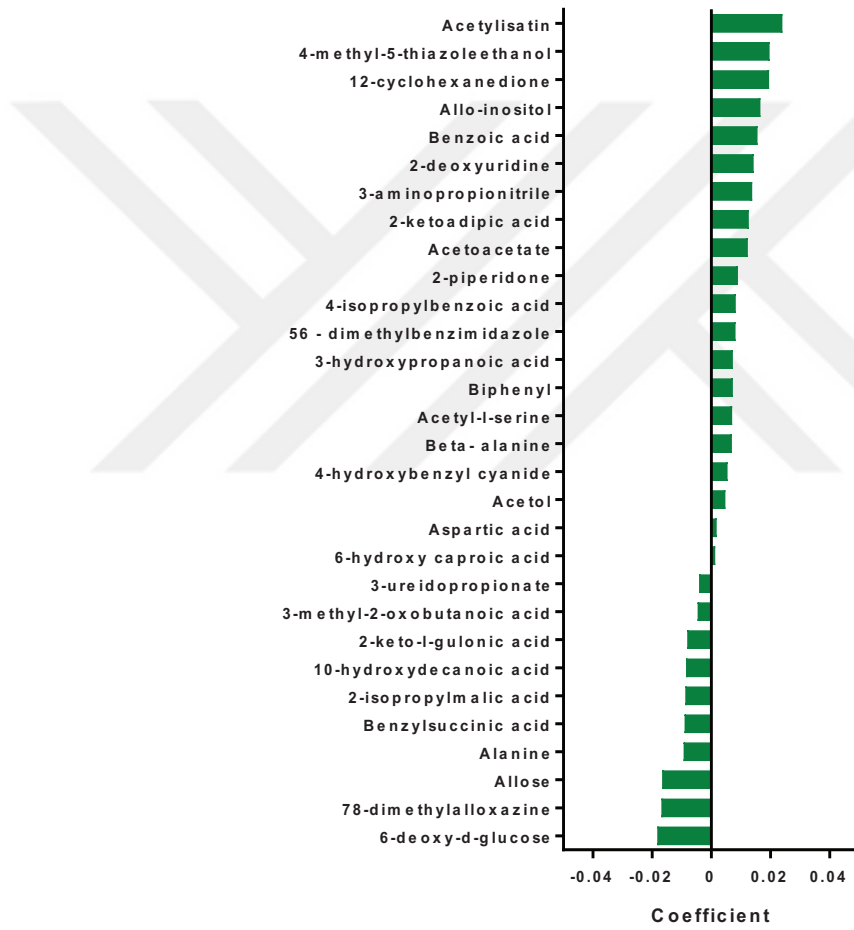
Şekil 4.116 DMFBS ve DMPPP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R²: 0,782 ve Q²:0,957). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.117 DMFBS ve DMPPP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucuna göre DMFBS ile çoğaltılan MKH'lerin süpernatantlarında daha fazla bulunan ekstrasellüler metabolitler Acetylisatin, 4-methyl-5-thiazoleethanol, 12-cyclohexanedione, Allo-inositol, Benzoic acid, 2-

deoxyuridine, 3-aminopropionitrile, 2-ketoadipic acid, Acetosacetate, 2-piperidone, 4-isopropylbenzoic acid, 56-dimethylbenzimidazole, 3-hydroxypropanoic acid, Biphenyl, Acetyl-l-serine, beta-alanine, 4-hydroxybenzyl cyanide, , Acetol, Aspartic acid,6-hydroxy caproic aciddır. 3-methyl-2-oxobutanoic acid, 2-keto-l-gulonic acid, 10-hydroxydecanoic acid, Benzylsuccinic acid, Alanine, Allose, 78-dimethylalloxazine, 6-deoxy-d-glucose ise DMFBS ile çoğaltılan MKH'lerin süpernatantlarında, DMPPP ile çoğaltılan MKH'lerin süpernatantlarına göre daha az bulunmaktadır (Şekil 4.118).

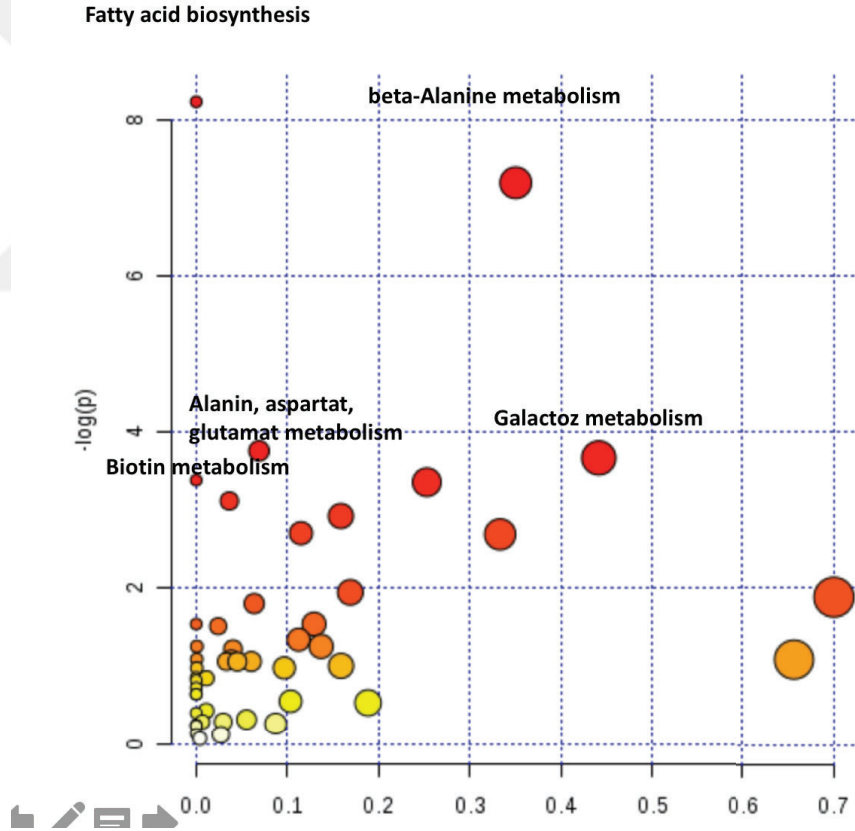


Şekil 4.5 DMFBS ve DMPPP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.

DMFBS ve DMPPP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitlerin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.32 ve Şekil 4.119'da sunulmuştur.

Tablo 4.32 DMFBS ve DMPPP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitlere bağlı değişen yollar

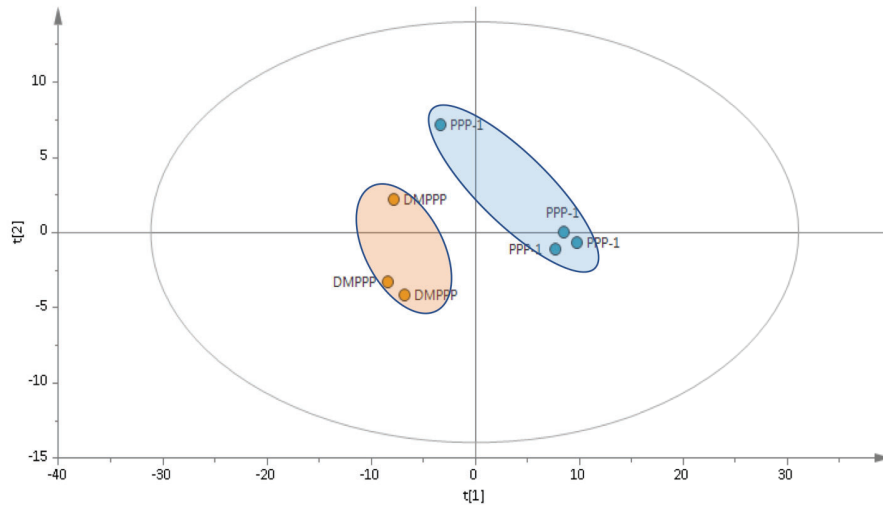
	Toplam metabolit sayısı	Anlamli bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Fatty acid biosynthesis	49	7	1,32	0,00
beta-Alanine metabolism	28	5	0,76	0,00
Galactose metabolism	41	4	1,11	0,02
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	3	0,65	0,03
Biotin metabolism	11	2	0,30	0,03
Pantothenate and CoA biosynthesis	27	3	0,73	0,03
Starch and sucrose metabolism	50	4	1,35	0,04



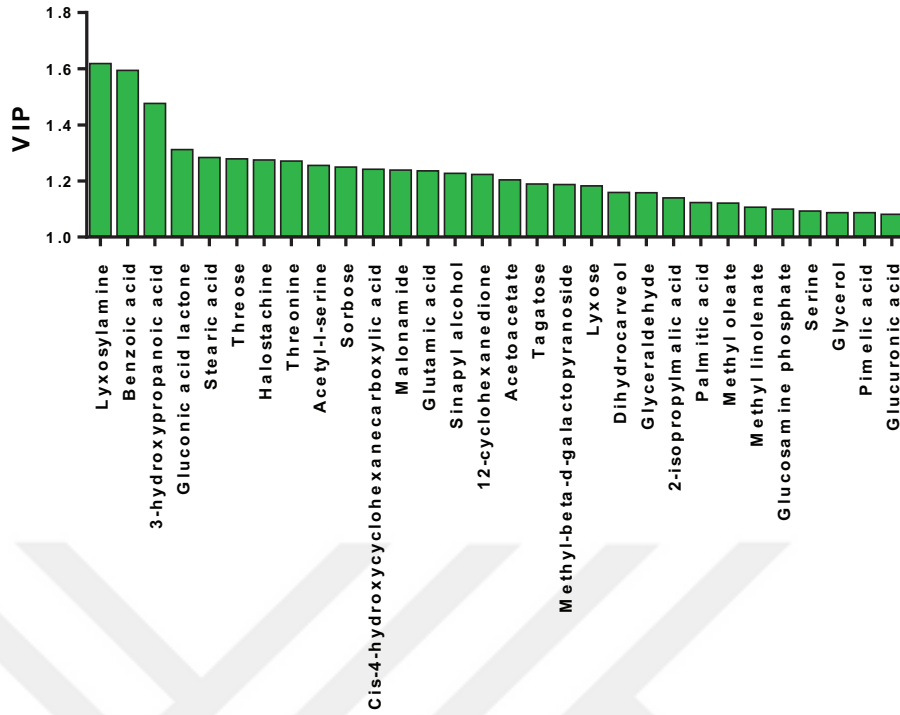
Şekil 4.119 DMFBS ve DMPPP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitlere bağlı değişen yollar

4.9.20. DMPPP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantları; salgıladıkları metabolitlerin; DMPPP ile karşılaştırması: (DMPPP-PPP1)

DMPPP besiyeri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitler ve DMKİP'nin içerdiği metabolitlerin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.120 ve 4.121). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.

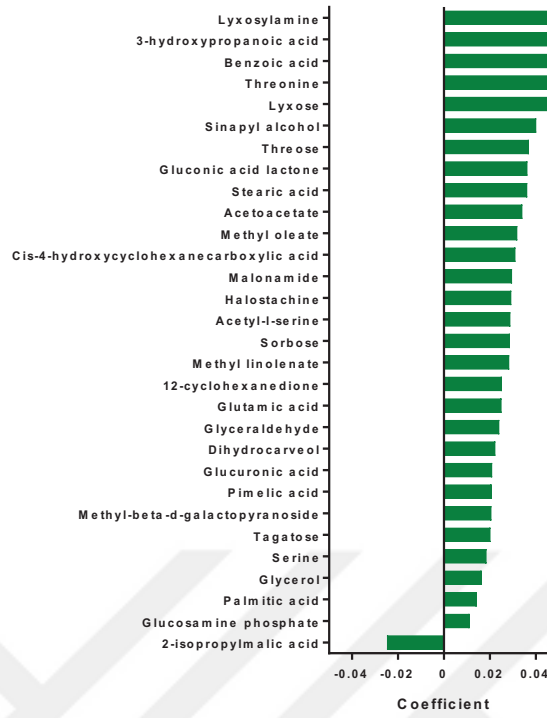


Şekil 4.120 DMPPP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlerin ve DMPPP'ın içerdiği metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0,901 ve Q^2 :0,956). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir



Şekil 4.121 DMPPP besiyerleri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMPPP'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu DMPPP besiyeri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarında, DMKİP'nin içerdiği metabolitlere göre Lyxosylamine, 3-hydroxypropanoic acid, Benzoic acid, Threonine, Lyxose, Sinapyl alcohol, Threose, Gluconic acid lactone, Stearic acid, Acetoacetate, Methyl oleate, Cis-4-hydroxycyclohexanecarboxylic acid, Malonamide, Halostachine, Acetyl-l-serine, Sorbose, Methyl linolenate, Glutamic acid, Glyceraldehyde, Dihydrocarveol, Glucuronic acid, Pimelic acid, Methyl -beta-d-galactopyranoside, Tagatose, Serine, Glycerol, Palmitic acid, Glucosamine phosphate daha fazla bulunurken, 2-isopropylmalic acid daha az bulunmaktadır (Şekil 4.122).

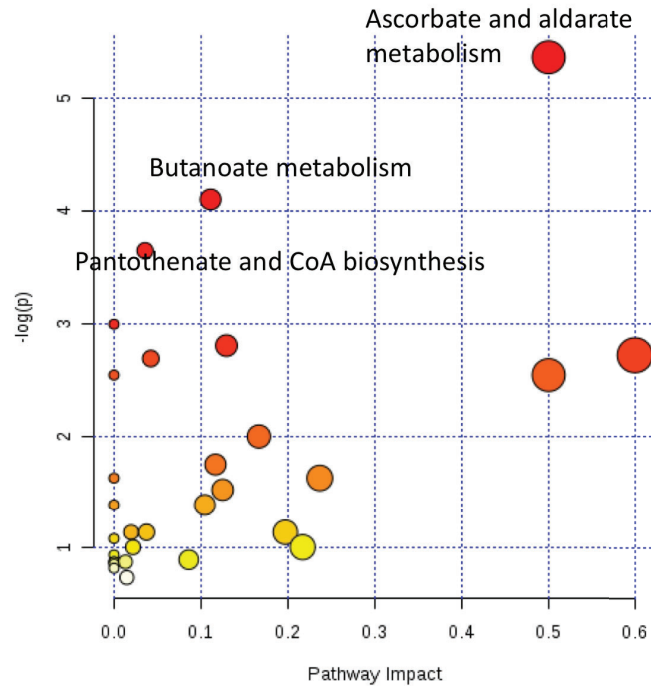


Şekil 4.122 DMPPP besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMPPP'nın içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği, regresyon analizi.

DMPPP besiyeri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitler ve DMPPP'nın içerdiği metabolitlerin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.33 ve Şekil 4.123'te sunulmuştur.

Tablo 4.33 DMPPP besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMPPP'nın içerdiği metabolitlere bağlı değişen yolaklar

	Toplam metabolit sayısı	Anlamli bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Ascorbate and aldarate metabolism	8	2	0.11	0.00
Butanoate metabolism	15	2	0.20	0.02
Pantothenate and CoA biosynthesis	19	2	0.26	0.03

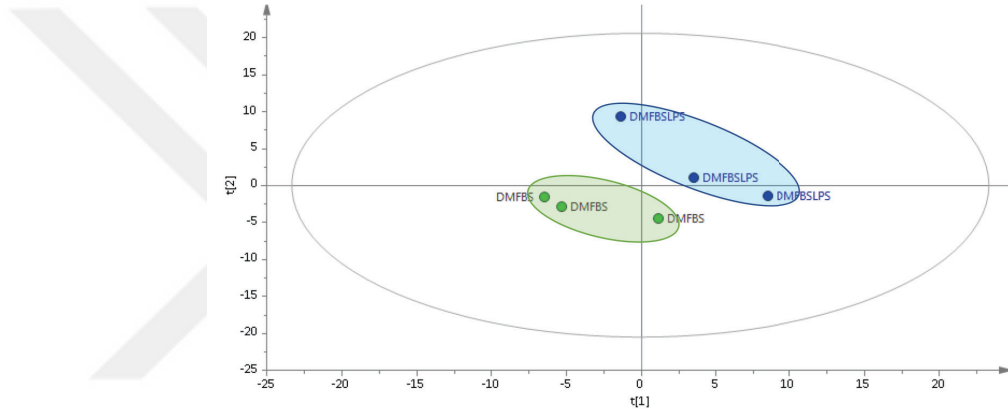


Şekil 4.123 DMPPP besi yeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMPPP'in içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar

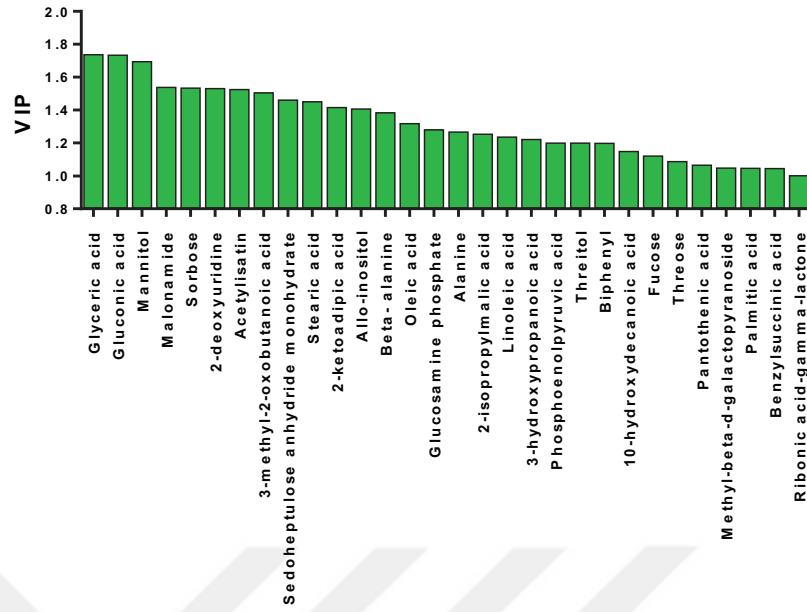
DMFBS ve DMPPP'nin anlamlı düzeyde farklılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptanan ekstrasellüler metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda iki besi yeri arasında anlamlı farklılık gösteren yollar; pentoz ve glukuronat dönüşümleri, riboflavin metabolizması, pantotenat ve CoA biyosentezi, valin, lösin, izolösin biyosentezidir (Tablo 4.31, Şekil 4.115). DMFBS ve DMPPP besiyerleri ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içeriğindeki anlamlı düzeyde farklılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptanan ekstrasellüler metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizlerine göre de; yağ asit biyosentezi, beta-alanin metabolizması, galaktoz metabolizması, alanin, aspartat glutamat metabolizması, biyotin metabolizması, pantotenat ve CoA biyosentezi ve nişasta ve sükroz metabolizmasının etkilendiği görülmektedir (Tablo 4.32, Şekil 4.119). DMPPP ile çoğaltılmış MKH'lerden salgılanan ekstrasellüler metabolitler ile DMPPP'nin içerdiği metabolitler arasında anlamlı düzeyde farklılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptananlarla yapılan analizler sonucu, askorbat ve aldarat metabolizması, butanoat metabolizması, pantotenat ve CoA biyosentezi anlamlı etkilendirilmiştir (Tablo 4.33, Şekil 4.123).

4.9.21. DMFBS ve DMFBSLPS besiyelerinin anlamlı etkilediği metabolik yollar: (DMFBS-DMFBSLPS)

MKH kültüründe kullandığımız DMFBS'un inflamatuvar uyarım etkisinde değişen metabolitlerinin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.124 ve 4.125). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.

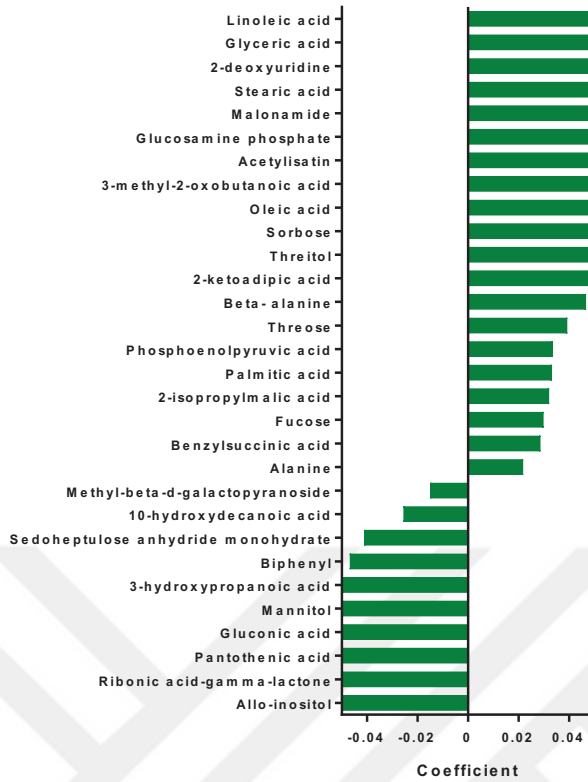


Şekil 4.124 DMFBS ve DMFBSLPS'in içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0,938 ve Q^2 :0,952). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.125 DMFBS ve DMFBSLPS'in veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu MKH kültüründe kullandığımız DMFBS'un ekstrasellüler metabolitleri arasında Linoleic acid, Glyceric acid, 2-deoxyuridine, Stearic acid, Malonamide, Glucosamine phosphate, Acetylisatin, 3-methyl-2-oxobutanoic acid, Oleic acid, Sorbose, Threitol, 2-ketoadipic acid, Beta-alanine, Threose, Phosphoenolpyruvic acid, Palmitic acid, 2-isopropylmalic acid, Fucose, Benzylsuccinic acid, Alanine DMFBSLPS'ye göre daha fazla, Methyl-beta-d-galactopyranoside, 10- hydroxydecanoic acid, Sedoheptulose anhydride monohydrate, Biphenyl, 3-hydroxypropanoic acid, Mannitol, Gluconic acid, Pantothenic acid, Ribonic acid-gamma-lactone, Allo-inositol ise daha az bulunmuştur (Şekil 4.126).

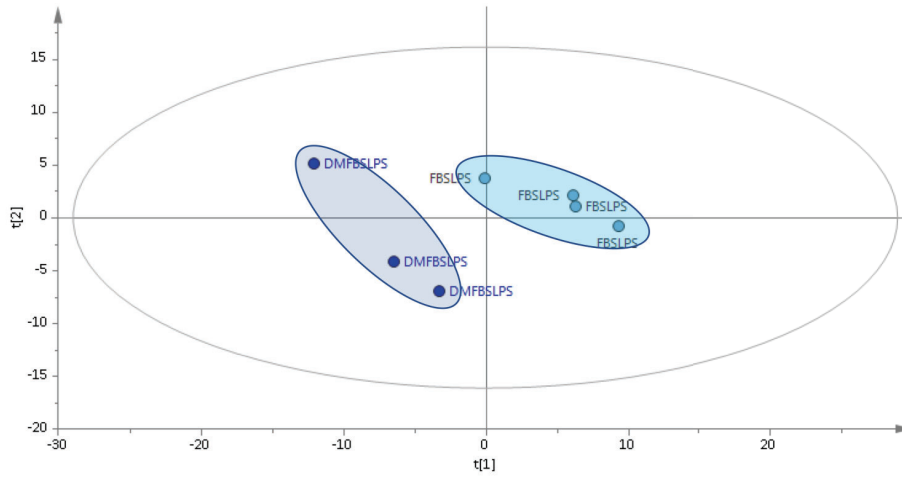


Şekil 4.126 DMFBS ve DMFBSLPS ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.

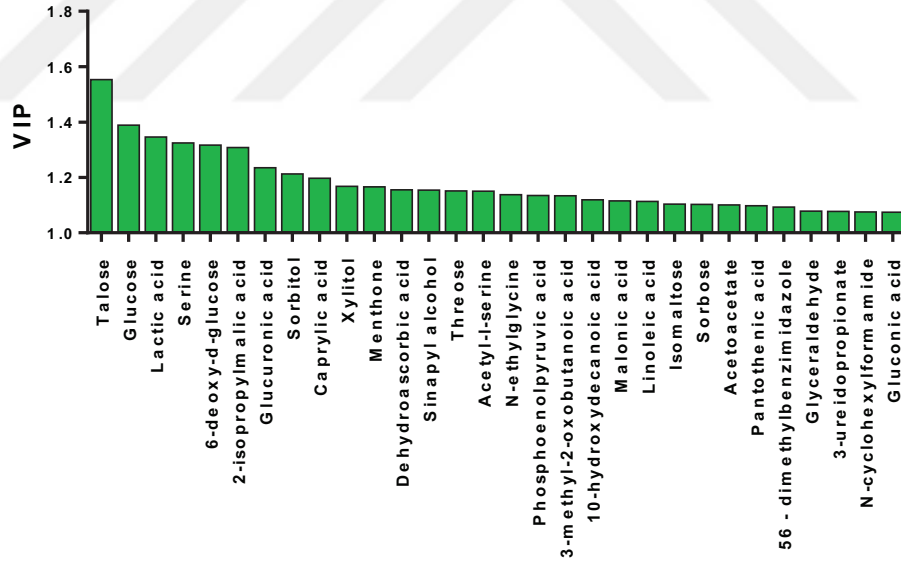
Elde ettiğimiz sonuçlarda DMFBS ve DMFBSLPS arasında istatistiksel anlamlı değişen/farklı olan metabolit bulunmadığından, anlamlı etkilenen yolak da bulunmamaktadır.

4.9.22. İnflamatuvar uyarım varlığında FBS eklentisi ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatanlarında salgılanan metabolitlerin; DMFBSLPS ile karşılaştırması: (DMFBSLPS-FBSLPS1)

İnflamatuvar uyarım varlığında DMFBSLPS ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatanlarının içerdiği metabolitler ve DMFBSLPS'in içerdiği metabolitlerin metabolomik verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.127 ve 4.128). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R2) ve tahmin edebilme (Q2) değerleri ile gösterilmiştir.



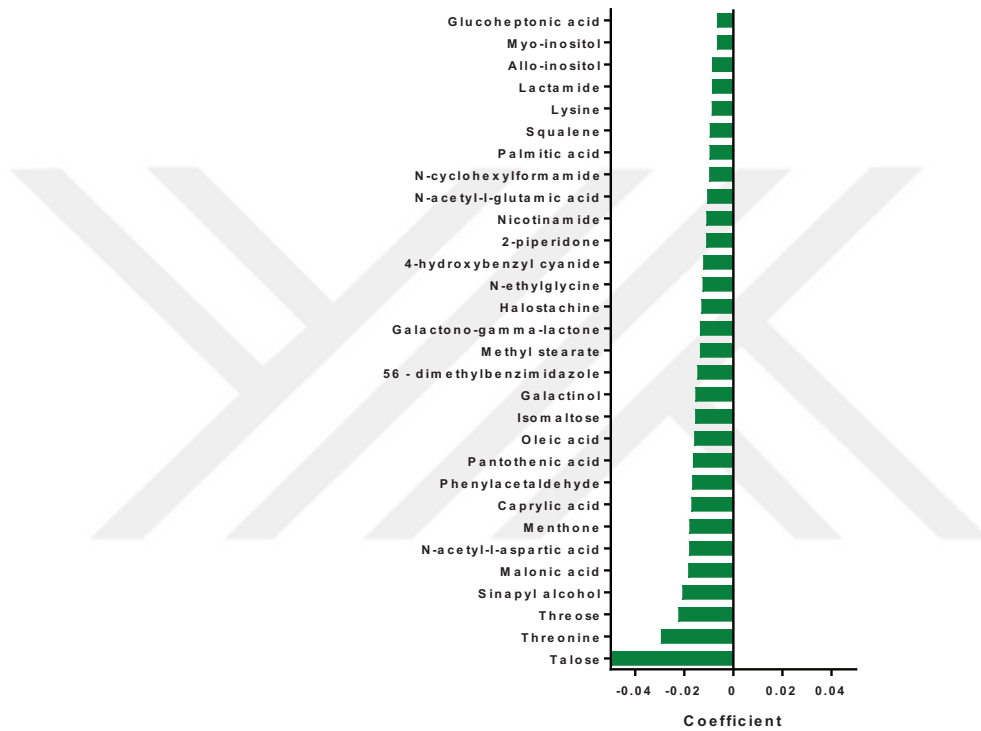
Şekil 4.127 DMFBSLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlerin ve DMFBS'un içerdiği metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,809 ve Q2:0,906). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.128 DMFBS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMFBSLPS'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu inflamatuvar uyarım varlığında DMFBSLPS ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarında, DMFBSLPS'in içerdiği metabolitlere göre Glucoheptonic acid, Myo-inositol, Allo-inositol, Lactamide,

Squalene, Palmitic acid, N-cyclohexylformamide, N-acetyl-l-glutamic acid, Nicotinamide, 2- piperidone, 4-hydroxybenzyl cyanide, N-ethylglycine, Halostachine, Galactono-gamma-lactone, Methyl stearate, 56-dimethylbenzimidazole, Galactinol, Isomaltose, Oleic acid, Pantothenic acid, Phenylacetaldehyde, Caprylic acid, Menthone, N-acetyl-l-aspartic acid, Malonic acid, Sinapyl alcohol, Thereose, Threonine, Talose daha az bulunmaktadır (Şekil 4.129).

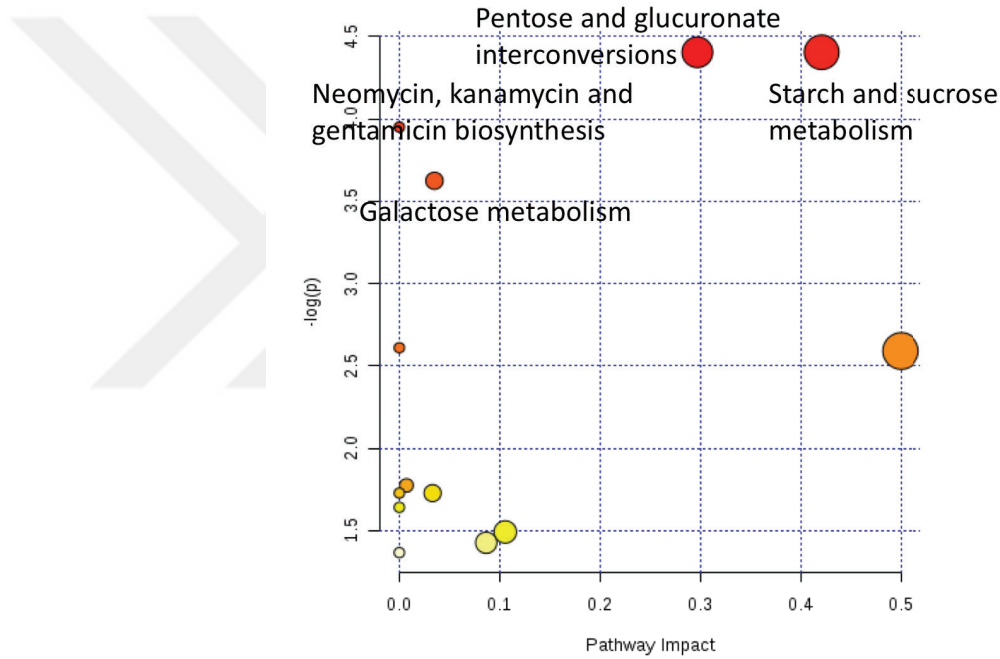


Şekil 4.129 DMFBSLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMFBSLPS'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği, regresyon analizi

İnflamatuvar uyarım varlığında DMFBSLPS ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitler ve DMFBSLPS'in içerdiği metabolitlerin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonuçları Tablo 4.34 ve Şekil 4.130'da sunulmuştur.

Tablo 4.34 DMFBSLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMFBSLPS'in içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar

	Toplam metabolit sayısı	Anlamli bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Pentose and glucuronate interconversions	18	2	0.17	0.01
Starch and sucrose metabolism	18	2	0.17	0.01
Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis	2	1	0.02	0.02
Galactose metabolism	27	2	0.26	0.03



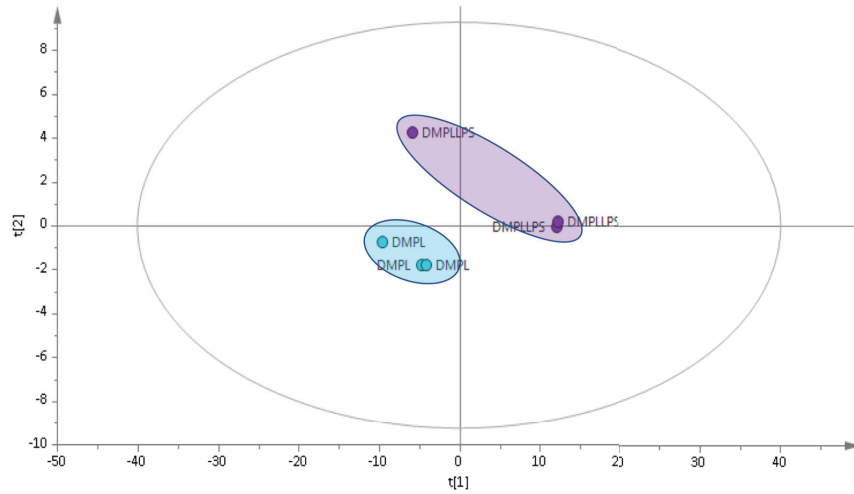
Şekil 4.130 DMFBSLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMFBSLPS'in içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar

MKH kültüründe kullandığımız DMFBS'un inflamatuvar uyarım etkisinde değişen metabolitlerinin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelendiğinde, DMFBS ve DMFBSLPS arasında istatistiksel anlamli değişen/farklı olan metabolit bulunmadığından, anlamli etkilenen yolak da bulunmadığı görülmüştür. İnflamatuvar uyarım varlığında DMFBSLPS ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitler ve DMFBSLPS'in içerdiği metabolitlerin metabolomiks verileri

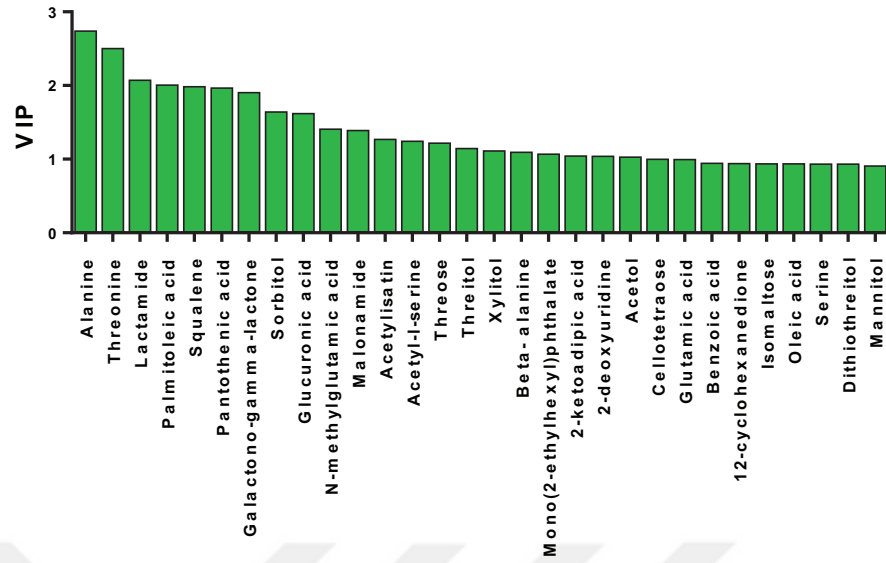
karşılaştırmalı olarak incelendiğinde ise, pentoz ve glukuronat dönüşümleri, nişasta ve sükroz metabolizması, neomisin, kanamisin ve gentamisin biyosentezi ve galaktoz metabolizması anlamlı etkilenmiştir (Tablo 4.34, Şekil 4.130).

4.9.23. DMPL ve DMPLLPS besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yollar: (DMPL-DMPLLPS)

MKH kültüründe kullandığımız DMPL'in inflamatuvar uyarım etkisinde değişen metabolitlerinin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.131 ve 4.132). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.

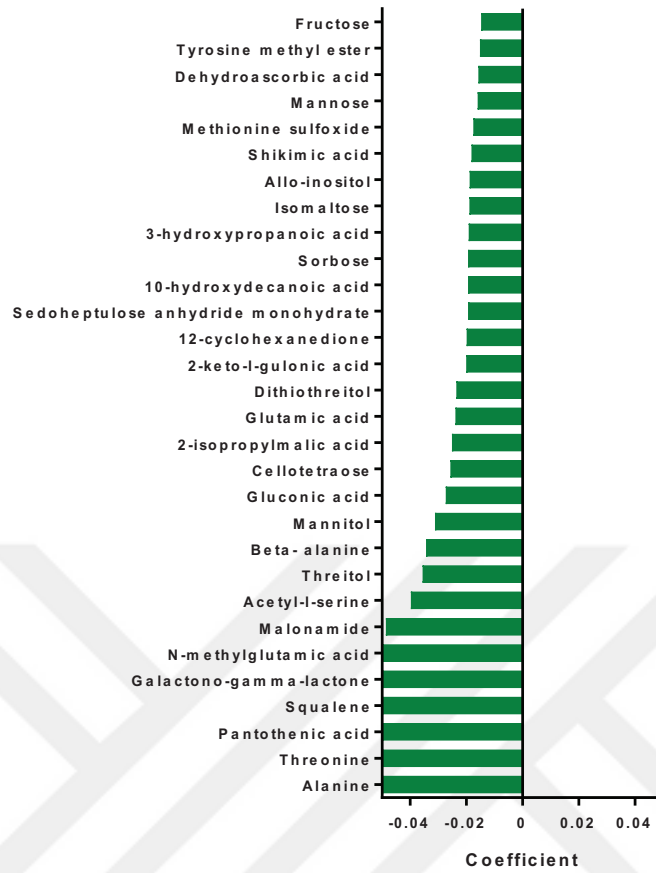


Şekil 4.131 DMPL ve DMPLLPS'in içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0,883 ve Q^2 :0,562). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir



Şekil 4.132 DMPL ve DMPLLPS'in veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu inflamatuvar uyarım varlığında DMPL ekstrasellüler metabolitleri arasında, DMPLLPS'in içerdiği metabolitlere göre Fructose, Tyrosine methyl ester, Dehydroascorbic acid, Mannose, Methionine sulfoxide, Shikimic acid, Allo-inositol, İsomaltose, 3-hydroxypropanoic acid, Sorbose, 10- hydroxydecanoic acid, Sedoheptulose anhydride monohydrate, 12- cyclohexanedione, 2-keto-l-gulonic acid, Dithiothreitol, Glutamic acid, 2- isopropylmalic acid, Cellotetraose, Gluconic acid, Mannitol, Beta-alanine, Threitol, Acetyl-l-serine, Malonamide, N-methylglutamic acid, Galactono-gamma-lactone, Squalene, Pantothenic acid, Threonine, Alanine daha az bulunmuştur (Şekil 4.133).



Şekil 4.133 DMPL ve DMPLLPS ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.

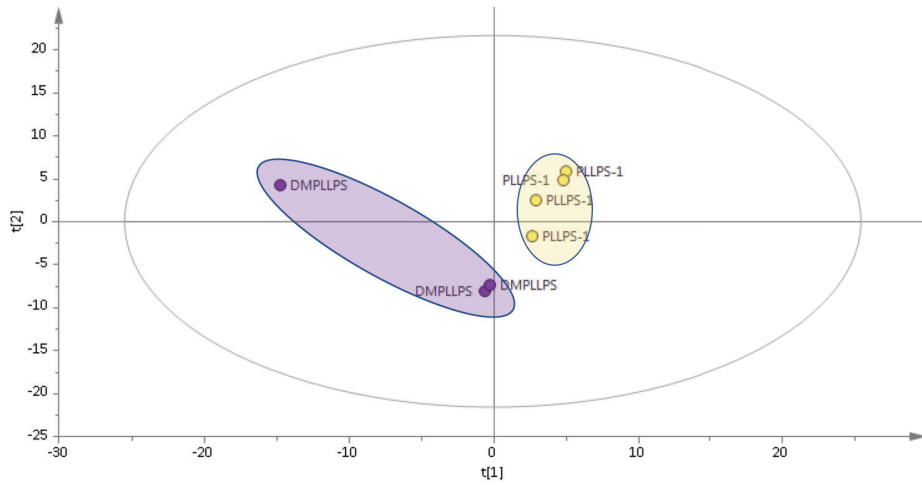
DMPL ve DMPLLPS besiyerlerinin içerdiği metabolitler ttest analizi ile incelendiğinde, sadece iki metabolitin (Lactamide; ttest p: 0,01, Palmitoleic acid; ttest p: 0,02) istatistiksel anlamlı farklı olduğu ve bu metabolitlerin sadece yağ asit biyosentezini anlamlı etkilediği bulunmuştur (Tablo 4.35).

Tablo 4.35 DMPL ve DMPLLPS besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yolak; yağ asit biyosentezi

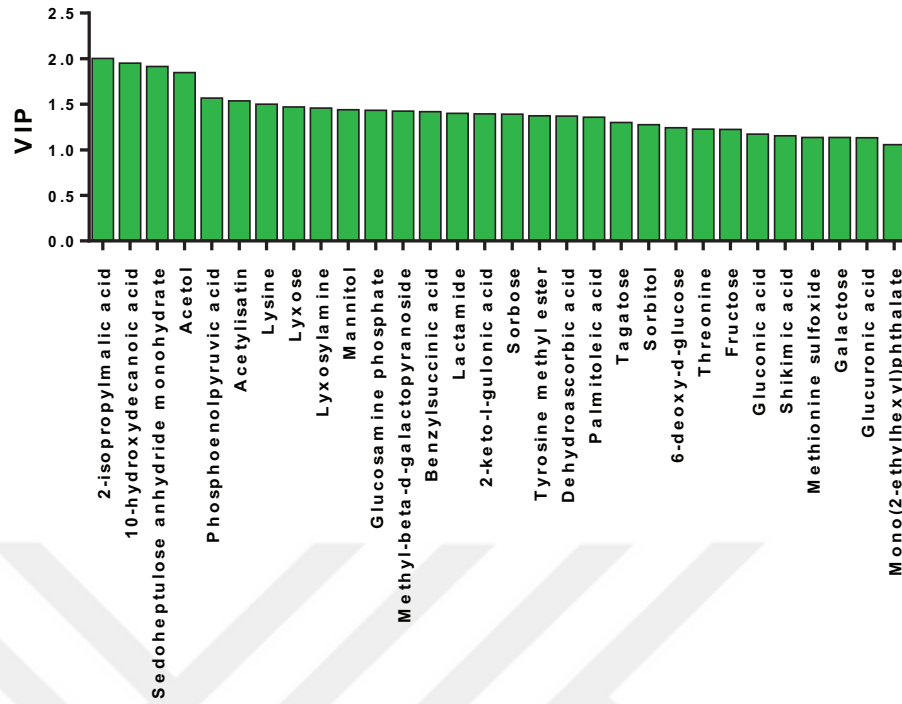
	Toplam metabolit sayısı	Anlamlı bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Fatty acid biosynthesis	49	1	0.02	0.02

4.9.24. İnflamatuvar Uyarım Varlığında PL Eklentisi İle Çoğaltılan P3 MKH'lerin Kültür Süpernatantlarında Salgılanan Metabolitlerin; DMPLLPS İle Karşılaştırması: (DMPLLPS-PLLPS1)

İnflamatuvar uyarım varlığında DMPLLPS ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitler ve DMPLLPS'in içerdiği metabolitlerin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.134 ve 4.135). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.

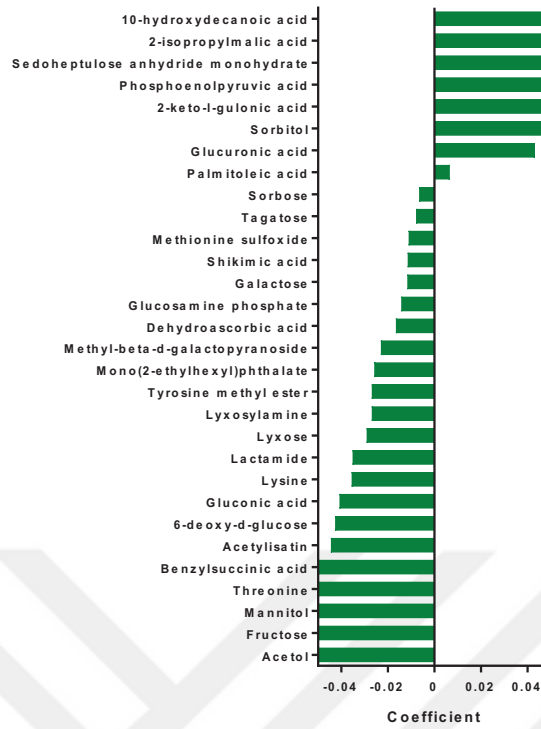


Şekil 4.134 DMPLLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlerin ve DMPLLPS'in içerdiği metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0,959 ve Q^2 :0,853). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.135 DMPLLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMPLLPS'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu inflamatuvar uyarım varlığında DMPLLPS ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitler arasında 10-hydroxydecanoic acid, 2-isopropylmalic acid, Sedoheptulose, Phosphoenolpyruvic acid, 2-keto-l-gulonic acid, Sorbitol, Glucuronic acid, Palmitoleic acid DMPLLPS'in içerdiği metabolitlere göre daha az, Sorbose, Tagatose, Methionine sulfoxide, Shikimic acid, Galactose, Glucosamine phosphate, Dehydroascorbic, Methyl-beta-dgalactopyranoside, Mono (2-ethylhexyl) phthalate, Tyrosine methyl ester, Lyxosylamine, Lactamide, Lysine, Glucuronic acid, 6-deoxy-d-glucose, Acetylisatin, Benzylsuccinic acid, threonine, Mannitol, Fructose, Acetol ise daha fazla miktarda bulunmuştur (Şekil 4.136).

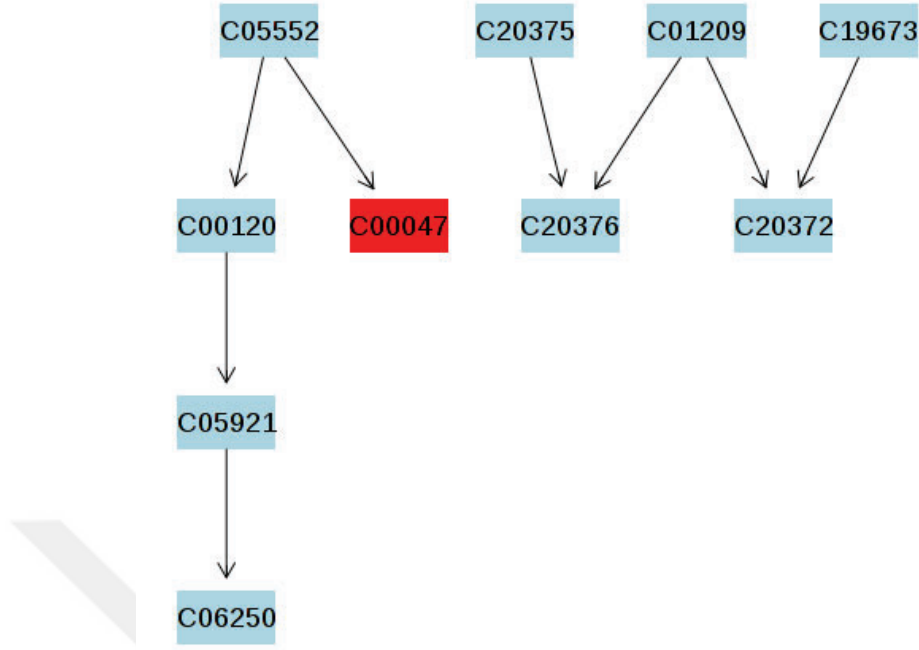


Şekil 4.136 DMPLLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMPLLPS'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği, regresyon analizi.

DMPLLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitler ve DMPLLPS'in içerdiği metabolitler ttest analizi ile incelendiğinde, birkaç metabolitin (2-isopropilmalic acid; ttest p: 0.00, Acetylisatin; ttest p: 0.01, Benzylsuccinic acid; ttest p: 0.01, Lysine; ttest p: 0.01, Acetol; ttest p: 0.02, Mannitol; ttest p: 0.02, Methyl-beta-d-galactopyranoside; ttest p: 0.03, Tyrosine methyl ester; ttest:0.03) istatistiksel anlamlı farklı olduğu ve bu metabolitlerin sadece biyotin metabolizmasını anlamlı etkilediği bulunmuştur (Tablo 4.36, Şekil 4.137)

Tablo 4.36 DMPLLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMPLLPS'in içerdiği metabolitlere bağlı değişen yollar

	Toplam metabolit sayısı	Anlamlı bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Biotin metabolizm	10	1	0.03	0.03

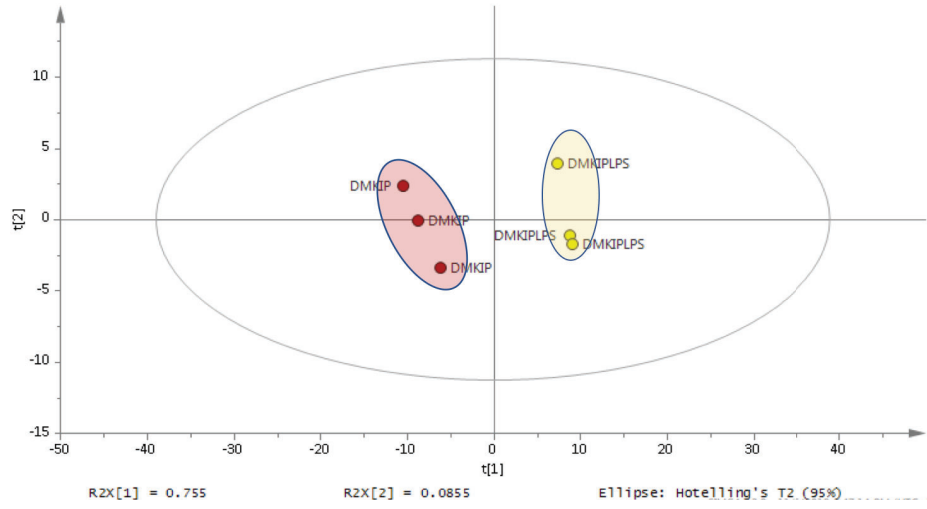


Şekil 4.137 DMPLLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMPLLPS'in içerdiği metabolitlere bağlı anlamlı değişen tek yolak; biyotin metabolizması.

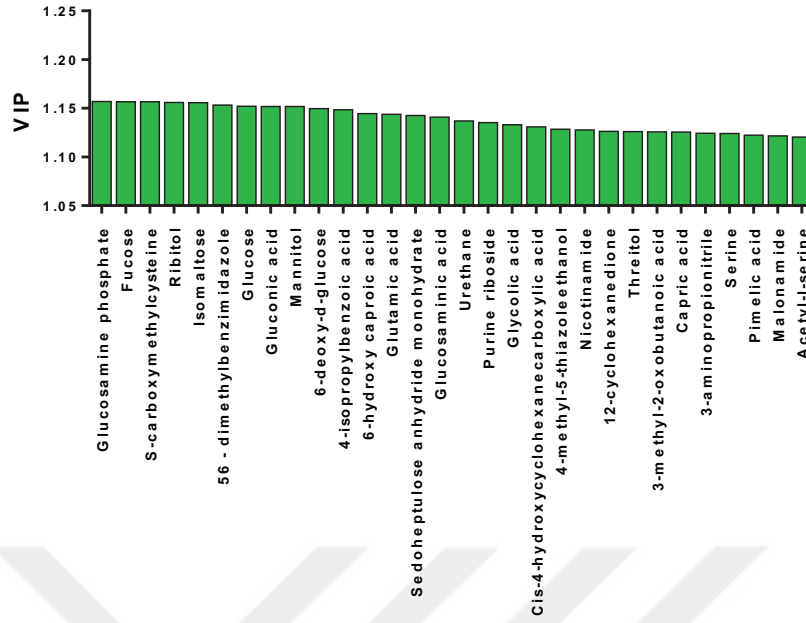
MKH kültüründe kullandığımız DMPL'in inflamatuvar uyarım etkisinde değişen metabolitlerinin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelendiğinde, DMPL ve DMPLLPS arasında anlamlı düzeyde farklılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptanan ekstrasellüler metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda iki besi yeri arasında anlamlı farklılık gösteren tek yolağın; yağ asit biyosentezi olduğu bulunmuştur (Tablo 4.35). DMPLLPS ile çoğaltılan MKH'lerden salgılanan süpernatantların ekstrasellüler metabolitleri ile DMPLLPS'in içerdiği metabolitler arasında anlamlı düzeyde farklılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptananlarla yapılan analizler sonucu, sadece biyotin metabolizmasının anlamlı etkilendiği görülmüştür (Tablo 4.36, Şekil 4.137).

4.9.25. DMKİP ve DMKİPLPS besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yollar: (DMKİP-DMKİPLPS)

MKH kültüründe kullandığımız DMKİP'nin inflamatuvar uyarım etkisinde değişen metabolitlerinin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.138 ve 4.139). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.

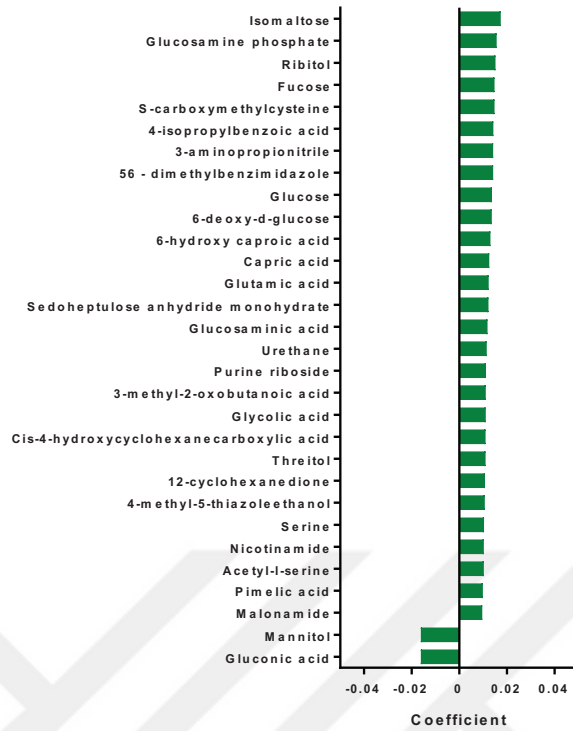


Şekil 4.138 DMKİP ve DMKİPLPS'in içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0,84 ve Q^2 :0,957). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.139 DMKİP ve DMKİPLPS'in veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu DMKİP'nin ekstrasellüler metabolitlerinden İsomaltose, Glucosamine phosphate, Ribitol, Fucose, S-carboxymethylcysteine, 4-isopropylbenzoic acid, 3-aminopropionitrile, 5,6-dimethylbenzimidazole, Glucose, 6-deoxy-D-glucose, 6-hydroxycaproic acid, Capric acid, Glutamic acid, Sedoheptulose anhydride monohydrate, Glucosaminic acid, Urethane, Purine riboside, 3-methyl-2-oxobutanoic acid, Glycolic acid, Cis-4-hydroxycyclohexanecarboxylic acid, Threitol, 12-cyclohexanedione, 4-methyl-5-thiazoleethanol, Serine, Nicotinamide, Acetyl-L-serine, Pimelic acid, Malonamide DMKİPLPS'nin metabolitlerine göre daha fazla iken, Mannitol, Gluconic acid ise daha az bulunmuştur (Şekil 4.140).

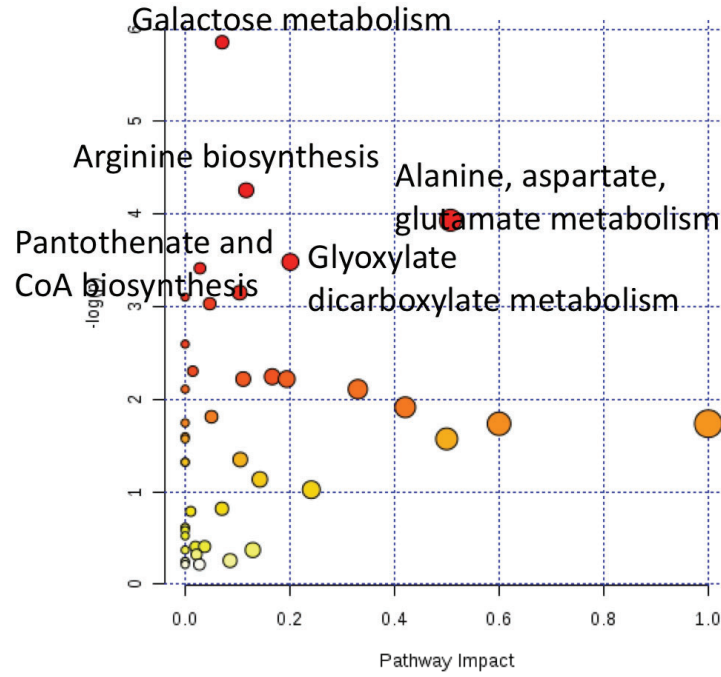


Şekil 4.140 DMKİP ve DMKİPLPS ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.

DMKİP ve DMKİPLPS besiyerlerinin içerdiği metabolitler ttest analizi ile incelendiğinde, istatistiksel anlamlı etkilenen yollar aşağıda verilmiştir (Tablo 4.37, Şekil 4.141)

Tablo 4.37 DMKİP ve DMKİPLPS besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yollar

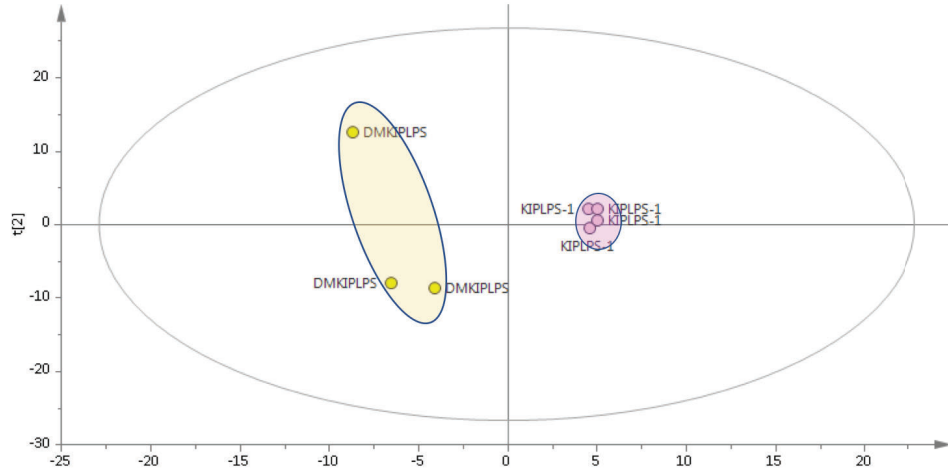
	Toplam metabolit sayısı	Anlamlı bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Galactose metabolism	27	5	1.03	0.00
Arginine biosynthesis	14	3	0.53	0.01
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	28	4	1.07	0.02
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	4	1.22	0.03
Pantothenate and CoA biosynthesis	19	3	0.72	0.03
beta-Alanine metabolism	21	3	0.80	0.04
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	36	4	1.37	0.04
Galactose metabolism	27	5	1.03	0.00



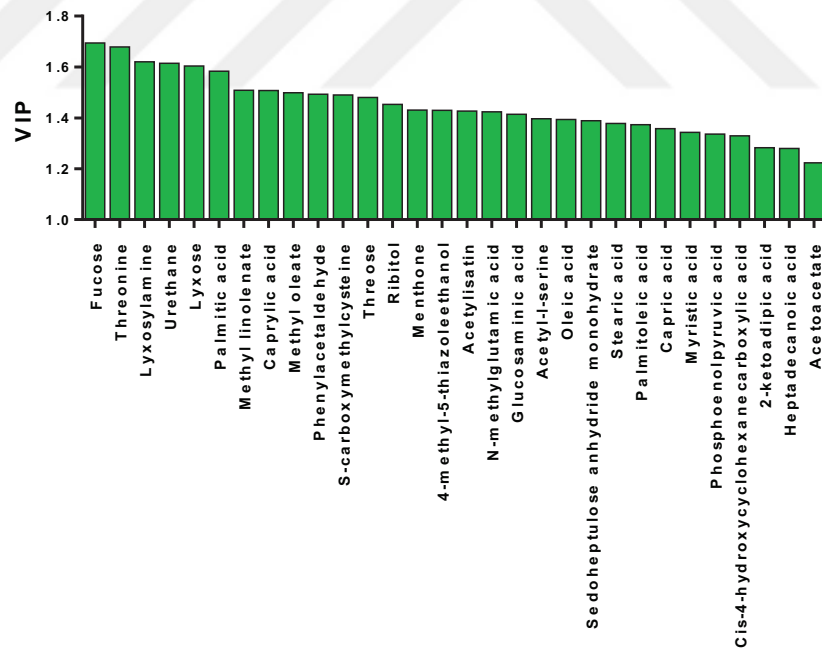
Şekil 4.141 DMKİP ve DMKİPLPS besiyerlerinin anlamlı etkilediği metabolik yollar

4.9.26. İnflamatuvar Uyarım Varlığında KİP Eklentisi İle Çoğaltılan P3 MKH'lerin Kültür Süpernatlarında Salgılanan Metabolitlerin; DMKİPLPS İle Karşılaştırması: (DMKİPLPS-KİPLPS1)

İnflamatuvar uyarım varlığında DMKİPLPS ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatanlarının içerdiği metabolitler ve DMKİPLPS'in içerdiği metabolitlerin metabolomik verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.142 ve 4.143). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R2) ve tahmin edebilme (Q2) değerleri ile gösterilmiştir.

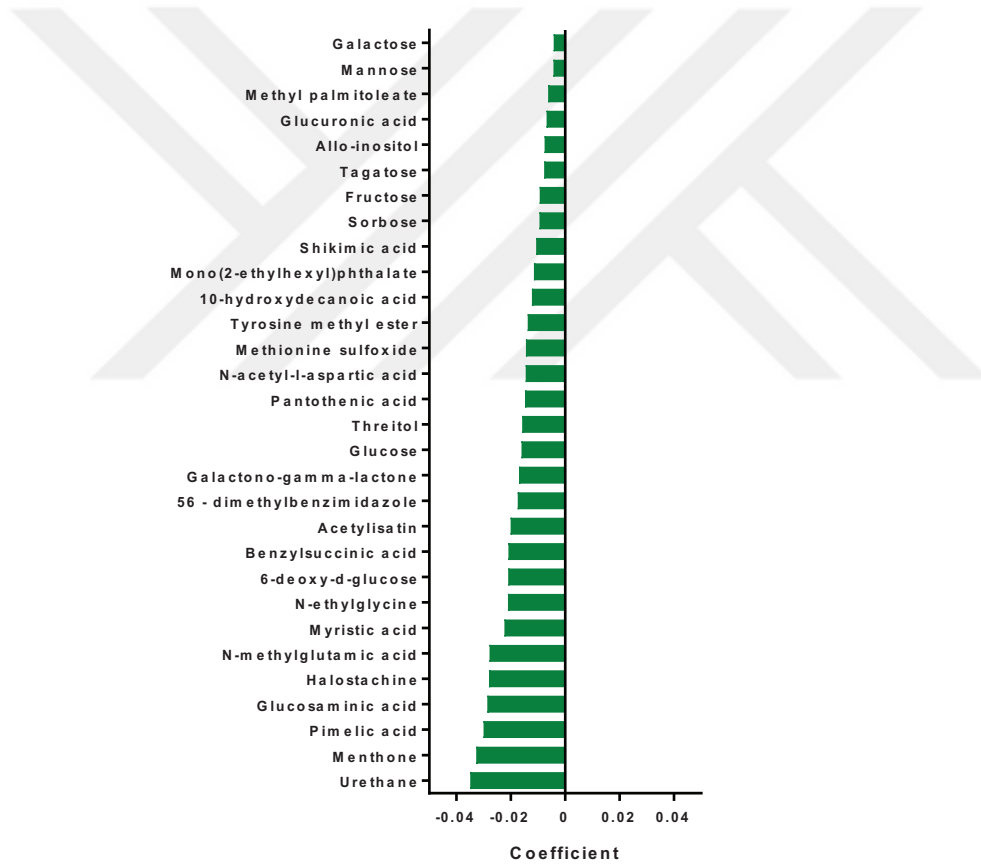


Şekil 4.142 DMKİPLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlerin ve DMKİPLPS'in içerdiği metabolitlerin metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R²: 0,863 ve Q²:0,96). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.143 DMKİPLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMKİPLPS'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu inflamatuvar uyarım varlığında DMKİPLPS ile çoğaltılmış MKH'lerin kùltür süpernatlarının iğerdiği metabolitlerden Galactose, Mannose, Methyl palmitoleate, Glucuronic acid, Allo-inositol, Tagatose, Fructose, Sorbose, Shikimic acid, Mono(2-ethylhexyl)phthalate, 10-hydroxydecanoic acid, Tyrosine methyl ester, Methionine sulfoxide, N-acetyl-l-aspartic acid, Pantothenic acid, Threitol, Glucose, Galactono-gamma-lactone, 56-dimethylbenzimidazole, Acetylisatin, Benzylsuccinic acid, 6-deoxy-d-glucose, N-ethylglycine, Myristic acid, N-methylglutamic acid, Halostachine, Glucosaminic acid, Pimelic acid, Menthone ve Urethane DMKİPLPS'in iğerdiği metabolitlere daha fazla bulunmuştur (şekil 4.144).



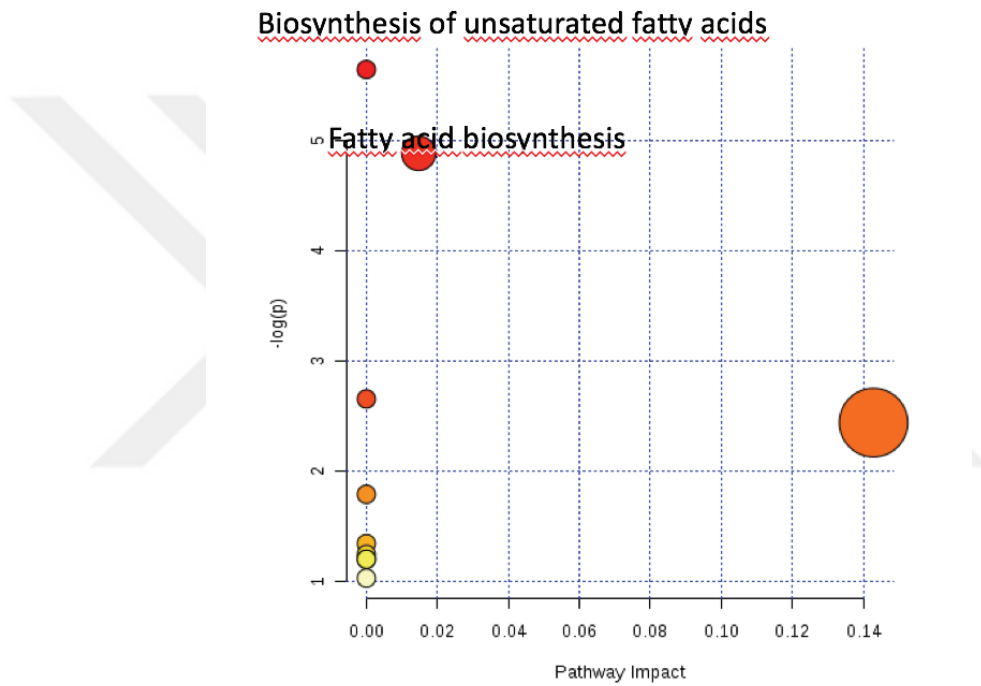
şekil 4.144 DMKİPLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kùltür süpernatlarında salgıladıkları ekstrasellùler metabolitlere ve DMKİPLPS'in iğerdiği metabolitlere ait VIP grafiği, regresyon analizi.

DMKİPLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kùltür süpernatlarında salgıladıkları ekstrasellùler metabolitler ve DMKİPLPS'in iğerdiği metabolitler ttest

analizi ile incelendiğinde, anlamlı değişen yolaklar tabloda verilmiştir (Tablo 4.38, Şekil 4.145)

Tablo 4.38 DMKİPLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMKİPLPS'in içerdiği metabolitlere bağlı değişen yolaklar

	Toplam metabolit sayısı	Anlamlı bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	36	0.33	3	0.00
Fatty acid biosynthesis	47	0.42	3	0.01



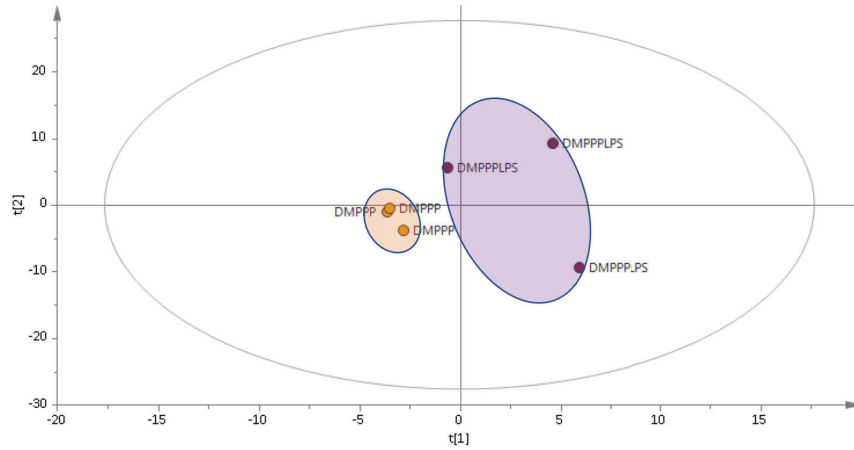
Şekil 4.145 DMKİPLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerden salgılanan metabolitler ve DMKİPLPS'in içerdiği metabolitlere bağlı değişen yolaklar

MKH kültüründe kullandığımız DMKİP'nın inflamatuvar uyarım etkisinde değişen metabolitlerinin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelendiğinde, DMKİP ve DMKİPLPS arasında anlamlı düzeyde farklılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptanan ekstrasellüler metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda iki besi yeri arasında anlamlı farklılık gösteren yolaklar; galaktoz metabolizması, arginin biyosentezi, alanin, aspartat glutamat metabolizması, gliksilat ve dikarboksilat metabolizması, pantotenat ve CoA biyosentezi, beta-alanin metabolizması, ansature

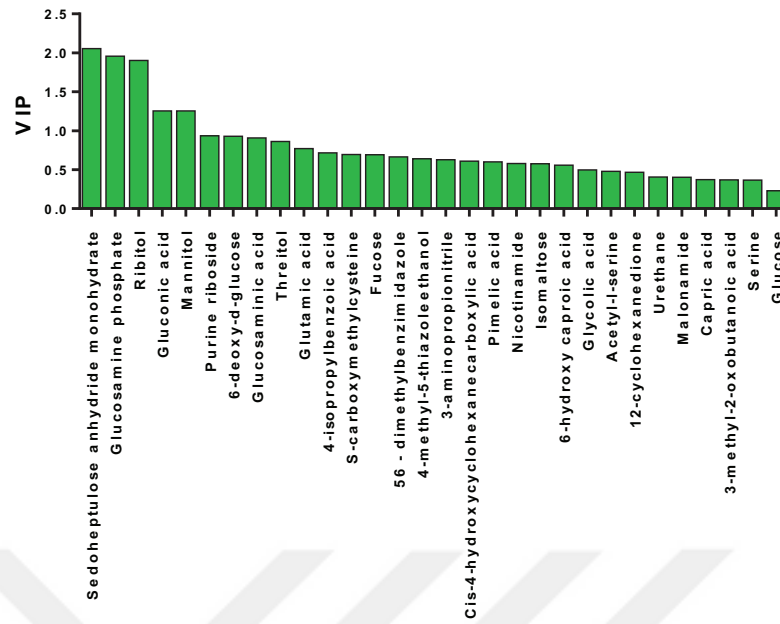
yağ asitleri biyosentezi, galaktoz metabolizmasıdır (Tablo 4.37, Şekil 4.141). DMKİPLPS ile çoğaltılan MKH'lerden salgılanan süpernatantların ekstrasellüler metabolitleri ile DMKİPLPS'in içerdiği metabolitler arasında anlamlı düzeyde farklılık ($p<0.05$) gösterdiği saptananlarla yapılan analizler sonucu, ansature yağ asitleri biyosentezi ile yağ asit biyosentezinin anlamlı farklı olduğu görülmüştür (Tablo 4.38, Şekil 4.145).

4.9.27. DMPPP ve DMPPPLPS Besiyerlerinin Anlamlı Etkilediği Metabolik Yolaklar: (DMPPP-DMPPPLPS)

MKH kültüründe kullandığımız DMPPP'nin inflamatuvar uyarım etkisinde değişen metabolitlerinin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.146 ve 4.147). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.

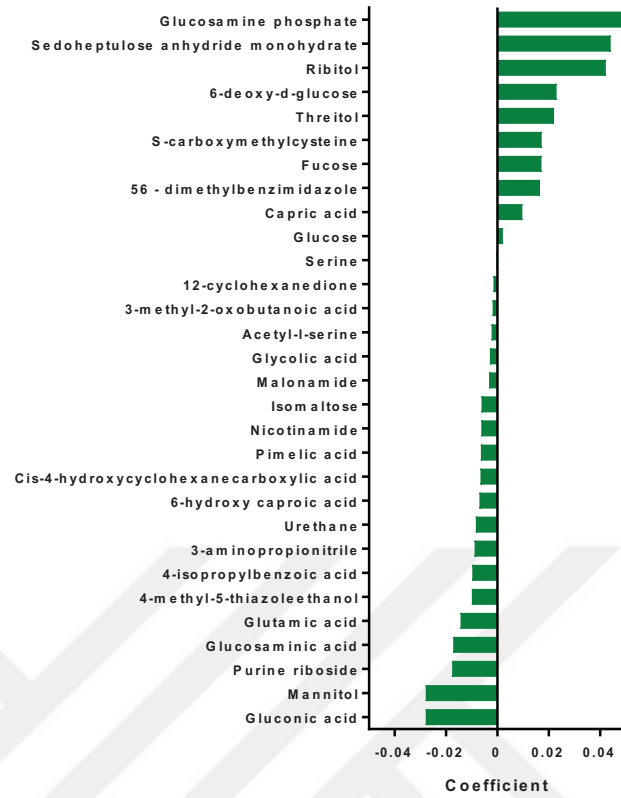


Şekil 4.146 DMPPP ve DMPPPLPS'in içerdikleri metabolitlerin metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0,972 ve Q^2 :0,592). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.147 DMPPP ve DMPPPLPS'in veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu DMPPP ekstrasellüler metabolitlerinden Glucosemine phosphate, Sedoheptulose anhydride monohydrate, Ribitol, 6-deoxy-d-glucose, Threitol, S-carboxymethylcysteine, Fucose, 56-dimethylbenzimidazole, Capric acid, Glucose DMPPPLPS'in metabolitlerine göre daha fazla bulunurken, Serine, 12-cyclohexanedione, 3-methyl-2-oxobutanoic acid, Acetyl-l-serine, Glycolic acid, Malonamide, Isomaltose, Nicotinamide, Pimelic acid, Cis-4-hydroxycyclohexanecarboxylic acid, 6-hydroxy caproic acid, Urethane, 3-aminopropionitrile, 4-isopropylbenzoic acid, 4-methyl-5-thiazoleethanol, Glutamic acid, Glucosaminic acid, Purine riboside, Mannitol, Gluconic acid daha az bulunmuştur (Şekil 4.148).

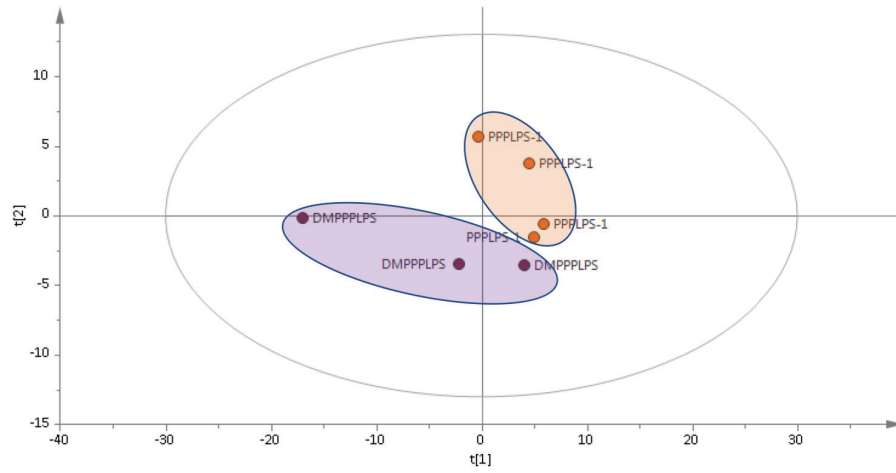


Şekil 4.148 DMPPP ve DMPPPLPS ekstrasellüler metabolitlerine ait VIP grafiği, regresyon analizi.

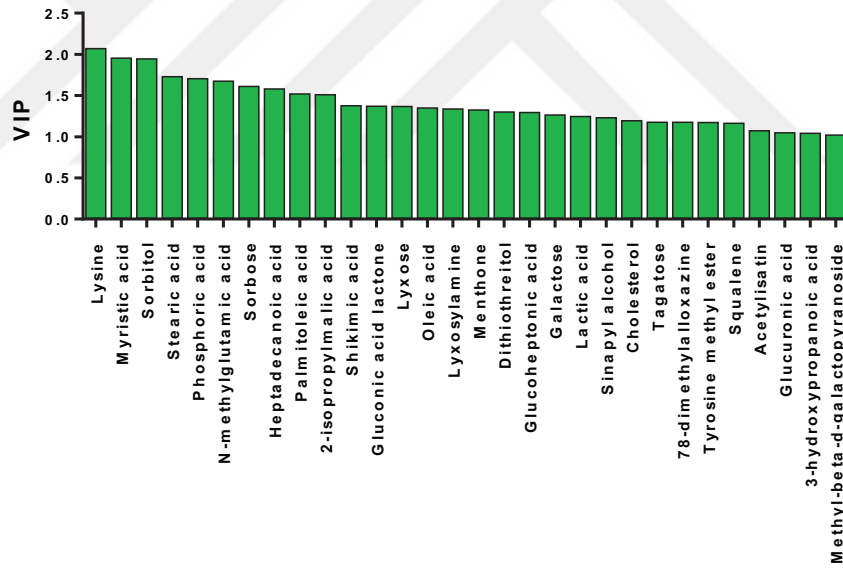
Elde ettiğimiz sonuçlarda DMPPP ve DMPPPLPS arasında istatistiksel anlamlı değişen/farklı olan metabolit bulunmadığından, anlamlı etkilenen yolak da bulunmamaktadır.

4.9.28. İnflamatuvar Uyarım Varlığında PPP Eklentisi Ile Çoğaltılan P3 MKH'lerin Kültür Süpernatanlarında Salgılanan Metabolitlerin; DMPPPLPS ile Karşılaştırması: (DMPPPLPS-PPPLPS1)

İnflamatuvar uyarım varlığında DMPPPLPS ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatanlarının içerdiği metabolitler ve DMPPPLPS'in içerdiği metabolitlerin metabolomik verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PLS-DA analizlerinde farklılık gösteren metabolitlerin belirlenmesi için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.149 ve 4.150). Elde edilen PLS-DA modelin güvenilirliği hesaplanan (R²) ve tahmin edebilme (Q²) değerleri ile gösterilmiştir.



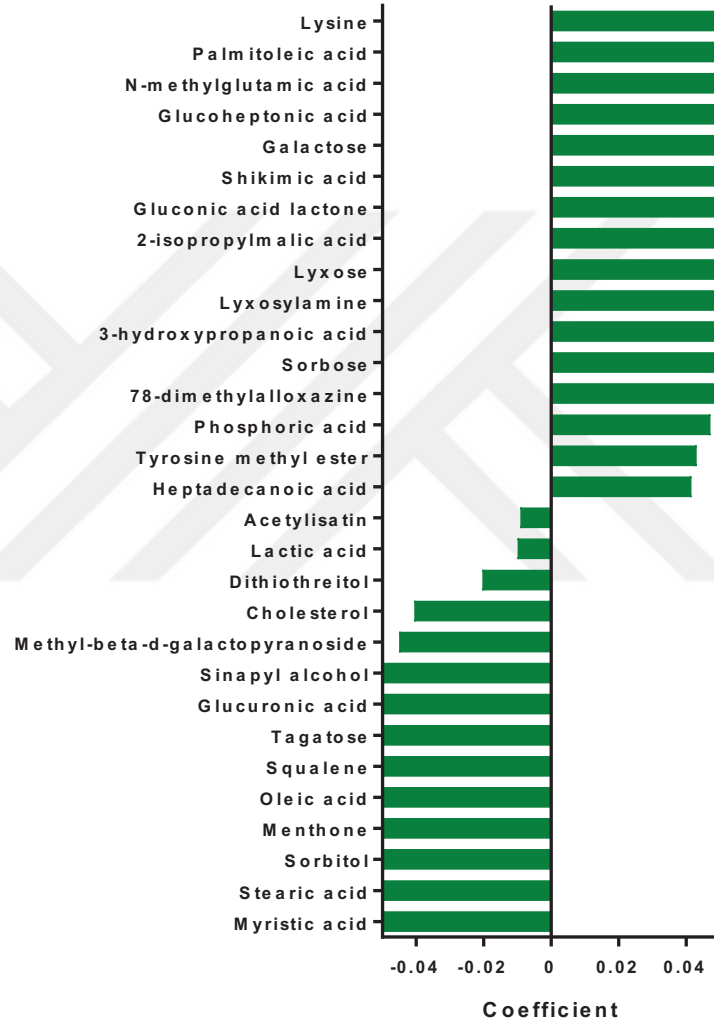
Şekil 4.149 DMPPPLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlerin ve DMPPPLPS'in içerdiği metabolitlerin metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi, PLS-DA skor grafiği (R2: 0,948 ve Q2:0,585). İki grup birbirinden ayrı görünüm vermektedir.



Şekil 4.150 DMPPPLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMPPPLPS'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği

VIP grafiği regresyon analizi sonucu inflamatuvar uyarım varlığında DMPPPLPS ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarında DMPPPLPS'in içerdiği metabolitlere göre Lysine, Palmitoleic acid, N-methylglutamic acid, Glucosaminic acid, Galactose, Shikimic acid, Gluconic acid lactone, 2-isopropylmalic acid,

Lyxosylamine, 3-hydroxypropanoic acid, Sorbose, 78-dimethylalloxazine, Phosphoric acid, Tyrosine methyl ester, Heptadecanoic acid daha az, Acetylisatin, Lactic acid, Dithiothreitol, Cholesterol, Methyl-beta-d-galactopyranoside, Sinapyl alcohol, Glucuronic acid, Tagatose, Squalene, Oleic acid, Menthone, Stearic acid ve Myristic acid ise daha fazla bulunmuştur (Şekil 4.151).



Şekil 4.151 DMPPPLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitlere ve DMPPPLPS'in içerdiği metabolitlere ait VIP grafiği, regresyon analizi.

DMPPPLPS besiyeri ile çoğaltılan P3 MKH'lerin kültür süpernatantlarında salgıladıkları ekstrasellüler metabolitler ve DMPPPLPS'in içerdiği metabolitler ttest analizi ile incelendiğinde, anlamlı değişim gösteren az sayıdaki (Oleic acid; ttest p:

0,03, Gluconic acid lactone; ttest p: 0,04, Lyxose; ttest p: 0,04, Lyxosylamine; ttest p: 0,04, Shikimic acid; ttest p: 0,04) metabolitlerin, anlamlı etkilediği yolak bulunmamaktadır.



5. TARTIŞMA

Rejeneratif tıbbın önemli hücresel elemanlarından olan MKH'lerin klinik amaçlı kullanımı için laboratuvar ortamında çoğaltılmaları gerekmekte (1), bunun için de kültür ortamına amino asit, vitamin, glikoz, inorganik tuzlar gibi temel maddeler yanında, büyüme faktörlerinin eklenmesi gerekmektedir. Hücre kültürlerinde büyüme faktörleri kaynağı olarak en sık kullanılan eklenti FBS'dir (2). Mezenkimal kök hücrelerin etkin çoğaltılması için de özel seçilmiş FBS lotları kullanımının önemi vurgulanmaktadır. Serum içermeyen ortamda hücre geliştirmek amacıyla hücre tipine uygun olarak farklı büyüme faktörü-solubl faktör kombinasyonları kullanılsa da optimal protokollerin geliştirilmesinde zorluk yaşanmaktadır (144). Bu nedenle hem araştırma hem de klinik amaçlı kullanımda halen en çok kullanılan eklentiler serum/plazma kaynaklı ürünlerdir. Klinik amaçlı kullanılacak hücrelerin geliştirilmesi için hayvansal ürün içermeyen serum eklentileri veya benzerlerini içeren kültür besiyerleri kullanımına yönelik ilgi her geçen gün artmaktadır. Çalışmamızda MKH üretim ortamında serum/plazma kaynağı olarak insan kaynaklı serum faktörlerinden PL 'ın etkileri FBS ile karşılaştırmalı araştırılmış, ayrıca plateletlerden kaynaklanan etki hakkında fikir edinmek için PPP, diğer taraftan kemik iliği ortamının etkisini değerlendirmek amacıyla da KİP kullanılmıştır. Diğer taraftan, MKH'lerin klinikte en sık kullanıldığı durum olan inflamatuvar hastalık/bozukluklarda MKH üretiminde kullanılacak serum/plazma eklentilerinin hücrelerin biyolojik ve metabolik özelliklerine etkisini araştırmak üzere, MKH'ler LPS varlığında inflamatuvar ortama maruz bırakılmış ve farklı eklentilerin etkisi araştırılmıştır. Mezenkimal kök hücre üretiminde etkinliğinin artırılması için son yıllarda kişiye özel üretimin ve rejeneratif veya immünomodulasyon amaçlı kullanılacak hücrelerin kullanım öncesi özel kültür koşullarında uyarılmasının önemi gösterilmiştir. Bu konuda en fazla deneyim MKH'lerin IFN- γ ile koşullandırıldıktan sonra verilmesidir. Böylelikle, in-vitro inflamatuvar ortama maruz bırakılan MKH'lerin inflamasyonu baskılayıcı özelliklerinin ortaya çıktığı gösterilmiştir (11). Bu çalışmada farklı serum/plazma eklentileri içeren

besiyerlerinde üretilerek bir bakıma farklı koşullandırılmış olan MKH'lerin ayrıca inflamatuvar ortama da maruz bırakılması amacıyla LPS'li ortamda da metabolik özellikleri incelenmiştir.

Biyolojik bir olayın bir oluşturduğu kantitatif metabolomik değişiklikleri ortaya çıkarmak için, farklı numunelerde bulunan ayrı ayrı metabolitlerin gerçek derişim farklılıklarının incelenebilmesi için doğru ve kesin bir ölçüm yapabilen analitik bir araç kullanmak çok önemlidir. Metabolomik analizlerinde yer alan basamakların (numune toplama biçimi ve saklanması, numune analizi ve veri analizi) her biri kantitatif sonuçları önemli ölçüde etkileyebilir ve bu nedenle büyük bir özenle yapılmalıdır. Bunlar arasında, toplam numune miktarı veya metabolitlerin derişimleri, bir numuneden diğerine önemli ölçüde farklı olabilir. Bu nedenle, toplam numune miktarı derişiminin, bireysel metabolitlerin miktar tayini üzerindeki etkisinin azaltılması veya yok edilmesi kritik öneme sahiptir (229). Büyük ölçekli hedeflenmemiş metabolomik analizlerde yaşanan bu varyasyonlar farklı normalizasyon teknikleri ile ortadan kaldırılabılır. Hedeflenmiş metabolomik analizlerde, analiz öncesinde hedeflenmiş metabolitlerin izotopları eklenerek iyon seçici konumda analizleri gerçekleştirilirken, hedeflenmemiş metabolomik analizlerde ise analizler tarama konumunda gerçekleştirilir. Hedeflenmemiş metabolomiklerde istatistiksel anlamlılık için p değeri en belirgin yerleşik ölçüdür. Ancak yeterliliği tartışılmakta, belirsizliği ve örneklem ve istatistiksel güce bağımlılığı nedeniyle, eleştiri konusu olabilmektedir. Tipik olarak grup başına 5-10 numune ile yapılan hedeflenmemiş metabolomiklerin araştırıldığı model sistemlerde kat derişimi verilerinden yararlanılması önerilmektedir. Mezenkimal kök hücre kültüründe özellikle küçük örneklem büyüklüğündeki çalışmalar için, metabolit yoğunluklarının deneysel standart sapmalarının kullanıldığı ve kat derişiminin nicel bir değer olarak değerlendirildiği istatistiksel yaklaşım kullanılmaktadır (230). Analiz sonucunda yüklediğimiz veri setinde 479 metabolit anlamlı derişmiş, intrasellüler 242 metabolit tanımlanmıştır.

Çalışmamızda intrasellüler metabolitlerinin yanısıra ekstrasellüler metabolitler de incelenmiştir. Serum/plazma eklentili besiyerlerinin MKH eklenmeden önce ve sonra (kültür süpernatant/conditioned medium) yapılan metabolit analizleri MKH'lerin maruz kaldıkları ortama bağlı olarak kullandıkları veya salgıladıkları ekstrasellüler metabolitler hakkında fikir vermekte ve mikroçevre değişikliklerini yansıtmaktadır. Besiyeri eklentileri, eklentilerin kültür besiyerlerine eklenmesi sonucu hücrelerin çoğaltılması için kullanılan tam besiyerleri ve hücre kültürleri süpernatantları ayrı ayrı analiz edilmiş, 605 ekstrasellüler metabolit saptanmış, bunların 116'sı tanımlanmıştır.

FBS ve PL varlığında çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolitlerinin, anlamlı düzeyde farklılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptanan metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda (Tablo 4.14 ve Şekil 4.22, 4.23) en anlamlı değişiklik valin, lösin ve izolösin biyosentezinde görülmüştür. Bu yolakta toplam metabolit sayısı 27 olup, FBS ve PL arasında anlamlı farklı bulunan metabolit sayısı 7'dir. Bu yolaktaki en kilit noktadaki metabolit pirüvik asittir. Pirüvik asit glikozun glikoliz ile yıkımı sonucu elde edilen son üründür.

Glikolitik mekanizmanın kök hücre fonksiyonel özelliklerine etkileri son yıllarda çok vurgulanmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda aerobik glikolizin MKH'lerin immünosupresif özelliklerini ortaya çıkardığı gösterilmiştir ve bu özelliklerin de rejeneratif amaçlı kullanım için önemli avantaj olduğu vurgulanmaktadır (231). Bu tez çalışmasında, pirüvik asit (M213) ve öncüsü fosfoenolpirüvik asit (M204), FBS'ye göre PL içeren besiyerinde çoğaltılan MKH'lerde daha yüksek bulunmuş (tablo 4.6, sırasıyla 0.78 ± 0.07 , 1.3 ± 0.14 ve 0.2 ± 0.02 , 2.25 ± 0.1), FBS-PL grupları arası istatistik analizlerinde p değerleri anlamlı farklı (tablo 4.7, $p=0.01$, $p=0.0$) bulunmuştur. Ekstrasellüler metabolitler incelendiğinde ise kültür besiyerlerinde fosfoenolpirüvik asit (PEP) (ESM94) seviyeleri FBS içeren besiyerinde yüksek iken (4.25 ± 0.71), PL, KİP ve PPP içeren besiyerlerinde çok düşük (sırasıyla, 0.14 ± 0.01 , 0.25 ± 0.03 , 0.06 ± 0.01) bulunmuştur. MKH'ler eklendikten sonra toplanan süpernatantlarda ise FBS varlığında PEP seviyesinin çok düştüğü (0.3 ± 0.03), PL

varlığında çoğaltılan MKH'lerin supernatanlarında da azalma olduğu (0.03 ± 0) görülmüştür. Bu durum, FBS varlığında çoğaltılan MKH'ler tarafından pirüvik asit öncüsü olan PEP'in çok kullanıldığını göstermektedir. Buna karşın MKH'lerde pirüvik asitin FBS<PL olması nedeniyle, FBS içeren ortamda PEP'den pirüvik asit sentezi/glikoliz dışında glukoneogenez ve biyosentez yollarına (örneğin serin biyosentez) geçiş olduğunu düşündürmüştür. Bunu destekleyen bir bulgu da FBS içeren ortamda glukoz (ESM49) seviyesi PL>FBS iken, hücrelerde (MKH) FBS içeren ortamda glukoneogenezle uyumlu olacak şekilde glukoz (M112) seviyesinin artmış olmasıdır (FBS>PL, $p:0.00$). Diğer taraftan FBS içeren ortamda PEP'den serin sentezi olduğunu destekleyen bir bulgu da, serin (ESM102) seviyesinin FBS içeren ortamda gelişen MKH'lerde PL'ye nazaran daha yüksek bulunmuş olmasıdır. L-serin genellikle nutrisyonel olarak nonesansiyel bir amino asit olarak kabul edilse de metabolik olarak birçok hücre fonksiyonunda vazgeçilemez role sahiptir (232).

Bu bulgular FBS içeren ortamda PEP'den glikoliz ile pirüvik asit sentezi yanında glukoneogenez ve biyosentez yollarına geçiş olduğunu düşündürmüştür. PEP'den glukoneogeneze yönelmeyi destekleyen bir bulgu, başlangıçta glukoz oranı daha düşük olan FBS içeren ortamda, MKH'lerin eklenmesi sonrası glukoz oranının yüksek bulunmasıdır. Platelet lizat içeren besiyerinde ise PEP seviyesi başlangıçta FBS'li ortama göre çok düşük iken, MKH'lerde PL>FBS saptanmış, ayrıca pirüvik asit seviyesi de PLMKH>FBSMKH saptanmıştır. Bu bulgular PL içeren ortamda MKH'lerde pirüvik asit sentezinin arttığına, dolayısıyla glikolitik yolağın daha aktif olduğuna işaret etmektedir.

Piruvatın endojen bir antiinflamatuar ve antioksidan bir molekül olduğu ileri sürülmektedir (233). Bu durum, PL eklentisinin hücreleri glikolize yönlendirerek hücrelerin immüsupresif özelliğini ortaya çıkararak klinik uygulamalarda hücrelerin reddini önlemek açısından avantaj sağlayabileceğini düşündürmüştür. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda etil piruvatın organ hasarlarından korunmada önemli olduğu (234), bu molekülün bir inflamazom inhibitörü olup mitokondri bütünlüğünü koruduğu rapor edilmiştir (235). Sistemik lupus eritematozis hastalarına

ait MKH'lerle yapılan bir çalışmada, inflamatuvar ortamda senesens belirtileri gösteren ve HGMB1 (high mobility group box 1) ile senesens belirtilerinde artma olan MKH'lerin etil piruvata maruz kalması sonrası senesens belirtilerinde düzelme olduğu gösterilmiştir (236). Bu bulgular da FBS ye göre PL ile çoğaltılan ve daha yüksek piruvat düzeylerine sahip MKH'lerin avantajlı olabileceğini akla getirmiştir.

Valin, lösin ve izolösin biyosentezinde değişen diğer metabolitler, castanospermine, alpha-Ketobutyric acid, L-valine, L-isoleucine, 2-Oxoisocaproate'tır. Hücrelerde valin ve izolösin düzeyleri FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde, PL varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla; p: 0.03, 0.01). Ekstraselüler ortamda ise bu aminoasitler tanımlanmamıştır. Hangi amino asitlerin MKH'ler tarafından tüketildiği veya salgılandığının araştırıldığı bir çalışmada kültürde MKH'ler tarafından 8 esansiyel (histidin, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin ve valin) ve 6 esansiyel olmayan amino asitin (arginin, asparagin, aspartat, glutamin, serin ve tirozin) tüketildiği, glutamin'in en çok tüketilen amino asit olduğu, MKH'ler tarafından alanin, glisin, glutamat ve ornitin salgılanmasının, ortamda sağlanan yüksek amino asit konsantrasyonlarına bağlı olabilen güçlü bir taşma metabolizması sonucu olduğu ileri sürülmüştür (237). Çalışmamızda ise alanin seviyesinin FBS içeren ortamda PL ve diğerlerine kıyasla çok yüksek olup MKH eklenince çok azalması bildirilen çalışmanın aksine FBS içeren ortamda alaninin salgılanmayıp aksine tüketildiğini göstermiştir. Diğer taraftan glutamik asit tüketimi FBS ortamında fazla değilken PL içeren ortamda daha fazla tüketildiği gözlenmiştir. Omurgalılar için diyetin diğer bileşenlerinden sentezlenemeyen esansiyel amino asitler; histidin, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, triptofan, treonin ve valindir. Esansiyel olmayan amino asitler ise, 2008'de Alberts tarafından alanin, arginin, asparagin, aspartat, sistein, glutamat, glutamin, glisin, ornitin, prolin, serin ve tirozin olarak belirlenmiştir (238). Hücredeki amino asit metabolizması ile ilgili olarak, izolösin, lösin, serin ve valinin Krebs döngüsünün türevlerine dönüştürülmesinin mümkün olduğu, bunların enerji üretimine dolaylı katkı olduğu ve protein biyosentezi ile doğrudan ilişkili oldukları gösterilmiştir. Ek olarak, arginin ve histidin enerji üretimi için glutamata dönüştürülebilir. Lösin,

metiyonin ve treoninin de hücre ve doku gelişimi için hayati öneme sahip olduğu ve tüketim miktarlarının MKH'lerin takip ettiği farklılaşma soyuna bağlı olabileceği gösterilmiştir. Sonuç olarak, bu 14 amino asidin MKH'ler tarafından tüketimi sadece MKH'lerin proliferasyonu için değil, aynı zamanda farklılaşmaları için de gereklidir (237). Çalışmamızda, metiyonin ve treonin düzeyleri FBS içeren ortamda PL'ye göre daha yüksek bulunmuş, hücrelerin eklenmesiyle supernatanlarda azalma olması bu amino asitlerin MKH'ler tarafından tüketildiğini düşündürmüştür. MKH'lerde de bu amino asit seviyeleri PL-MKH'lere göre de daha yüksek saptanmıştır.

FBS ve PL MKH'ler arasında anlamlı değişiklik gösteren diğer yollar sitrat (TCA) döngüsü, sistein ve metionin metabolizması, aminoasıl tRNA biyosentezi, fenilalanin metabolizması, glisin, serin, treonin metabolizması, alanin, aspartat glutamat metabolizması, pantotenat ve CoA biyosentezi, glioksilat ve dikarboksilat metabolizması, sfingolipid metabolizması, tirozin metabolizması, glikoliz ve glikoneogenezis, propanoat metabolizmasıdır.

Krebs (sitrat; TCA) döngüsünde anlamlı değiştiği görülen metabolitler; piruvat, fosfoenolpiruvik asit, sitrat, fumarat, suksinik asit, izositrat (Şekil 2.9). Sitrat (M94), fumarat (M108), suksinik asit (M228) ve izositrat (M135) analizlerimiz sonucu ekstraselüler metabolitler arasında tanımlananlar arasında bulunmayıp, MKH'lerde saptanmışlardır. Döngünün ilk reaksiyonlarında oluşan sitrik asit (p:0.01) ve izositrat (p:0.02) PL varlığında çoğaltılan MKH'lerde daha fazla bulunurken, döngünün geç oluşan metabolitleri fumarat (p:0.00) ve suksinik asit (p:0.00) FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde daha fazla saptanmıştır. Trombosit konsantrlerinde antikoagulan olarak bulunan sitrat, PL varlığında çoğaltılan MKH'lerde daha fazla bulursa da, döngü ilerledikçe ortaya çıkan metabolitler FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde daha fazla saptanmıştır. Benzer şekilde malat (M161) da FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde daha fazla saptanmıştır (p:0.00). Bu da krebs döngüsünün FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde daha aktif olduğunu düşündürmektedir.

Sistein ve metionin metabolizmasında 2-Oxobutanoate, methionine, L-Serine, piruvat, glutatyon, L-alanin, 5'-Methylthioadenosine etkilenmektedir. 2-

Oxobutanoate bir ketoasittir. Birçok amino asit (glycine, methionine, valine, leucine, serine, threonine, isoleucine) ve propanoate metabolizmasında rol oynar. 3-methyl-2-oxobutanoic acid (ESM10) DMFBS besiyerinde DMPL besiyerine göre daha fazla saptanmış (p:0.06), her iki ortamda da MKH'lerin medyum supernatanlarında oldukça azalmış, yani kullanılmıştır. 2-okso monokarboksilik asit, 2-oksobutanoik asitin konjugat bazıdır ve propanoil-CoA'nın öncülüdür. Propionil CoA, dallı zincirli amino asit yıkımı, tek sayılı yağ asidi yıkımı, kolesterol yıkımı gibi mitokondride oluşan çeşitli metabolik yolların bir yan ürünüdür. Metabolom analizlerimizde saptanmamıştır. Methionine (M164) FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde daha fazla saptanan bir intrasellüler metabolittir (p:0.02). Methionine sulfoxide de (ESM72) DMFBS besiyerinde DMPL besiyerine göre daha fazla saptanmıştır (p:0.02). Yine methionine sulfoxide FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerin medyum supernatanlarında, PL varlığında çoğaltılan MKH'lerin medyum supernatanlarına göre de daha fazla saptanmıştır (p:0.00). Serine (M220) FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde (p:0.01) ve ekstrasellüler serin (ESM 102) DMFBS besiyerinde (p:0.07) ve FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerin medyum supernatanlarında (p:0.00), PL gruplarına göre daha fazla saptanmıştır. Glutatyon (M116) sadece intrasellüler olarak tespit edilmiştir. FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde PL varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuştur (p:0.00). L-alanin (M76) FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde PL varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuştur (p:0.00). Ekstrasellüler alanin (ESM23) DMFBS besiyerinde (p:0.06) ve FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerin medyum supernatanlarında (p:0.76), PL gruplarına göre daha fazla saptanmıştır. 5'-Methylthioadenosine (M67) ekstrasellüler metabolitler arasında saptanmamış, FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde PL varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuştur (p:0.00). 5'-Metiltioadenosin, tüm memeli dokularında doğal olarak oluşan kükürt içeren bir nükleosiddir. Metiyonin ve pürin kurtarma yollarında 5'-Metiltioadenosin fosforilaz ile metabolize edilerek 5-metiltioriboz-1-fosfat ve adenin oluşturur. Gen ekspresyonu, proliferasyon, farklılaşma ve apoptozunun düzenlenmesi dahil olmak üzere hücrenin çok sayıda kritik yanıtını etkilediği gösterilmiştir (239). Birçok çalışma, 5'-Metiltioadenosin'in tümör dokusunun

enflamatuar mikro-ortamlarını kontrol ederken tümör hücresi proliferasyonunu, invazyonunu ve apoptozun indüksiyonunu inhibe ederek tümörleri baskıladığını göstermektedir. Kimyasal olarak indüklenmiş bir hepatokarsinogenez sıçan modelinde, hem endojen hem de ekzojen 5'-Metiltioadenosin düzeylerinin preneoplastik karaciğer lezyonları ve DNA sentezi ile negatif korelasyonlu olduğu bulunmuştur. 5'-Metiltioadenosin'in inhibe edici etkileri, poliamin sentezinin anahtar bir enzimi olan ornitin dekarboksilaz aktivitesinin belirgin bir inhibisyonu ile ilişkilidir (240). Görüldüğü gibi MKH kültüründe PL varlığında FBS kullanımına göre amino asit metabolizması (dallı zincirli aminoasitler; valin, lösin ve izolösin biyosentezi, kükürtlü aminoasit yapısındaki sistein ve metionin metabolizması, aromatik aminoasitlerden fenilalanin metabolizması, basit yapılı glisin ve hidroksilli aminoasitler serin ve treonin metabolizması, amin türevi alanin, aspartat glutamat metabolizması, aromatik aminoasit tirozin metabolizması), Krebs döngüsünün ara bileşenleri (glioksilat ve dikarboksilat metabolizması), nükleik asit (aminoasit tRNA biyosentezi, pantotenat ve CoA biyosentezi), karbohidrat (glikoliz ve glikoneogenezis) ve lipit (sfingolipid metabolizması, propanoat metabolizması) metabolizmalarının etkilendiği tespit edilmiştir.

Fenilalanin (M196) ekstrasellüler metabolitler arasında saptanmamış, FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde PL varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuştur (p:0.00). Treonin (M233) FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde PL varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuştur (p:0.00). Ekstrasellüler metabolitler arasında treonin (ESM112) DMFBS besiyerinde DMPL besiyerine göre daha fazla saptanmıştır (p:0.13). FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerin medyum supernatanlarında, PL varlığında çoğaltılan MKH'lerin medyum supernatanlarına göre de daha fazla saptanmıştır (p:0.06). Aspartik asit (M84) FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde PL varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuştur (p:0.05). Ekstrasellüler metabolitler arasında aspartik asit (ESM26) DMPL besiyerinde DMFBS besiyerine göre daha fazla saptanmıştır (p:0.47). FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerin medyum supernatanlarında, PL varlığında çoğaltılan MKH'lerin medyum supernatanlarına göre daha fazla saptanmıştır (p:0.02). DMPL besiyerinde daha fazla

olmasına karşın FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerin medyum supernatanlarında daha fazla bulunması, aspartik asitin PL-MKH'lerde daha fazla kullanıldığını düşündürmüştür

Propanoat metabolizması üyelerinden propionik asit homologu olan 3-(2-hydroxyphenyl) propanoic acid (M44) PL varlığında çoğaltılan MKH'lerde FBS varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuştur (p: 0.01). Ekstrasellüler metabolitler arasında 3-hydroxypropanoic acid (ESM9) DMFBS besiyerinde DMPL besiyerine göre daha fazla saptanmıştır (p:0.03). FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerin medyum supernatanlarında, PL varlığında çoğaltılan MKH'lerin medyum supernatanlarına göre de daha fazla saptanmıştır (p:0.00). Bu metabolit, FBS tam besiyeri ortamı ve supernatanlarda daha yüksek olmakla beraber PL varlığında çoğaltılan MKH'lerde FBS, PPP ve KİP varlığında çoğaltılan MKH'lere göre belirgin yüksek bulunmuştur. Bu da hücrelerin PL ortamında bu metaboliti sentezlediğini, ancak salınmadığını düşündürmüştür. 3-hydroxypropionyl-CoA, propionil CA veya malonyl CoA sentezinde kullanılır. Malonyl-CoA, sitoplazma ya da mitokondride asetil CoA ya çevrilerek farklı yollara katılır. Malonik asit düzeyleri analizi sonucu FBS besiyerinde malonik asit seviyesi düşük iken MKH içeren ortam supernatanlarında belirgin arttığı, PL içeren ortamda ise aksine başlangıçta yüksek iken supernatanda azaldığı görülmüştür. Her iki eklenti ile de, MKH'lerde malonik asit saptanmamıştır. Bu bulgular, FBS ortamında gelişen MKH'lerin malonik asit sentezleyip ortama salgıladığını, PL içeren ortamda ise malonik asiti kullandığını göstermiştir.

Çalışmamızda farklı serum/plazma eklentilerinin lipid metabolizması üzerine etkileri de analiz edilmiştir. Lipidomiks analizlerde, daha önce proteomik uygulamalar için tasarlanmış bir yazılım olan Skyline analiz yazılımı kullanılarak MKH'lerde gliserofosfolipitler, sfingolipitler, gliserolipitler, kolesteril esterler ve kolesterol gibi ana lipit sınıflarının analiz edildiği bir çalışmada, 72 sfingolipid tanımlanmıştır. Bunların 36'sı seramid, 14'ü sfingomyelin, dördü heksosilseramid, 16'sı diheksosilseramid, biri sfingozin ve biri sfinganindir (241). Sfingolipid metabolizması incelendiğinde, sphingozin (M225) ve sphinganin (M224) ekstrasellüler metabolitler

arasında saptanmamış, FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde PL varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla, p:0.34, p:0.00). Fumonisinler, *Fusarium moniliforme* ve *F. proliferatum* tarafından üretilen bir mikotoksin ailesidir. Fumonisin B1, sfinganin N-asiltransferazın bir inhibitörüdür ve fumonisinlere maruziyeti değerlendirmek için bir biyobelirteç olarak idrar veya serumdaki sfinganin/sfingozin oranındaki artış ile sıvı kromatografi yöntemi ile saptanabilir. İnsanların sfingolipid metabolizması Fumonisin B1 kontaminasyonundan etkilenir ve idrardaki sfinganin/sfingozin oranı, Fumonisin B1 maruziyetini değerlendirmek için yararlı olabilir (242). Sfinganine/sfingozin oranına bakıldığında çalışmamızda FBS ortamındaki MKH'lerde oran 1.17, PL ile 0.55, KİP ortamında 0.75, PPP ile bu oran 1.27 bulunmuştur. Seramidin de novo sentezinde, sfinganin, serin ve palmitoil-Co A'nın serin palmitoiltransferaz tarafından enzimatik kondansasyonu ile oluşturulur ve sfinganin ayrıca seramidlere açillir. Yeni sentezlenen seramid, glukosilseramide veya sfingomiyeline metabolize olur ve sonuçta sermidaz ile sfingozin ve yağ asitlerine ayrıştırılır. Çalışmamızda palmitik asit, FBS ve PL içeren ortamlarda ve MKH'lerde saptanmış, düzeyler FBS içeren ortamda daha yüksek bulunmuş, hem FBS hem de PL içeren ortama hücrelerin eklenmesi sonrası düzeylerinde azalma olmuştur. Bu bulgu, palmitik asitin MKH'ler tarafından sfingozin sentezi için kullanıldığını düşündürmüştür. Seramidler, sfingoid bazları temel yapısal bileşenleri olan yapısal olarak heterojen ve karmaşık bir sfingolipit grubudur (243). Sfingozin metabolitleri yüksek oranda biyoaktif bileşiklerdir ve hücre-hücre etkileşimi, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptoz gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol oynarlar. Sfingozin, hücre zarındaki en önemli amfifilik lipit sınıflarından biri olan sfingolipitlerin birincil bileşenlerinden biridir ve amino alkoller olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. Sfingozin ve sfingosin-1-fosfat gibi kimyasal olarak modifiye edilmiş formları, seramidler ve glikosfingolipidler gibi bazı karmaşık sfingolipidlerin omurgasını oluşturur. Ayrıca, bir fosfolipid öncüsü olan fosfoetanolamin, sfingozinden de sentezlenebilir. Sfingosin, sfingomiyelin içeren hücre zarı sfingolipitlerinin birincil bir bölümünü oluşturan doymamış bir hidrokarbon zincirine sahip 18 karbonlu bir amino alkoldür. Sfingolipidler nöronal dokularda kritik rol oynarlar. Sfingolipid

metabolizmasındaki spesifik bozukluklar, örneğin lizozomal depo hastalıkları; Niemann-Pick hastalığı, Fabry hastalığı, Gaucher hastalığı ve ayrıca fumonisin gibi sfingolipitlerin biyosentezi veya metabolizmasını bozabilen bileşikler hücre için zararlı olabilecek öncüllerinin birikmesine neden olabilir. Sfingozin'in bir türevi olan sfinganin, seramid üretiminde bir ara maddedir. Dihidrosfingosin olarak da adlandırılan sfinganin, daha sonra NADPH tarafından azaltılan bir keto ara maddesi oluşturmak üzere serinin palmitoil-CoA ile dekarboksillenerek yoğunlaştırılmasıyla biyosentezlenir (244). Çalışmamızda sfingolipid metabolizmasında FBS ve PL ortamında geliştirilen MKH'lerde istatistiksel anlamlı değişiklikler saptanmış, ayrıca plateletlerin zengin sfingolipid içeriği nedeniyle PL ile PPP arasında da karşılaştırma yapılmış ve anlamlı farklılık olduğu gösterilmiştir. MKH'ler antiinflamatuvar özellik gösterdiğinden, inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadırlar. Klinik uygulamalarda için kullanılan MKH'ler, immünosupresif etkilerinin artırılması için güçlü bir proinflamatuvar ortama tabi tutulurlar. Hücrenin sinyalleşmesinde ve hücrel fonksiyonların modülasyonunda bazı lipidlerin yer aldığı bilinmektedir. TNF α ve IFN- γ varlığından kaynaklanan, MKH'lerin lipid profilindeki değişimin araştırıldığı bir çalışmada lipidomik analiz yapılmıştır. Bu çalışmada fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, lysoPC (lyso-phosphatidylcholine) ve sfingomyelin sınıflarının lipid moleküler profillerinde büyük değişiklikler bulunmuş, fosfatidilinositol profilinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Özellikle C16:0 yapılı kısa zincirli yağ asitlerine sahip fosfatidilkolin türleri, proinflamatuvar uyaranlar altında azalmıştır. Ayrıca (40:6) fosfatidilkolin seviyesi düşmüş, fosfatidil kolin yıkım ürünü olan ve anti-inflamatuvar etkili olduğu ileri sürülen (18:0) lysoPC seviyesi, TNF α ve IFN- γ ile muamele edilen MKH'lerde artmıştır. (36:1) Fosfatidilserin ve (38:4) sfingomyelin artışı ile birlikte, (38:6) fosfatidilserin miktarları da göreceli olarak azalmıştır. Bu sonuçlar, MKH'lerin inflamatuvar sitokinlerle aktivasyonu sırasında lipid metabolizmasının ve sinyalleşmenin modüle edilebildiğini ve lipidlerin MKH'lerin fonksiyonel ve antiinflamatuvar aktivitelerine dahil olabileceğini düşündürmektedir (245). Çalışmamızda saptadığımız bazı yağ asitlerinin farklı koşullarda çoğaltılan MKH'lerdeki derişimleri tablo 5.1'de gösterilmiştir. Buna göre antiinflamatuvar etkili

LysoPC grubu PL-MKH'lerde, Lyso-PE (lysophosphatidyl ethanol amine) grubu FBS-MKH'lerde genel olarak daha yüksek bulunmuştur. LPS uyarımı ile FBS grubunda LysoPC'lerde artış, Lyso-PElerde ise azalma dikkati çekmiştir. LPS uyarımı sonrası değişiklik, PL gurunda çok daha belirgin olmuş, uyarım sonrası LysoPC'ler artarken Lyso-PElerde biri hariç (M154, LysoPE(0:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) belirgin azalma görülmüştür.



Tablo 5.1 Farklı besiyeri eklentileri ve inflamatuvar uyarım varlığında ve yokluğunda üretilen MKH'lerin metabolomik analizleri sonucunda bazı yağ asitlerinin intrasellüler düzeyinin bağlı derişimleri.

Metabolit Kısaltması	FBS-MKH	PL-MKH	KIP-MKH	PPP-MKH	FBSLPS-MKH	PLLPS-MKH	KIPLPS-MKH	PPPLPS-MKH
M 8 (4E,8E,10E-d18:3) Sphingosine	1.75±0.22	1.32±0.38	0.65±0.15	0.62±0.1	1.21±0.35	1.22±0.19	0.57±0.11	0.99±0.23
M 89 C17 Sphinganine	0.14±0.02	0.34±0.07	1.59±0.12	0.96±0.13	0.89±0.16	0.36±0.06	1.13±0.26	0.92±0.23
M 98 Dehydrophytosphingosine	0.01±0	0.01±0.01	1.97±0.45	0.62±0.07	0.12±0.08	0±0	2.52±0.78	4.46±2.39
M 206 Phytosphingosine	0.26±0.09	1.66±0.44	0.95±0.1	0.88±0.08	2.95±1.27	0.89±0.1	0.9±0.22	1.3±0.33
M 224 Sphinganine	1.82±0.24	0.41±0.16	1.04±0.09	1.26±0.15	0.44±0.1	0.18±0.05	1.2±0.09	1.91±0.36
M 225 Sphingosine	1.56±0.71	0.74±0.23	1.38±0.25	0.99±0.15	0.75±0.14	0.53±0.14	2.33±0.33	1.12±0.19
M 148 LysoPC(16:0)	0.83±0.26	1.34±0.25	0.75±0.13	0.65±0.23	1.05±0.27	1.37±0.26	1.02±0.27	0.44±0.19
M 149 LysoPC(18:0)	0.1±0.09	1.2±0.12	1.27±0.17	0.93±0.24	0.64±0.18	2.48±0.33	0.81±0.07	1.32±0.4
M 150 LysoPC (18:1(11Z))	0.88±0.28	1.71±0.37	0.93±0.25	0.69±0.11	1.56±0.4	2.2±0.57	0.59±0.15	0.87±0.11
M 151 LysoPC (18:1(9Z))	1.36±0.5	1.75±0.49	0.88±0.39	0.7±0.09	1.64±0.41	1.95±0.21	0.73±0.18	0.65±0.17
M 152 LysoPC (20:4 (8Z,11Z,14Z,17Z))	1.02±0.58	1.64±0.61	0.37±0.18	1.46±0.38	1.02±0.42	1.52±0.14	0.8±0.37	1.3±0.4
M 153 LysoPE (0:0/18:1(11Z))	3.54±0.9	2±0.73	0±0	0.05±0.03	1.91±0.38	0.48±0.43	0.06±0.05	0.15±0.13
M 154 LysoPE (0:0/20:4 (5Z,8Z,11Z,14Z))	0.41±0.15	2.72±0.69	0.56±0.35	0.5±0.32	0.77±0.26	2.04±0.22	0.58±0.24	0.4±0.16
M 155 LysoPE (0:0/22:4 (7Z,10Z,13Z,16Z))	1.58±0.63	3.69±1.31	0.29±0.07	0.12±0.05	1.32±0.29	1.56±0.88	0.25±0.06	0.16±0.06
M 156 LysoPE (0:0/22:5 (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z))	4.49±0.62	1.12±0.25	0.12±0.03	0.02±0.01	2.02±0.71	0.38±0.16	0.13±0.02	0±0
M 157 LysoPE (16:0/0:0)	1.87±0.33	1.31±0.39	1.13±0.23	0.41±0.14	1.04±0.24	0.69±0.27	1.11±0.23	0.3±0.06
M 158 LysoPE (22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)	1.69±0.38	0.93±0.2	0.28±0.08	0.01±0.01	1.53±0.46	0.62±0.19	0.46±0.16	0.02±0.02

Pantotenik asitin ekstrasellüler metabolit (ESM92) düzeylerine bakıldığında DMPL besiyerinde DMFBS besiyerine göre daha fazla saptanmasına karşın, FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerin medyum supernatanlarında, PL varlığında çoğaltılan MKH'lerin medyum supernatanlarına göre çok yüksek bulunmuş ($p:0.00$), ayrıca (M188) FBS ortamında gelişen MKH'lerde de PL'ye göre yüksek bulunmuştur. Bu metabolit PPP ve KİP içeren ortamlarda düşük düzeylerde saptanmıştır. Bu bulgular, pantotenik asitin FBS MKH'lerde ise sentezlendiğini ve ortama salındığını, PL-MKH'lerde daha fazla tüketildiğini düşündürmüştür, PL içeren ortamda pantotenik asitin daha fazla kullanılarak, asetil CoA üzerinden yağ asit biyosentezini artırabileceğini akla getirmiştir. Çalışmamızda LPS ile inflamasyon oluşturulduğunda PL varlığında yağ asit biyosentezinin daha belirgin ortaya çıktığı dikkati çekmiştir. Bu bulgu da Sun ve arkadaşlarının yakın zamanda yayınlanan makalesi ile uyumlu olacak şekilde otofaji mekanizmalarının aktif olabileceğini düşündürmektedir. O çalışmada insan plasental MKH'lerin rapamycin ile indüklenen veya 3-methyladenine ile inhibe edilen otofajisinin metabolom profili kimyasal izotop işaretli LC-MS ile incelenmiş, toplam 935 pik tespit edilip metabolit standartları kütüphanesi kullanılarak 50 metabolit pozitif olarak tanımlanmış, MKHlerin arginin ve prolin yolağında daha fazla ornitin ürettiği ve otofajinin aktif hale getirilmesi sırasında beta-alanin yolağında asetil-CoA'nın sentezlenmesi için daha fazla pantotenik asit kullanıldığı görülmüştür. Bu arada, asetil-CoA'nın yağ asitlerine dönüşümü, yağ asidi biyosentez yolağında birikime yol açmıştır. Buna karşılık, otofaji baskılandığında, metabolitlerdeki azalma bu metabolik yollarda zayıf metabolik aktiviteye neden olmuştur (246).

Çalışmamızda, değişen yolaklar incelendiğinde çıkarılacak en temel sonuç farklı eklentilerle çoğaltılan MKH'lerin metabolit düzeylerindeki farklılık açısından her bir değişken ile elde edilen bazı sonuçların ortak olmasıdır. Bu tez çalışmasında amaçlanan FBS eklentisi yerine PL içeren besiyeri ortamının MKH'lerde ve mikroçevresini temsil eden supernatanda oluşturduğu farklılıkların ortaya konmasıdır. Platelet içermeyen PPP eklentisi de test edilerek PL ile saptanan değişikliklerin platelet kaynaklı olup olmadığı hakkında fikir edinilmesi mümkündür. KİP eklentisi ile de bir bakıma kemik iliği mikroçevresine ait olası faktörlerin ortaya

konması düşünülmüştür. Değerlendirmeler esnasında, PPP ve KİP ile hücre ekspansiyonunda belirgin yavaşlama yaşandığı ve bu besiyeri eklentilerinin hücre gelişimi için ideal olmadığı, bu durumun da muhtemelen plateletlerden kaynaklanan avantajlara sahip olunmamasından kaynaklandığı göz önünde bulundurulmalıdır. KİP da da platelet içeriği oldukça düşük bulunmuştur. Analizlerde dikkati çeken bulgu, FBS ile diğer 3 eklenti arasında belirgin farklılıklar görülmüş olmasıdır. Valin, lösin ve izölösin biyosentezi, sitrat (TCA) döngüsü, sistein ve metionin metabolizması, aminoaçil tRNA biyosentezi, fenilalanin metabolizması, glisin, serin, treonin metabolizması, alanin, aspartat glutamat metabolizması, pantotenat ve CoA biyosentezi, gliksilat ve dikarboksilat metabolizması PL, KİP ve PPP varlığında çoğaltılan MKH'lerin her üçünde de FBS ile çoğaltılan MKH'lere göre anlamlı farklı bulunan yolaklardır. Buna karşın, sfingolipid metabolizması, tirozin metabolizması, glikoliz ve glikoneogenezis ile propanoat metabolizması sadece PL ile çoğaltılan MKH'lerde FBS varlığında çoğaltılan MKH'lere göre anlamlı farklı değişmiş bulunmuştur. KİP ve PPP ile çoğaltılan MKH'lerin FBS varlığında çoğaltılan MKH'lere göre anlamlı düzeyde farklılık ($p<0.05$) gösterdiği saptanan intrasellüler metabolitleri ve bunlara bağlı olarak anlamlı değişen yolaklar bu iki grup arasında daha fazla benzerlik göstermekte olup, bu yolaklar arginin ve prolin metabolizması, yağ asit biyosentezi, glutatyon metabolizması, nitrojen metabolizması, galaktoz metabolizmasıdır. Ayrıca KİP ile çoğaltılan MKH'lerde fruktoz ve mannoz metabolizması anlamlı değişirken, PPP ile çoğaltılan MKH'lerde butanoat ve propanoat metabolizması FBS grubuna göre anlamlı değişiklik göstermiştir.

Platelet kaynaklı değişimlerin gösterilmesi için PL ile KİP ve PPP varlığında çoğaltılan MKH'lerin karşılaştırması sonucunda anlamlı düzeyde farklılık ($p<0.05$) gösterdiği saptanan intrasellüler metabolitler ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda, her iki grupta da anlamlı değişen yolaklar alanin, aspartat, glutamat metabolizması, yağ asit biyosentezi, arginin ve prolin metabolizması, glutatyon metabolizması, butanoat metabolizması, fenilalanin metabolizması, glisin, serin, treonin metabolizması olmuştur (Tablo 4.21, 22, Şekil 4.72, 73, 77, 78). KİP ile çoğaltılan MKH'lerde pentoz fosfat yolağı, galaktoz metabolizması, D-glutamin ve D-

glutamat metabolizması farklı bulunurken (Tablo 4.22, Şekil 4.77, 78), PPP ile çoğaltılan MKH'lerde aminoaçil tRNA biyosentezi, sistein ve metyonin metabolizması, galaktoz metabolizması, pentoz fosfat yolağı, sfingolipid metabolizması, valin, lösin, izolösin biyosentezi PL ile çoğaltılan MKH'lerden farklı bulunmuştur (Tablo 4.21, Şekil 4.72, 73).

FBS ve PL eklenerek hazırlanan besiyerleri; DMFBS ve DMPL'in anlamlı düzeyde farklılık ($p<0.05$) gösterdiği saptanan ekstrasellüler metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda iki besi yeri arasında anlamlı farklılık gösteren yolaklar; amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması, fruktoz ve mannoz metabolizması, nişasta ve sükroz metabolizması, beta-alanin, propanoat, galaktoz ve riboflavin metabolizması (Tablo 4.24, Şekil 4.87), MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği anlamlı düzeyde farklılık ($p<0.05$) gösterdiği saptanan ekstrasellüler metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizlerine göre de; beta-alanin metabolizması, galaktoz metabolizması, alanin, aspartat glutamat metabolizması, yağ asit biyosentezi, pantotenat ve CoA biyosentezi, siyanoaminoasit biyosentezi, pentoz fosfat yolağı, nişasta ve sükroz metabolizması, amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması, propanoat ve riboflavin metabolizması, aminoaçil tRNA biyosentezidir (Tablo 4.25, Şekil 4.91). Diğer taraftan besiyeri ortamlarının kendi içerisinde süpernatantlarla karşılaştırılması sonucu, FBS ortamında MKH'lerin eklenmesi ile galaktoz metabolizması, amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması, früktoz ve mannoz metabolizması, askorbat ve aldarat metabolizmasında değişiklikler saptanmış; PL varlığında ise MKH'lerin kültür süpernatantlarının DMPL besiyerine göre değişen yolakları; galaktoz metabolizması, arginin metabolizması, amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması olarak bulunmuştur (Tablo 4.27, Şekil 4.99). Sonuçlardan görüldüğü gibi, DMFBS ve DMPL besiyeri içeriklerine göre genel olarak şeker metabolizması değişiyorken (amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması, nişasta ve sükroz metabolizması, beta-alanin, propanoat, galaktoz ve riboflavin metabolizması) bu besiyerleri ile çoğaltılan MKH'lerden salgılanan ekstrasellüler metabolitlerde ek olarak alanin, aspartat glutamat metabolizması, yağ asit biyosentezi, pantotenat ve CoA biyosentezi,

siyanoaminoasit biyosentezi, pentoz fosfat yolağı ve aminoasit tRNA biyosentezi de anlamlı olarak değişmektedir.

Diğer serum eklentilerinden KİP ve PPP ye ait veriler de değerlendirilmiştir. KİP varlığında çoğaltılan MKH kùltür süpernatantlarında FBS ile karşılaştırma sonucu farklı olarak yağ asidi biyosentezi, beta-alanin metabolizması, galaktoz metabolizması, alanin, aspartat glutamat metabolizması ve pantotenat and CoA biyosentezinin etkilenmiş olduğu görùlmüřtür (Tablo 4.29, şekil 4.107). KİP eklentisi içeren kùltürlerde hücreler eklendikten sonra galaktoz metabolizması, arginin biyosentezi, glioksilat ve dikarboksilat metabolizması, aminoasit tRNA biyosentezi, pantotenat ve CoA biyosentezi, askorbat ve aldarat metabolizması ve beta-alanin metabolizması anlamlı etkilenmiş (Tablo 4.30, şekil 4.111), diğer taraftan, PPP ortamında hücrelerin eklenmesiyle askorbat ve aldarat metabolizması, butanoat metabolizması, pantotenat ve CoA biyosentezinde anlamlı etkilenme görùlmüřtür (Tablo 4.33, şekil 4.123).

Farklı serum eklentileri ortamında hücreler ve ekstraselüler metabolitlerde yapılan tüm analizler, LPS ile inflamatuvar ortama maruz bırakılma sonrası tekrarlanmıştır. İnflamatuvar uyarım varlığında çoğaltılmış MKH'lerin kùltür süpernatantlarının içerdiği metabolitler ve çoğaltıldıkları medyumların içerdiği metabolitlerin karşılaştırmalı olarak incelenen yolak analizleri sonucu, glutatyon ve butanoat metabolizması dört grupta da değişirken, arginin, prolin metabolizması ve fruktoz, mannoz metabolizması KİP ve PPP grubunda benzer olarak değişmiştir. Alanin, aspartat, glutamat metabolizması ise PPP hariç diğer üç grupta anlamlı farklı olarak bulunmuştur. Her dört grupta da inflamasyon varlığında anlamlı etkilenen glutatyon metabolizması üyesi glutatyon (M116) FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde PL, KİP ve PPP varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla, p:0.00, p:0.00, p:0.00). Bu durum LPS'ye maruziyet sonrası da FBS grubunda daha belirgin olarak saptanmıştır (p=0.02).

Glutamin normalde esansiyel olmayan bir aminoasit olmasına rağmen inflamasyon ortamında; majör travma, sepsis, kemik iliği nakli, yoğun

kemo/radyoterapi gibi durumlarda tüketiminin sentez oranını aştığı durumlarda bu amino asite olan ihtiyaç nedeniyle şartlı esansiyel kabul edilmektedir. Glutamin, bir antioksidan olan glutatyonun prekürsörüdür (247, 248). Başta immün hücreler olmak üzere hücre proliferasyonu için gereklidir. Glutamin bu önemi nedeniyle genellikle hücre kültürlerine eklenmektedir. Çalışmamızda da tüm gruplara %1 oranında eklenmiştir.

Ekstraselüler metabolitler arasında glutamik asit (ESM51) seviyeleri incelendiğinde kültür besiyerlerinde PL içeren besiyerinde yüksek iken (2.69 ± 0.37), FBS, KİP ve PPP içeren besiyerlerinde düşük (sırasıyla, 2.21 ± 0.4 , 1.62 ± 0.37 , 0.43 ± 0.2) bulunmuştur. MKH'ler eklendikten sonra toplanan supernatanlarda DMPL'ta çoğaltılmış MKH'lerden salınan medyum supernatanlarında glutamik asit seviyesinin çok düştüğü (0.52 ± 0) görülmüştür. Bu durum, PL varlığında çoğaltılan MKH'ler tarafından glutamik asitin çok kullanıldığını göstermektedir. Bu bulgu da Higuera ve arkadaşlarının çalışmasında gösterildiği gibi (237), MKH kültüründe glutaminin en fazla tüketilen amino asit olarak saptandığı bulguyu destekler özelliktedir. Hızlı bölünen hücrelerde glutamin tüketiminin yüksek glikoliz ile ilişkisi nedeniyle PL içeren ortamda bu amino asitin fazla tüketimi PL ortamında glikolizin yüksek oranda olduğunu desteklemektedir (249). Hızlı bölünme sırasında artan glikoliz ve glutaminolizisin enerji üretiminden ziyade makromolekül sentezini desteklemek amacıyla aktifleştiği ileri sürülmektedir. Bu durum bilhassa enfeksiyon, stres durumları için öne çıkmaktadır. Nitekim, LPS ile inflamatuvar uyarım varlığında besiyerlerindeki glutamik asit seviyeleri MKH içeren ortamda FBS varlığında artarken (1.96 ± 0.34 'ten 3.24 ± 0.34 'e), PL içeren ortamda azalmış (0.9 ± 0.65 'ten 0.5 ± 0.09 'a), bu durum da inflamatuvar durumda da PL içeren ortamın MKH'lerin glutamin kullanımını, dolayısıyla glutaminolizis ve glikolitik yollara yöneldiğini düşündürmüştür.

Glutamin normalde esansiyel olmayan bir amino asit olarak kabul edilir. Bununla birlikte, son çalışmalar, glutamin'in enfeksiyon ve yaralanma gibi inflamatuvar durumlarda "şartlı olarak esansiyel" olabileceğine dair kanıtlar sağlamıştır. Uygun

koşullar altında, glutaminin, hücre proliferasyonunda, solunum yakıtı olarak işlev görebildiği ve uyarılmış bağışıklık hücrelerinin işlevini artırabileceği belgelenmiştir. Glutaminin in vitro hücre canlılığı ve proliferasyonunda önemi ilk olarak 1949'da Ehrensverd ve arkadaşları, daha ayrıntılı olarak 1956'da Eagle ve arkadaşları tarafından açıklanmıştır. Glutamin, kültürdeki diğer amino asitlerden 10-100 kat fazla olmalıdır ve yerine glutamik asit ya da glikoz konulamaz. Bu çalışmada, ilk olarak, doku kültürü ortamının yaklaşık fizyolojik konsantrasyonlarda esansiyel büyüme faktörleri, glikoz, 19 esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler ve yüksek konsantrasyonda glutamin (2 mmol) içermesi gerektiği gösterilmiştir (250).

Tüm grupların, LPS maruziyeti sonrası kendi içinde karşılaştırılması sonrası, inflamasyon varlığında istatistiksel anlamlı değişen intrasellüler metabolitlerinin yer aldıkları yollar: FBS eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerde butanoat metabolizması, sitrat (TCA) döngüsü, alanin, aspartat glutamat metabolizması, pantotenat ve CoA biyosentezi, beta-Alanin metabolizması, vitamin B6 metabolizması ve glutatyon metabolizması (Tablo 4.17, Şekil 4.52, 53); PL ile aminoaçil tRNA biyosentezi, glisin, serin, treonin metabolizması, valine, lösin ve izolösin biyosentezi, sistein ve metionin metabolizması, taurin ve hipotaurin metabolizması, alanin, aspartat glutamat metabolizması, pantotenat ve CoA metabolizması, beta-alanin metabolizması, pentoz fosfat yolağı, propanoat, glutatyon, nitrojen, butanoat, galaktoz metabolizması (Tablo 4.18, Şekil 4.57, 58); KIP ile aminoaçil tRNA biyosentezi, alanin, aspartat glutamat metabolizması, valine, lösin ve izolösin biyosentezi, glisin, serin, treonin metabolizması, sitrat (TCA) döngüsü, pantotenat ve CoA metabolizması, fruktoz, mannoz metabolizması, syanoaminoasid metabolizması, sistein ve metionin metabolizması, glutatyon, nitrojen, butanoat, galaktoz metabolizmaları, nikotinad ve nikotinamid metabolizması, D-glutamin ve D-glutomat metabolizması, beta-alanin metabolizması, gliksilat ve dikarboksilat metabolizması, glikoliz ve glikoneogenezis (Tablo 4.19, Şekil 4.62, 63); PPP ile arginin ve prolin metabolizması, glutatyon metabolizması, butanoat metabolizması, früktoz ve mannoz metabolizması (Tablo 4.20, Şekil 4.67, 68) olarak saptanmıştır.

Ekstraselüler metabolitlerin incelenmesinde dikkati çeken bir bulgu KİP eklentisi içeren besiyeri ortamında LPS'e maruz kalma sonrası çok sayıda metabolitte istatistiksel önemli değişiklikler saptanmış olmasıdır. İntraselüler analizlerde her grupta LPS sonrası farklı eklentilerle değişken farklılıklar saptanmıştır. Ekstraselüler metabolitlerde LPS'e maruz kalma ile FBS, PL, PPP ile o kadar belirgin değişiklik olmasa da, KİP içeren besiyerlerinde anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. MKH kültüründe kullandığımız DMKİP'nin inflamatuvar uyarım etkisinde değişen metabolitlerinin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelendiğinde, DMKİP ve DMKİPLPS arasında anlamlı düzeyde farklılık ($p<0.05$) gösterdiği saptanan ekstraselüler metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda iki besi yeri arasında anlamlı farklılık gösteren yolaklar; galaktoz metabolizması, arginin biyosentezi, alanin, aspartat glutamat metabolizması, glioksilat ve dikarboksilat metabolizması, pantotenat ve CoA biyosentezi, beta-alanin metabolizması, ansature yağ asitleri biyosentezi, galaktoz metabolizmasıdır (Tablo 4.37, Şekil 4.141). DMKİPLPS ile çoğaltılan MKH'lerden salgılanan süpernatantların ekstraselüler metabolitleri ile DMKİPLPS'in içerdiği metabolitler arasında anlamlı düzeyde farklılık ($p<0.05$) gösterdiği saptananlarla yapılan analizler sonucu, ansature yağ asitleri biyosentezi ile yağ asit biyosentezinin anlamlı farklı olduğu görülmüştür (Tablo 4.38, Şekil 4.145).

Hücre içermeyen, serum eklentili besiyeri ortamlarında, LPS eklenmesi sonrası, KİP hariç çok dikkati çeken değişiklik saptanmamıştır. DMFBS ve DMFBSLPS arasında istatistiksel anlamlı değişen/farklı olan metabolit bulunmadığından, anlamlı etkilenen yolak da bulunmadığı görülmüştür. İnflamatuvar uyarım varlığında DMFBSLPS ile çoğaltılmış MKH'lerin kültür süpernatantlarının içerdiği metabolitler ve DMFBSLPS'in içerdiği metabolitlerin metabolomiks verileri karşılaştırmalı olarak incelendiğinde ise, pentoz ve glukuronat dönüşümleri, nişasta ve sükroz metabolizması, neomisin, kanamisin ve gentamisin biyosentezi ve galaktoz metabolizması anlamlı etkilenmiştir (Tablo 4.34, Şekil 4.130). Bu bulgular, inflamatuvar ortama maruz kalma sonrası FBS içeren besiyerinde MKH'lerden ortama salınan metabolitlerin başlıca karbonhidrat metabolizmasını etkilediğini göstermektedir. DMPL ve DMPLPS arasında ise anlamlı düzeyde farklılık ($p<0.05$)

gösterdiği saptanan ekstrasellüler metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda iki besi yeri arasında anlamlı farklılık gösteren tek yolağın; yağ asit biyosentezi olduğu bulunmuştur (Tablo 4.35). Hücre içermeyen besiyeri ortamında bile LPS maruziyeti sonrası PL eklentisi varlığında yağ asit metabolizması değişmektedir. DMPLLPS ile çoğaltılan MKH'lerden salgılanan süpernatantların ekstrasellüler metabolitleri ile DMPLLPS'in içerdiği metabolitler arasında anlamlı düzeyde farklılık ($p<0.05$) gösterdiği saptananlarla yapılan analizler sonucu, sadece biyotin metabolizmasının anlamlı etkilendiği görülmüştür (Tablo 4.36, Şekil 4.137). DMPPP ve DMPPPPLPS arasında anlamlı düzeyde farklılık ($p<0.05$) gösteren metabolit bulunmadığından, anlamlı farklılık gösteren yolak da bulunmamaktadır. Yine, DMPPPPLPS ile çoğaltılan MKH'lerden salgılanan süpernatantların ekstrasellüler metabolitleri ile DMPPPPLPS'in içerdiği metabolitler arasında anlamlı düzeyde farklılık ($p<0.05$) gösterdiği saptanan az sayıdaki metabolitlerin, anlamlı etkilediği yolak bulunmadığı görülmüştür.

Bu çalışmanın esas amacı FBS'ye alternatif olmak üzere insan kaynaklı eklentilerden PL ortamında MKKH'lerin ve ortamın metabolik özelliklerinin ortaya çıkarılması ve FBS ve diğer eklentilerle karşılaştırılmasıdır. Ksenojenik ürün içermeyen kültür protokollerinin geliştirilmesinde FBS'a alternatif arayışlarında literatürde de en öne çıkan platelet kaynaklı eklentilerdir. Bu konuda oldukça fazla çalışma olmasına karşın MKH'lerin detaylı metabolik analizleri, metabolomiks, sekretom analizleri son yıllarda ortaya çıkmaya başlamıştır. Platelet kaynaklı eklentilerin metabolik analizlerinin yapıldığı çok yakın zamanda yapılan bir platelet lizatın farklı yöntemlerle hazırlanması sonrası metabolomik analizler proton nükleer manyetik rezonans spektrometresi ($^1\text{H-NMR}$) ve matris destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon zamanı uçuş kütle spektroskopisi (MALDI-TOF MS) yöntemleri ile incelenmiş ve CaCl_2 aktivasyonu ile elde edilen PRP'ların eklendiği besiyerlerinin, PPP eklenenlere göre daha yüksek çoğalma oranı sağladığı, dondurma çözündürme yöntemleri ile elde edilen platelet eklentilerinin adipoz MKH'lerin proliferasyonunu zayıf bir şekilde indüklediği gösterilmiştir (251). FBS e alternatif diğer bir serum kaynağı ise insan umbilikal kord kanı (iUKK)dir. Bu eklenti ve FBS'un NMR spektrumlarında benzer metabolitler

(amino asitler, glukoz, lipidler ve nükleotitler) bulunduğu, ayrıca önerilen iki eklentinin metabolik profilleri arasındaki ana farkın, iUKK'ndaki yüksek seviyedeki glikoz seviyeleri ve düşük laktat, glutamat, alanin ve dallı zincirli amino asit seviyelerinden kaynaklandığı gösterilmiştir (252).

Metabolizma, çevresel değişimlere paralel olarak kök hücre kaderini belirlemede çok önemlidir. Bir çalışmada, kültürde metabolik fenotiplerini karakterize etmek için adipoz kök hücre (AKH)'leri kültür süpernatantlarının yüksek çözünürlüklü nükleer manyetik rezonans (NMR) metabolomik analizleri çalışılmıştır. AKH'ler, adipogenez ve multipotent farklılaşma potansiyeline sahip mezenkimal benzeri kök hücrelerdir ve 72 saatlik hücre kültürü boyunca bu hücrelerin 29 ekzometaboliti tanımlanmış ve tüketim veya sekresyonları belirlenmiştir. Visseral AKH'ler çoğunlukla glikolizisi kullanırken, ciltaltı AKH'ler sırasıyla laktat ve sitratın yüksek salınımı ile kanıtlandığı gibi, hem glikoliz hem de mitokondriyal metabolizmayı kullanırlar. Hücre kültürü ortamının kompozisyonunu değiştirerek, glikoliz yerine glutaminolizin piruvat, alanin ve sitrat salınımını desteklediği gösterilmiştir. İki AKH tipinin glutamin içermeyen kültür koşullarında karşılaştırılması, visseral AKH'lerde değil ama ciltaltı AKH'lerde, laktat sentezine doğru piruvat yönlendirmesinin sınırlandırılmasında glutaminolizin rolünü ortaya koymuştur. Sonuç olarak, farklı kökenli AKH'lerin mitokondrinin piruvatı asimile etme kapasitesinde fark olduğu, artmış mitokondriyal aktivite gerektiren yolların farklılaşma potansiyelleri üzerinde muhtemel sonuçları olduğu gösterilmiştir (253). Çalışmamızda da MKH'lerin farklı eklentilerle koşullandırılmasının KH'lerin farklılaşma kapasitesine etkileri PCR analizleri ile gösterilmiştir. FBS ile karşılaştırıldığında PPP eklentisi içeren besiyeri kullanıldığında genel olarak adipojenik ve osteojenik gen ifadelerinde istatistiksel anlamlı azalma dikkati çekmiştir. KİP eklentisi ile çoğaltılan MKH'lerde sadece adiponektin ifadesi anlamlı azalmıştır. PL eklentisi ile FBS'ye kıyasla adiponektin ifadesinde istatistiksel anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır. RUNX1 osteojenik gen ifadelerinde ise FBS ve diğer gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Osteojenik farklılaşmanın Alizarin red ile değerlendirilmesinde farklılaşmanın hiç gözlenmediği PPP grubunda ALP ifadesinde istatistiksel anlamlı

olmak üzere azalma görülmüştür. Yine Alizarin red boyama ile en iyi osteojenik farklılaşmanın gözlendiği PL grubunda Runx1 ve Alkalen fosfataz ifadelerinde istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmamış, Alkalen fosfataz ifadesi KİP grubunda hafif yüksek bulunmuştur. Bu durum, Runx1 ifadesinin osteojenik farklılaşmanın erken döneminde olmasına, bizim çalışmamızda ise gen ifadelerinin geç aşamada analiz edilmesine bağlanabilir (Şekil 4.18).

Farklı platelet eklentilerinin MKH metabolik profiline etkileri çok sınırlı sayıda çalışmada incelenmiş olsa da, farklı kaynaklardan elde edilmiş hücrelerin platelet eklentileri varlığında proliferasyon, farklılaşma ve immunmodulatuvar özelliklerine etkileri konusunda çok sayıda araştırma vardır (186-189). İyi üretim uygulamaları (İÜU) yönergeleri altında hücre çoğaltılması, trombosit kökenli insan büyüme faktörlerini içeren besiyeri katkı maddeleri kullanılarak gerçekleştirilebilir. İÜU yönetmelikleri uyarınca sadece büyüme faktörü konsantrasyonlarının değerlendirilmesi, ürün partisinin biyolojik aktivitesini tahmin etmek için yeterli değildir. Proton nükleer manyetik rezonans spektrometresi (1H-NMR) ve matris ilişkili lazer desorpsiyonu / iyonlaşma süresi uçuş kütle spektroskopisi (MALDI-TOF MS) numunelerin geniş moleküler karakterizasyonunu sağlamaktadır. PRP'lerin CaCl₂ aktivasyonu ile elde edilen besiyeri eklentisi, PPP'lara göre daha yüksek proliferasyon hızı göstermiştir. Dondurma ve çözündürme yöntemleriyle elde edilen katkı maddeleri adipoz KH proliferasyonunu az indüklemiştir (251). Çalışmamızda farklı eklentilere ve inflamatuvar ortama maruz bırakılan MKH'lerin analizinde, farklı serum/plazma eklentileri MKH'lerin farklılaşma potansiyelinde de farklılık oluşturmuş, ancak yüzey belirteç ifadeleri genel olarak benzer bulunmuştur. Farklılaşma potansiyelindeki farkların özellikle adipojenik gen ifadelerinde olduğu görülmüş, osteojenik farklılaşma için kullanılan RUNX1 ve alkalen fosfataz ifadelerinde gruplar arasında farklılık gözlense de genellikle istatistiksel anlama ulaşmamıştır. Bu durum, analizlerin, farklılaşma indüksiyonu sonrası geç dönemde yapılmasına bağlanmıştır. Lipopolisakkarit ile inflamatuvar ortam oluşturulması da, farklı serum/plazma eklentileri ile kültür edilen MKH'lerin proliferasyon ve farklılaşma kapasitesinde

değişikliklere yol açmış, bu değişiklikler KİP ile çoğaltılan MKH'lerde LPS uyarısı sonrası daha belirgin ortaya çıkmıştır.

Reaktif oksijen radikallerinin kök hücrelerin farklılaşması ile arttığı bilinmektedir (204, 208). Bir çalışmada stromal prekürsör hücrelerde süperoksit dismutaz 2 (SOD2) eksikliğine bağlı olarak süperoksit anyonundaki bir artışın, global metabolit ortamındaki temel değişiklikler yoluyla osteojenik ve adipogenik farklılaşmayı baskıladığı gösterilmiştir. Piruvat ve L-glutamin metabolizmasının bozulması, SOD2 eksikliği olan ve kendinden yaşlanan stromal prekürsör hücrelerde, alfa-ketoglutaratın toksik birikimine neden olarak azalan soy farklılaşması için ana neden olarak gösterilmiştir. Alfa-ketoglutarat birikimi, DNA hasarı, Hif-1a (hipoksi indüklenebilir faktör 1a) kararsızlığı ve azaltılmış histon H3 (Lys27) asetilasyonunun bir sonucu olarak SOD2 eksik stromal öncül hücrelerde nükleositoloplazmik vakuollaşma ve kromatin yoğunlaşması aracılı hücre ölümüne yol açmaktadır (254). Çalışmamızda farklı koşullarda çoğaltılan MKH'lerin alpha keto glutaric acid (M78) düzeyleri PL, KİP ve PPP-MKH'lerde FBS-MKH'lere göre daha düşük bulunurken, inflamatuvar uyartım varlığında en çok KİP-MKH'ler olmak üzere, PL-MKH'lerde de alpha keto glutaric acid düzeyleri artmıştır (sırasıyla 3.02 ± 0.11 , 1.03 ± 0.25).,

Yine MKH'lerin rejeneratif tıpta kullanımı için daha stabil kültür teknikleri ve daha verimli üretimi için yöntemlerin araştırıldığı bir çalışmada, lipid metabolizmasını destekleyen ve apoptozu baskılayan L-karnitin varlığında KİMKH'lerin çoğalmalarına etkisi araştırılmıştır. L-karnitin varlığı ilaca bağlı apoptozisi ve adipogenik farklılaşmayı baskılamıştır. Metabolik analizde, β oksidasyonunun artmasına ve deoksikarnitin (karnitin sentezinde bir ara madde) dışındaki bütün karnitin türevlerinin artmış ifadesine ek olarak, polisatüre ve poliansatüre asitler azalmıştır. Seri ekspresyon analizi ve metabolomik analizleri, karnitin yararına işaret ederek hücre sağ kalımında artış olduğunu ortaya çıkarmıştır. Karnitin ilavesi sadece birkaç pasaj kültürlenmiş KİMKH'lerde oksijen tüketim oranını artırmıştır ve tekrarlayan çoğaltmanın ardından yaşlanmış olanlarda mitokondrial aktivasyon gerçekleşmiştir. L-karnitin KİMKH'lere eklenmesinin verimli hücre üretimi sağladığı gösterilmiştir

(255). Çalışmamızda hidroksivalerilkarnitin (M129), L-asetilkarnitin (139), valerilkarnitin (M240) düzeyleri FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde, PL varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuş (sırasıyla; p: 0.01, 0.69, 0.00), ekstrasellüler metabolitler arasında saptanmamışlardır. Bu durum, FBS varlığında yağ asit oksidasyonunun PL varlığına göre daha fazla olması ve adipojenik farklılaşmanın daha az olması ile veya PL varlığında mitokondri aktivitesinin ve adipojenik farklılaşmanın daha fazla olması (grafik 4.3) ile ilişkili olabilir. Bu durum, FBS varlığında karnitin ile MKH'lerin oksijen tüketiminin arttığını, oksidatif fosforilasyon ve/veya yağ asit oksidasyonunun PL varlığına göre daha fazla olduğunu düşündürmüştür.

MKH'ler rejeneratif tıptaki uygulamalar için umut vaat etse de, yaşlanma, heteroploid hücrelerde artış, genomik kararsızlık ve köklülüğün azalması gibi nedenler, daha stabil kültürleme yöntemleri ile MKH'lerin üretilmesini gerektirmektedir. Çeşitli enzimler için kofaktör olan ve antioksidan etkiye sahip askorbik asit (AsA), insanlar dahil bazı hayvanlar tarafından sentezlenemez. Gen ekspresyonu ve metabolomik analizi ile AsA'in kültür ortamına eklenmesinin insan MKH'lerinin proliferasyonu ve metabolizması üzerindeki etkisi incelenmiştir. AsA'in MKH proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir. AsA'i, AsA'siz kültürlerde koenzim olarak kullanan enzimlerin aktivitesinin azalmasından kaynaklanan HIF1 birikimi nedeniyle, hipoksi benzeri bir metabolizmaya dönüş olur. MKH'lerde AsA, HIF1a hidroksilaz aktivitesini artırır, HIF1a transkripsiyonunu baskılar ve mitokondriyal aktivasyona yol açar. MKH'lerin çoğaltılması sırasında AsA'in eklenmesi, hücrelerin daha verimli bir şekilde hazırlanmasına yol açacaktır (256). Bizim çalışmamızda dehidroaskorbik asit (M97) intrasellüler metabolitler arasında en fazla PL varlığında çoğaltılan MKH'lerde saptanmış (1.28 ± 0.02), bunu FBS, PPP ve KİP varlığında çoğaltılmış MKH'ler izlemiştir (sırasıyla; 0.89 ± 0.12 , 0.43 ± 0.06 , 0.43 ± 0.04). Ekstrasellüler metabolitler arasında dehidroaskorbik asit (ESM 36) en fazla DMPPP (1.82 ± 0.72), sonra sırasıyla DMFBS (1.01 ± 0.28), DMPL (0.37 ± 0.12) ve DMKİP'te (0.35 ± 0.18) saptanmıştır. PL, FBS ve PPP varlığında çoğaltılmış MKH'lerin kültür medyum süpernatantlarında çok düştüğü (sırasıyla; 0.04 ± 0 , 0.12 ± 0.04 , 1.55 ± 0.35), ilginç olarak KİP varlığında çoğaltılmış MKH'lerin kültür medyum süpernatantlarında

ise yükseldiği (1.49 ± 0.31) görülmüştür. Bu durum AsA'in PL içeren ortamda daha fazla kullanıldığını göstermektedir.



6. SONUÇ

Mezenkimal kök hücrelerin biyolojik özellikleri

- Morfoloji: Farklı serum/plazma eklentilerinde çoğaltılan MKH'lerin morfolojik özellikleri iğsi fibroblastoid yapılarıyla genel anlamda benzerlik göstermektedir. FBS ve PL ile çoğaltılan MKH'lerde fibroblastoid koloni formasyonu gözlenmiş, buna karşın PPP ve kısmen de KİP ile çoğaltılan MKH'lerde ilerleyen zaman ve pasajlarda hücrelerin daha seyrek, daha büyük, uzantılı, şişkin ve kalkmaya eğilimli olduğu gözlenmiştir.
- Proliferasyon: FBS, PL, PPP ve KİP eklentileri MKH'lerin proliferasyon özelliklerinde farklılık oluşturmuştur. MKH'ler FBS ve PL varlığında hızla çoğalmış, ancak yüksek proliferasyon hızı nedeniyle hücrelerin tabanı fazla kaplaması sonucu inhibisyon gözlenmiş ve ilerleyen zaman diliminde (9. gün) proliferasyon hızında azalma dikkati çekmiştir. PPP ve KİP eklentileri ile çoğalma çok yavaş olmuş, 9. günde kısmen artma devam etmiştir. Bu nedenle, WST analizi gruplar arası farklılıklar istatistiksel anlamlılık göstermemiştir. Buna karşın, hücreler belirli günlerde analiz için toplanmayıp direkt gözlem ve konfluent olduklarında hücre sayımı yapıldığında en iyi proliferasyon PL, ardından FBS gruplarında olmuş, PPP ve KİP ile hücre çoğalması çok yavaş ve yetersiz bulunmuştur.
- Farklılaşma potansiyeli: Farklı serum/plazma eklentileri MKH'lerin farklılaşma potansiyelinde de farklılık oluşturmuş, yüzey belirteç ifadeleri genel olarak benzer bulunmuştur. Farklılaşma potansiyelindeki farkların özellikle adipojenik gen ifadelerinde olduğu görülmüş, osteojenik farklılaşma için kullanılan RUNX1 ve alkalen fosfataz ifadelerinde gruplar arasında farklılık gözlenirse de genellikle istatistiksel anlama ulaşmamıştır. Bu durum,

analizlerin, farklılaşma indüksiyonu sonrası geç dönemde yapılmasına bağlanmıştır.

- Lipopolisakkarit ile inflamatuvar ortam oluşturulması farklı serum/plazma eklentileri ile kültür edilen MKH'lerin proliferasyon ve farklılaşma kapasitesinde değişikliklere yol açmış, bu değişiklikler KİP ile çoğaltılan MKH'lerde LPS uyarısı sonrası daha belirgin ortaya çıkmıştır.

Mezenkimal kök hücrelerin ve kültür ortamınının metabolik özellikleri

- FBS ve PL eklentileri içeren besiyerlerinin karşılaştırılması sonrası iki besiyeri arasında etkilenen yollar; amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması, fruktoz ve mannoz metabolizması, nişasta ve sükroz metabolizması, beta-alanin, propanoat, galaktoz ve riboflavin metabolizmasıdır.
- FBS ve PL eklentileri ve MKH içeren ortamda (süpernatantlar) yolak analizlerine göre iki grup arasında beta-alanin metabolizması, galaktoz metabolizması, alanin, aspartat glutamat metabolizması, yağ asit biyosentezi, pantotenat ve CoA biyosentezi, siyanoaminoasit biyosentezi, pentoz fosfat yolağı, nişasta ve sükroz metabolizması, amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması, propanoat ve riboflavin metabolizması, aminoasit tRNA biyosentezi farklılık göstermiştir.
- Serum/plazma eklentisi içeren besiyerlerinin kendi içerisinde MKH süpernatantları ile karşılaştırılması sonucu, FBS ortamında MKH'lerin eklenmesi ile galaktoz metabolizması, amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması, früktoz ve mannoz metabolizması, askorbat ve aldatat metabolizmasında değişiklikler saptanmış; PL varlığında ise MKH'lerin kültür süpernatantlarında değişen yolları; galaktoz metabolizması, arginin metabolizması, amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması olarak bulunmuştur.
- Serum eklentilerinden KİP ve PPP ye ait verilerin değerlendirilmesi sonucu: KİP varlığında çoğaltılan MKH kültür süpernatantlarında FBS varlığında çoğaltılan MKH kültür süpernatantları ile karşılaştırma sonucu farklı olarak yağ asidi

biyosentezi, beta-alanin metabolizması, galaktoz metabolizması, alanin, aspartat glutamat metabolizması ve pantotenat ve CoA biyosentezinin etkilenmiş olduğu görülmüştür. KİP eklentisi içeren kültürlerde hücreler eklendikten sonra galaktoz metabolizması, arginin biyosentezi, glioksilat ve dikarboksilat metabolizması, aminoaçil tRNA biyosentezi, pantotenat ve CoA biyosentezi, askorbat ve aldarat metabolizması ve beta-alanin metabolizması anlamlı etkilenmiş, diğer taraftan, PPP ortamında hücrelerin eklenmesiyle askorbat ve aldarat metabolizması, butanoat metabolizması, pantotenat ve CoA biyosentezinde anlamlı etkilenme görülmüştür.

Spesifik sonuçlar

- FBS ve PL varlığında çoğaltılan MKH'lerin intrasellüler metabolitlerinin anlamlı düzeyde farklılık gösterdiği saptanan metabolitleri ile gerçekleştirilen yolak analizleri sonucunda en anlamlı değişiklik **valin, lösin ve izolösin biyosentezinde** görülmüş, bu yolaktaki en kilit noktadaki metabolit olan pirüvik asittir.
- **Pirüvik asit** ve öncüsü olan **fosfoenol pirüvatın (PEP)** PL ortamında gelişen MKH'lerde FBS ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum PL ortamında glikolizin daha aktif olduğunu düşündürmektedir. Ortam incelemelerinde ise, PEP'in FBS besiyerinde PL'ye göre çok daha fazla oranda ifade edildiği, buna karşın MKH eklenince belirgin azaldığı dikkati çekmiştir. Bu bulgu da PEP'in FBS ortamında fazla tüketildiğine işaret etmektedir. Buna karşın hücrelerde pirüvik asitin PL'ye göre daha düşük olması FBS ortamında PEP'in glikoliz yanında başka yollara da yöneldiğini düşündürmüştür. Bunlardan birisi glukoneogenez, diğeri biyosentez (amino asit) yollarıdır.
- Hücreler ve ortamdaki glukoz oranlarının incelenmesi, glukoneogenezin FBS içeren ortamda artmış olabileceğini düşündürmüştür. (FBS içeren ortamda glukoz seviyesi PL >FBS iken, FBS içeren ortamda çoğaltılmış hücrelerde (MKH) glukoneogenezle uyumlu olacak şekilde glukoz seviyesi artmış, ayrıca, başlangıçta glukoz oranı daha düşük olan FBS içeren ortamda MKH'lerin

eklenmesi sonrası glukoz oranı yüksek bulunmuştur. PL içeren ortamda ise besiyerinde yüksek olan glukoz ortama MKH ekleninde azalmış, bu da glukozun kullanıldığını ve glikolizi desteklemektedir).

- Bu çalışmada yapılan değerlendirmemiz ve literatür (233, 234, 236) verilerine göre, PL içeren ortamda pirüvik asitin ve glikolizin daha aktif olması MKH'lerin bu ortamda daha immünsupresif, antiinflamatuvar ve senesensi önleyici özelliğe sahip olabileceğini akla getirmiştir.
- Genel olarak FBS içeren ortamda ve/veya hücrelerde PL içeren besiyerine kıyasla **amino asit düzeyleri** daha yüksek bulunmuştur. Saptanalar içerisinde, metiyonin ve treonin FBS içeren ortamda ve hücrelerde PL'ye göre daha yüksek bulunmuş, hücrelerin eklenmesiyle supernatanlarda azalma olması bu amino asitlerin MKH'ler tarafından tüketildiğini düşündürmüştür. Hücrelerde valin ve izolösin düzeyleri de FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde, PL varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuş, ortam analizlerinde saptanmamıştır. Serin düzeyleri de hem ortamda hem de hücrelerde FBS varlığında daha yüksek bulunmuştur. Alanin seviyesinin FBS içeren ortamda PL ve diğerlerine kıyasla çok yüksek olup MKH eklenince çok azalması FBS içeren ortamda hücrelerden alaninin salgılanmayıp aksine tüketildiğini göstermiştir. Fenilalanin de ekstrasellüler metabolitler arasında saptanmamış, FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde PL varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuş, benzer şekilde aspartik asit de FBS varlığında MKH'lerde daha yüksek bulunmuştur. Ortamda ise aspartik asit DMPL besiyerinde DMFBS besiyerine göre daha fazla saptanırken FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerin medyum supernatanlarında PL varlığında çoğaltılan MKH'lerin medyum supernatanlarına göre daha fazla saptanmış, bu bulgu da PL ortamında aspartik asitin tüketildiğini düşündürmüştür.
- Hücre kültürlerinde en önemli aminoasitlerden biri glutamindir. **Glutamin** ihtiyacı inflamasyon, stres durumlarında artmaktadır. Glutamin, PL içeren besiyerinde FBS, PPP ve KİP ile kıyaslandığında en yüksek seviyede iken MKH'ler eklendikten sonra toplanan supernatanlarda PL grubunda glutamik

asit seviyesinin çok azaldığı görülmüştür. Bu durum, PL varlığında çoğaltılan MKH'ler tarafından glutamik asitin çok kullanıldığını göstermektedir. Lipopolisakkarit ile inflamasyon oluşturulan ortamda besiyerlerindeki glutamik asit seviyeleri ise MKH içeren ortamda FBS varlığında artarken (1.96 ± 0.34 'ten 3.24 ± 0.34 'e), PL içeren ortamda azalmış (0.9 ± 0.65 'ten 0.5 ± 0.09 'a), bu durum da inflamatuvar durumda da PL içeren ortamın MKH'lerin glutamin kullanımını, muhtemelen, makromolekül sentezini artırmak amacıyla glutaminolizis ve glikolitik yollara yönelttiğini düşündürmüştür. İnflamasyon varlığında her 4 grupta da anlamlı etkilenen glutatyon FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde PL, KİP ve PPP varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuştur Bu durum LPS'ye maruziyet sonrası yine FBS grubunda daha belirgin bulunmuştur.

- **Sistein ve metionin metabolizmasında** 2-oxobutanoate, methionine, L-Serine, piruvat, glutatyon, L-alanin, 5'-Methylthioadenosine etkilenmektedir. Oxobutanoate bir ketoasittir. Birçok amino asit (glycine, methionine, valine, leucine, serine, threonine, isoleucine) ve propanoate metabolizmasında rol oynar. 3-methyl-2-oxobutanoic acid DMFBS besiyerinde DMPL besiyerine göre kısmen fazla saptanmış, her iki ortamda da MKH'lerin medyum supernatanlarında oldukça azalmış, yani kullanılmıştır. 5'-Methylthio adenosine, tüm memeli dokularında doğal olarak oluşan kükürt içeren bir nükleosiddir. Metiyonin ve pürin kurtarma yollarında 5'-Metiltioadenosin fosforilaz ile metabolize edilerek 5-metiltioriboz-1-fosfat ve adenin oluşturur. Gen ekspresyonu, proliferasyon, farklılaşma ve apoptozunun düzenlenmesi dahil olmak üzere hücrenin çok sayıda kritik yanıtını etkilediği gösterilmiştir Bu metabolit, ekstrasellüler metabolitler arasında saptanmamış, FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde PL varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuştur.
- **Sitrik asit siklusu (Krebs/TCA döngüsü)** metabolitlerinden sitrat, fumarat, suksinik asit ve izositrat ekstrasellüler metabolitler arasında tanımlananlar arasında bulunmayıp, MKH'lerde saptanmışlardır. Döngünün ilk

reaksiyonlarında oluşan sitrik asit ve izositrat PL varlığında çoğaltılan MKH'lerde daha fazla bulunurken, döngünün geç oluşan metabolitleri fumarat ve suksinik asit FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde daha fazla saptanmıştır. Trombosit konsantrelerinde antikoagülan olarak bulunan sitrat, PL varlığında çoğaltılan MKH'lerde daha fazla bulunurken, döngü ilerledikçe ortaya çıkan metabolitler FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde daha fazla saptanmıştır. Benzer şekilde malat da FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde daha fazla saptanmıştır. Bu da Krebs döngüsünün FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde daha aktif olduğunu düşündürmektedir.

- Propionil CoA, dallı zincirli amino asit yıkımı, tek sayılı yağ asidi yıkımı, kolesterol yıkımı gibi mitokondride oluşan çeşitli metabolik yolların bir yan ürünüdür. Metabolom analizlerimizde **propanoat metabolizması** üyelerinden 3-(2-hydroxyphenyl)propanoic acid, FBS besiyeri ve supernatanlarda daha yüksek bulunmuş, MKH'lerde ise PL varlığında FBS, PPP ve KİP varlığında çoğaltılan MKH'lere göre belirgin yüksek bulunmuştur. Bu da hücrelerin PL ortamında bu metaboliti sentezlediğini, ancak salınmadığını düşündürmüştür. 3-hydroxypropionyl-CoA, propionil CA veya malonyl CoA sentezinde kullanılır. Malonyl-CoA, sitoplazma ya da mitokondride asetil CoA'ya çevrilerek farklı yollara katılır. Malonik asit düzeyleri analizi sonucu FBS besiyerinde malonik asit seviyesi düşük iken MKH içeren ortam supernatanlarında belirgin arttığı, PL içeren ortamda ise aksine başlangıçta yüksek iken supernatanda azaldığı görülmüştür. Her 2 eklenti ile de MKH'lerde malonik asit saptanmamıştır. Bu bulgular, FBS ortamında gelişen MKH'lerin malonik asit sentezleyip ortama salgıladığını, PL içeren ortamda ise malonik asiti kullandığını göstermiştir. Bu bulgular malonik asitin muhtemelen asetil CoA sentezi için kullanıldığını düşündürmüştür.
- **Lipid** metabolizması incelendiğinde FBS ve PL grupları arasında belirgin farklılıklar saptanmış, ilginç olarak KİP eklentisi ile de lipid metabolizmasında dikkati çeken bulgular saptanmıştır. Sfingolipid metabolizmasında FBS ve PL ortamında geliştirilen MKH'lerde istatistiksel anlamlı değişiklikler saptanmış,

ayrıca plateletlerin zengin sfingolipid içeriği nedeniyle PL ile PPP arasında da anlamlı farklılık olduğu gösterilmiştir. Sphingozin ve sphinganin molekülleri ekstrasellüler metabolitler arasında saptanmamış, FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde her 2 metabolit de PL varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca KİP ortamında gelişen MKH'lerde de FBS MKH'lere yakın seviyelerde bulunduğu görülmüştür. Sfinganine/sfingozin oranına bakıldığında ise FBS ortamındaki MKH'lerde oran 1.17, PL ile 0.55, KİP ortamında 0.75, PPP ile bu oran 1.27 bulunmuştur. Palmitik asit serinle birlikte sfingozin sentezinde yer alır. Çalışmamızda palmitik asit FBS ve PL içeren ortamlarda ve MKH'lerde saptanmış, düzeyler FBS içeren ortamda daha yüksek bulunmuş, hem FBS hem de PL içeren ortama hücrelerin eklenmesi sonrası düzeylerinde azalma olmuştur. Bu bulgu, palmitik asitin her iki serum eklentisi varlığında da MKH'ler tarafından sfingozin ve diğer yağ asitleri sentezi için kullanıldığını düşündürmüştür.

- MKH'lerin inflamatuvar sitokinlerle aktivasyonu sırasında lipid metabolizmasında farklılıklar olduğu bilinmektedir (223). Çalışmamızda lipid metabolizma ara ürün seviyeleri incelendiğinde LysoPC grubu (lyso-phosphatidylcholine) PL-MKH'lerde, Lyso-PE (lysophosphatidyl ethanol amine) grubunun ise FBS-MKH'lerde genel olarak daha yüksek bulunduğu gözlenmiştir (LysoPE 0:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z /M154 hariç). İlginç olarak, LPS uyarımı sonrası PL grubunda daha belirgin olmak üzere LysoPC grubunda artma, LysoPE'lerde azalma gözlenmiştir. Bu bulgular, PL ortamı MKH'lerin immünmodulatuvar/antiinflamatuvar özelliklerininin FBS grubundan farklı olduğunu göstermektedir. Bu durum LPS uyarımı sonrası daha belirgin olarak ortaya çıkmaktadır. LysoPC ile LysoPE gruplarının immunmodulatuvar özellikleri hakkında literatürde çelişkili bildirimler vardır (245, 257).
- Son yayınlar LysoPC nin antiinflamatuvar olduğunu ileri sürmektedir. Bizim çalışmamızda da LPS uyarımı sonra LysoPClerde artış olması bu bulguyu desteklemekte, bu da PL ortamında hücrelerin antiinflamatuvar özelliğininin daha yüksek olacağını düşündürmektedir.

- Ekstraselüler metabolitlerin incelenmesinde dikkati çeken bir bulgu KİP eklentisi içeren besiyeri ortamında LPS'e maruz kalma sonrası çok sayıda metabolitte istatistiksel önemli değişiklikler saptanmış olmasıdır. Bu analizlerde, hücre içermeyen besiyeri ortamında bile LPS sonrası unsature yağ asit biyosentezi ile yağ asit biyosentezinde farklılık saptanmıştır. Dalak ve timusta LPS uygulamasının unsatüre ve satüre yağ asitlerinde önemli değişikliklere ve immün disregülasyona yol açtığı gösterilmiştir (258). KİP eklentisi içeren besiyerine MKH eklenmesi sonrası da yağ asit sentez aşamasında gerekli olan **biyotin** metabolizmasının etkilendiği görülmüştür. Biotin de yağ dokusundan zengin bir doku olan kemik iliğinde bulunan bir metabolittir ve yağ asit oksidasyonunda rolü vardır.
- Lipid metabolizması ile ilgili metabolitlerden birisi **L-karnitindir**. Çalışmamızda hidrosivalerilkarnitin, L-asetilkarnitin, valerilkarnitin düzeyleri FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde, PL varlığında çoğaltılan MKH'lere göre daha yüksek bulunmuş ekstraselüler metabolitler arasında saptanmamışlardır. Bu durum FBS varlığında karnitin ile MKH'lerin oksijen tüketiminin arttığını, bu durumun da yağ asit beta oksidasyonu veya oksidatif fosforilasyonun indüklendiğini akla getirmiştir.
- Analizlerde saptanan diğer bir bulgu da serum/plazma eklentilerinden FBS ile diğer 3 eklenti (PL, PPP, KİP) arasında belirgin farklılıkların görülmüş olmasıdır. Valin, lösin ve izolösin biyosentezi, sitrat (TCA) döngüsü, sistein ve metionin metabolizması, aminoasit tRNA biyosentezi, fenilalanin metabolizması, glisin, serin, treonin metabolizması, alanin, aspartat glutamat metabolizması, pantotenat ve CoA biyosentezi, glioksilat ve dikarboksilat metabolizması PL, KİP ve PPP varlığında çoğaltılan MKH'lerin her üçünde de FBS ile çoğaltılan MKH'lere göre anlamlı farklı bulunan yolaklardır.
- **Pantotenik asit** bir B vitaminidir. FBS besiyeri ortamında PL'den daha düşük iken MKH eklenince supernatanlarda seviyesi FBS grubunda çok artmış, ayrıca MKH'lerde de FBS içeren ortamda PL'ye kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgular FBS ortamında MKH'lerin pantotenik asit sentezlediğini, PL

ortamında ise pantotenik asitin tüketildiğini düşündürmüştür. Bu metabolit PPP ve KİP içeren ortamlarda düşük düzeylerde saptanmıştır.

- **Askorbik asitin** MKH proliferasyonunu desteklediği bilinmektedir. Bizim çalışmamızda dehidroaskorbik asit, intrasellüler metabolitler arasında en fazla PL varlığında çoğaltılan MKH'lerde saptanmıştır. Ekstrasellüler metabolitler arasında ise dehidroaskorbik asit MKH eklenmesini takiben PL, FBS ve PPP varlığında çoğaltılmış MKH'lerin kültür medyum süpernatantlarında çok azalmış, ilginç olarak KİP varlığında çoğaltılmış MKH'lerin kültür medyum süpernatantlarında ise artmıştır.

Sonuç ve Öneriler:

- Mezenkimal kök hücreler, farklı serum/plazma eklentileri ile kültür edildiğinde proliferasyon ve farklılaşma özelliklerinde farklılık göstermiştir. Lipopolisakkarid uyarısı da MKH'lerin proliferasyon ve farklılaşma kapasitesinde değişikliklere yol açmıştır.
- Pirüvik asit ve öncüsü fosfoenol piruvat (PEP) PL ortamında geliştirilen MKH'lerde FBS'a göre yüksek bulunmuştur. Bu durum PL varlığında hücrelerde glikolitik metabolizmanın daha aktif olduğunu düşündürmüştür.
- PL içeren besiyerinde yüksek olan glukoz seviyesi ortama MKH eklenince azalmış, bu da glukozun kullanıldığını düşündürmüştür, bu bulgu da PL varlığında glikolizin artmasını desteklemiştir.
- Fosfoenol piruvat, FBS besiyerinde PL besiyerine göre çok daha yüksek bulunmuş, MKH eklenince belirgin azalmıştır. Bu durum FBS ortamında MKH'lerin PEP kullanımının yüksek olduğuna işaret eder.
- FBS ortamında başlangıçta düşük olan glukoz düzeyi MKH eklenince artmıştır. Bu durum MKH'lerin glukoneogeneze yöneldiğini düşündürmüştür. Bu bulgu da FBS besiyerinde yüksek olan PEP'in muhtemelen glikolize ek olarak glukoneogenez için de kullanıldığını düşündürmüştür.
- Amino asit düzeyleri genel olarak FBS ortamında ve/veya MKH'lerde PL ile kıyaslandığında yüksek bulunmuştur. Bu durum da PEP'in glukoneogenez

yanında amino asit sentezi için de kullanılmış olabileceğini akla getirmiştir. FBS varlığında treonin, serin, metionin, valin, izolösin, alanin, fenilalanin, aspartik asit daha yüksek düzeyde bulunmuştur.

- FBS varlığında MKH'ler tarafından kullanılan amino asitler metionin, treonin, alanindir.
- PL varlığında tüketilen amino asitler glutamin ve aspartik asittir. Glutamin PL besiyerinde diğer eklentilere göre en yüksek sevide iken MKH'ler eklenince çok azalmıştır. Lipopolisakkarit ile uyarım sonrası da PL içeren ortamda glutamin azalmış, bu durum da glutaminolizis ve glikolizinin aktifleştiğini düşündürmüştür.
- Bir ketoasit olan oxobutanoik asit hem FBS hem de PL besiyerlerinde tespit edilmişken, MKH eklendikten sonra düzeyleri azalmış, kullanılmıştır.
- Krebs siklusu / TCA döngüsünün ilk reaksiyonlarında oluşan sitrik asit ve izositrat PL varlığında çoğaltılan MKH'lerde daha fazla bulunurken, döngünün geç oluşan metabolitleri fumarat, suksinik asit, malat FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde daha fazla saptanmıştır. Bu durum Krebs döngüsünün FBS varlığında çoğaltılan MKH'lerde daha aktif olduğunu düşündürmüştür.
- Propanoat metabolizması üyelerinden 3-(2-hydroxyphenyl)propanoic acid, FBS varlığında ortamda, PL varlığında ise MKH'lerde yüksek bulunmuştur. Malonik asit ise FBS ortamında MKH'ler tarafından sentezlenip ortama salınmış, PL içeren ortamda ise malonik asit tüketilmiştir. Bu bulgular malonik asitin muhtemelen asetil CoA sentezi için kullanıldığını düşündürmüştür. Ayrıca FBS ortamında yağ asit oksidasyonunun uyarılmış olabileceğini (ortamdaki propanoik asitin kullanılarak MKH'ler tarafından malonik asit sentezlenmesi nedeniyle) düşündürmüştür.
- Sphingazın ve sphingozin FBS ortamında çoğaltılan MKH'lerde PL grubuna göre daha yüksek bulunmuş, KİP ortamında da buna yakın değerlerde bulunmuştur. Sfinganine/sfingozin oranı da FBS ortamında gelişen MKH'lerde PL grubuna göre yüksek bulunmuştur. Palmitik asit de FBS içeren ortamda ve

hücrelerde PL'a göre daha yüksek bulunmuş, hem FBS hem de PL grubunda hücreler eklenince azalmış, kullanılmıştır.

- Lipid metabolizma ara metabolitlerinden LysoPC grubu (lyso-phosphatidylcholine) grubu (immünmodulatuvar) PL ortamında gelişen MKH'lerde yüksek, buna karşın Lyso-PE (lysophosphatidylethanolamine) ise FBS-MKH'lerde daha yüksek saptanmıştır. Lipopolisakkarit uyarımı sonrası da LysoPC grubunda artış, LysoPE'lerde azalma gözlenmiştir.
- Karnitin seviyeleri FBS varlığında çölatılan MKH'lerde PL gurubuna göre daha yüksek bulunmuş, yağ asit oksidasyonunun indüklenmiş olabileceğini düşündürmüştür.
- Bir vitamin olan pantotenik asit ise FBS ortamında MKH'ler tarafından sentezlenmiş, PL ortamında ise tüketilmiştir.
- Dehidroaskorbik asit PL ortamında çoğaltılan MKH'lerde daha yüksek seviyede bulunmuştur.
- KİP eklentisi içeren besiyeri ortamında LPS'e maruz kalma sonrası çok sayıda metabolitte istatistiksel önemli değişiklikler saptanmıştır. Hücre içermeyen besiyeri ortamında bile LPS sonrası unsature yağ asit biyosentezi ile yağ asit biyosentezinde değişim saptanmıştır. KİP eklentisi içeren besiyerine MKH eklenmesi sonrası da yağ asit sentez aşamasında gerekli olan biyotin metabolizmasının etkilendiği görülmüştür.

ÇALIŞMANIN BİYOLOJİK ÖNEMİ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, klinikte oldukça yaygın kullanılmaya başlanmış olan MKH'lerin üretim aşamasındaki farklılıkların MKH'lerin metabolik / fonksiyonel özelliklerini etkileyeceğinden yola çıkılarak planlanmış, MKH çoğaltılmasında en etkili faktörlerden olan serum faktörünün etkisi araştırılmıştır. Bunun için en sık kullanılan FBS'a alternatif olarak PL, ayrıca platelet etkisini değerlendirmek için PPP ve kemik iliği mikroçevre ortamını yansıtmak üzere de KİP kullanılmıştır. Klinikte MKH'lerin en sık kullanıldığı GVHH benzeri inflamatuvar ortamda etkileri hakkında bilgi edinmek ve/veya üretim aşamasında inflamatuvar uyarım etkilerini değerlendirmek üzere de

LPS uyarımı sonrası da metabolomik ölçümler tekrarlanmıştır. Analizler sonucunda çok sayıda anlamlı metabolit değişikliği ve etkilenen yollar tespit edilmiş, bunların içerisinde kök hücre biyolojisinde önemi olduğu düşünülen seçilmiş metabolitler üzerinden değerlendirmeler yapılmıştır. Bu değerlendirmeler sonucunda, PL içeren ortamda MKH'lerin daha çok glikolitik metabolizmaya yöneldiği, glutamin tüketiminin yüksek olup hücrelerin glutaminolizise yöneldiği ve inflamasyon durumunda bu yolların rolü olabileceği düşünülmüş, MKH'lerin PL ortamında daha immünespresif, antiinflamatuvar ve senesensi önleyici özelliğe sahip olabileceğini akla getirmiştir. Buna karşın FBS ortamında ise hücrelerin mitokondrial metabolizma, Krebs siklusu, yağ asit oksidasyonuna ve glukoneogeneze yöneleceği düşünülmüştür. FBS içeren besiyeri ortamında genel olarak amino asit seviyeleri diğer eklentilere göre daha yüksek bulunmuş, FBS ve PL içeren besiyerlerinde hücreler tarafından farklı amino asitlerin kullanıldığı görülmüş, metionin, treonin ve alaninin FBS ortamında, glutamik asit ve aspartik asitin ise PL ortamında daha fazla tüketildiği saptanmıştır. Hücrelerin immünolojik özelliklerini belirlemede önemi gösterilmiş olan lyso-phosphatidylcholine ve lyso-phosphatidyletanolamin düzeylerinde farklı eklentilerle önemli farklılıklar saptanmıştır. PL ile LysoPC, FBS ile LysoPE daha yüksek bulunmuş, bu eklentilerle çoğaltılan hücrelerin immünmodulatuvar özelliklerinin farklı olabileceği düşünülmüştür. LPS uyarımı sonucu elde edilen bulgular da bunu desteklemiştir.

Literatürde PL ortamında geliştirilen MKH'lerin metabolik özelliklerine ait veriler yetersizdir, çok yakın zamanda metabolomik çalışmaları ile PL'in elde edilmiş yöntemlerinin etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmamız, bu alanda yapılmış en kapsamlı araştırma olmuştur. Analizler hem intraselüler düzeyde hem de 4 farklı eklentinin olduğu besiyerleri ve MKH supernatanlarında yapılmış, ayrıca, LPS ile inflamatuvar ortamın etkileri test edilmiştir. Bu çalışmamızın devamı olarak ilk aşamada üzerinde durulması planlanan konu, farklı eklentilerin immünmodulatuvar etkilerinin ve mekanizmalarının detaylarıyla ortaya konmasıdır. Böylelikle, metabolik modifikasyonlarla hücrelerin biyolojik/immünolojik özelliklerindeki değişimlerin izlenmesi, hücre üretim aşamasında metabolik uyarım protokollerinin geliştirilmesi,

bulgular eşliğinde hastalığa/patolojiye özel, kişiselleştirilmiş hücre tedavilerinin geliştirilmesi yönünde yararlı bilgiler edinilecektir. İmmünmodulator özellikler dışında hasar onarımı/rejeneratif amaçlı uygulamalar için hücrelerin ihtiyaç yönünde farklılaştırılabilmesi için yine kişiye özel, hastalığa özel protokoller geliştirilmesi mümkün olacaktır.

Bu çalışmada çok fazla veri elde edilmiştir. Bunların detaylı biyoinformatik analizleri, küçük molekül kütüphanelerinin incelenmesi, biyolojik önem yönünden ileri biyokimyasal değerlendirmeler yapılması durumunda birçok yeni araştırmaya veri sağlayacak bir kaynak oluşturulmuştur.



KAYNAKLAR

1. Rodrigues M, Griffith LG, Wells A. Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(4):32.
2. Jung S, Sen A, Rosenberg L, Behie LA. Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2010;12(5):637-57.
3. Oikonomopoulos A, van Deen WK, Manansala AR, Lacey PN, Tomakili TA, Ziman A, et al. Optimization of human mesenchymal stem cell manufacturing: the effects of animal/xeno-free media. *Sci Rep.* 2015;5:16570.
4. Pierce J, Benedetti E, Preslar A, Jacobson P, Jin P, Stroncek DF, et al. Comparative analyses of industrial-scale human platelet lysate preparations. *Transfusion.* 2017;57(12):2858-69.
5. Mizuno M, Katano H, Otabe K, Komori K, Matsumoto Y, Fujii S, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-AA/AB in human serum are potential indicators of the proliferative capacity of human synovial mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:243.
6. Nazari M, Ni NC, Ludke A, Li SH, Guo J, Weisel RD, et al. Mast cells promote proliferation and migration and inhibit differentiation of mesenchymal stem cells through PDGF. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;94:32-42.
7. Kusuma GD, Carthew J, Lim R, Frith JE. Effect of the Microenvironment on Mesenchymal Stem Cell Paracrine Signaling: Opportunities to Engineer the Therapeutic Effect. *Stem Cells Dev.* 2017;26(9):617-31.
8. Paquet J, Deschepper M, Moya A, Logeart-Avramoglou D, Boisson-Vidal C, Petite H. Oxygen Tension Regulates Human Mesenchymal Stem Cell Paracrine Functions. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(7):809-21.
9. Sobacchi C, Palagano E, Villa A, Menale C. Soluble Factors on Stage to Direct Mesenchymal Stem Cells Fate. *Front Bioeng Biotechnol.* 2017;5:32.
10. Muraglia A, Nguyen VT, Nardini M, Mogni M, Coviello D, Dozin B, et al. Culture Medium Supplements Derived from Human Platelet and Plasma: Cell Commitment and Proliferation Support. *Front Bioeng Biotechnol.* 2017;5:66.
11. Lin T, Pajarinen J, Nabeshima A, Lu L, Nathan K, Jamsen E, et al. Preconditioning of murine mesenchymal stem cells synergistically enhanced immunomodulation and osteogenesis. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):277.

12. Nemetlu E, Zhang S, Juranic NO, Terzic A, Macura S, Dzeja P. 18O-assisted dynamic metabolomics for individualized diagnostics and treatment of human diseases. *Croat Med J.* 2012;53(6):529-34.
13. Nemetlu E, Zhang S, Gupta A, Juranic NO, Macura SI, Terzic A, et al. Dynamic phosphometabolomic profiling of human tissues and transgenic models by 18O-assisted (3)(1)P NMR and mass spectrometry. *Physiol Genomics.* 2012;44(7):386-402.
14. Zhang L, Hu J, Athanasiou KA. The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Crit Rev Biomed Eng.* 2009;37(1-2):1-57.
15. Arey LB. *Developmental anatomy: a textbook and laboratory manual of embryology.* Philadelphia, PA: WB Saunders; 1974.
16. Redi F. *Experiments on the generation of insects.* Publisher Unknown; 1688.
17. Leydig F. *Lehrbuch der Histologie des Menschen und der Tiere.* Publisher Unknown. 1857.
18. Pasteur. WJL. In: *Catholic encyclopedia.* New York: Robert Appleton; 1913.
19. Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961;14:213-22.
20. Cole RJ, Edwards RG, Paul J. Cytodifferentiation and embryogenesis in cell colonies and tissue cultures derived from ova and blastocysts of the rabbit. *Dev Biol.* 1966;13(3):385-407.
21. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(12):7634-8.
22. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292(5819):154-6.
23. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-7.
24. Hentze H, Soong PL, Wang ST, Phillips BW, Putti TC, Dunn NR. Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res.* 2009;2(3):198-210.
25. Gordeeva OF, Nikonova TM. Development of experimental tumors formed by mouse and human embryonic stem and teratocarcinoma cells after subcutaneous and intraperitoneal transplantations into immunodeficient and immunocompetent mice. *Cell Transplant.* 2013;22(10):1901-14.

26. Kristina Hug GrHn. *Translational Stem Cell Research*. 2010.
27. Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*. 2010;465(7299):704-12.
28. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008;26(1):101-6.
29. Wernig M, Meissner A, Cassady JP, Jaenisch R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2008;2(1):10-2.
30. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25.
31. Arai F, Yoshihara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, et al. Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1176:36-46.
32. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118(2):149-61.
33. Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, Nourigat C, Flowers D, Bakkour S, et al. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med*. 2000;6(11):1278-81.
34. Takeichi M, Hatta K, Nose A, Nagafuchi A. Identification of a gene family of cadherin cell adhesion molecules. *Cell Differ Dev*. 1988;25 Suppl:91-4.
35. Batard P, Monier MN, Fortunel N, Ducos K, Sansilvestri-Morel P, Phan T, et al. TGF-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 3):383-90.
36. Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, et al. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 1999;189(7):1139-48.
37. Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, Poznansky MC, et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*. 2006;439(7076):599-603.
38. Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*. 2006;124(2):407-21.

39. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6(2):230-47.
40. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980;56(2):289-301.
41. Dexter TM. Stromal cell associated haemopoiesis. *J Cell Physiol Suppl*. 1982;1:87-94.
42. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-50.
43. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007;213(2):341-7.
44. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991;78(1):55-62.
45. Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*. 2002;46(12):3349-60.
46. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007;131(2):324-36.
47. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
48. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.
49. Liau LL, Ruszymah BHI, Ng MH, Law JX. Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells. *Curr Res Transl Med*. 2019.
50. Lushaj EB, Anstadt E, Haworth R, Roenneburg D, Kim J, Hematti P, et al. Mesenchymal stromal cells are present in the heart and promote growth of adult stem cells in vitro. *Cytotherapy*. 2011;13(4):400-6.
51. in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*. 2003;88(8):845-52.

52. Hematti P. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors: an overview. *Methods Mol Biol.* 2011;690:163-74.
53. Trivedi P, Hematti P. Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells. *Exp Hematol.* 2008;36(3):350-9.
54. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* 2005;129(1):118-29.
55. Kim J, Breunig MJ, Escalante LE, Bhatia N, Denu RA, Dollar BA, et al. Biologic and immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells derived from human pancreatic islets. *Cytotherapy.* 2012;14(8):925-35.
56. Fang B, Song Y, Liao L, Zhang Y, Zhao RC. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplant Proc.* 2007;39(10):3358-62.
57. Hanson SE, Gutowski KA, Hematti P. Clinical applications of mesenchymal stem cells in soft tissue augmentation. *Aesthet Surg J.* 2010;30(6):838-42.
58. Gu Z, Akiyama K, Ma X, Zhang H, Feng X, Yao G, et al. Transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells alleviates lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Lupus.* 2010;19(13):1502-14.
59. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276(5309):71-4.
60. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 1999;181(1):67-73.
61. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2001;226(6):507-20.
62. Carrancio S, Lopez-Holgado N, Sanchez-Guijo FM, Villaron E, Barbado V, Tabera S, et al. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol.* 2008;36(8):1014-21.
63. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 2000;28(8):875-84.
64. Zhang D, Lu H, Chen Z, Wang Y, Lin J, Xu S, et al. High glucose induces the aging of mesenchymal stem cells via Akt/mTOR signaling. *Mol Med Rep.* 2017;16(2):1685-90.

65. Lennon DP, Haynesworth SE, Young RG, Dennis JE, Caplan AI. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 1995;219(1):211-22.
66. Tsao MC, Walthall BJ, Ham RG. Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *J Cell Physiol.* 1982;110(2):219-29.
67. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol.* 1998;176(1):57-66.
68. Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J, et al. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Eng.* 2002;8(5):739-51.
69. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol.* 1974;2(2):83-92.
70. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5.
71. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
72. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000;61(4):364-70.
73. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* 2001;98(9):2615-25.
74. Sgodda M, Aurich H, Kleist S, Aurich I, Konig S, Dollinger MM, et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. *Exp Cell Res.* 2007;313(13):2875-86.
75. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 9):1827-35.
76. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol.* 2002;30(7):783-91.

77. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*. 2007;109(4):1743-51.
78. Deschaseaux F, Gindraux F, Saadi R, Obert L, Chalmers D, Herve P. Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45^{med,low} phenotype. *Br J Haematol*. 2003;122(3):506-17.
79. Martinez C, Hofmann TJ, Marino R, Dominici M, Horwitz EM. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood*. 2007;109(10):4245-8.
80. Buhring HJ, Battula VL, Tremel S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1106:262-71.
81. Jung EM, Kwon O, Kwon KS, Cho YS, Rhee SK, Min JK, et al. Evidences for correlation between the reduced VCAM-1 expression and hyaluronan synthesis during cellular senescence of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;404(1):463-9.
82. Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*. 2006;24(4):1030-41.
83. Barry FP, Murphy JM, English K, Mahon BP. Immunogenicity of adult mesenchymal stem cells: lessons from the fetal allograft. *Stem Cells Dev*. 2005;14(3):252-65.
84. Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells*. 2017;35(4):851-8.
85. Hoogduijn MJ, Popp F, Verbeek R, Masoodi M, Nicolaou A, Baan C, et al. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(12):1496-500.
86. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):386-98.
87. Hsu WT, Lin CH, Chiang BL, Jui HY, Wu KK, Lee CM. Prostaglandin E2 potentiates mesenchymal stem cell-induced IL-10+IFN-gamma+CD4+ regulatory T cells to control transplant arteriosclerosis. *J Immunol*. 2013;190(5):2372-80.
88. Gao F, Chiu SM, Motan DA, Zhang Z, Chen L, Ji HL, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2062.

89. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75(3):389-97.
90. Ge W, Jiang J, Arp J, Liu W, Garcia B, Wang H. Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Transplantation*. 2010;90(12):1312-20.
91. Jarvinen L, Badri L, Wettlaufer S, Ohtsuka T, Standiford TJ, Toews GB, et al. Lung resident mesenchymal stem cells isolated from human lung allografts inhibit T cell proliferation via a soluble mediator. *J Immunol*. 2008;181(6):4389-96.
92. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007;109(1):228-34.
93. Yuan X, Logan TM, Ma T. Metabolism in Human Mesenchymal Stromal Cells: A Missing Link Between hMSC Biomanufacturing and Therapy? *Front Immunol*. 2019;10:977.
94. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):141-50.
95. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavie G, Thery C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):9-17.
96. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):195-208.
97. Du T, Ju G, Wu S, Cheng Z, Cheng J, Zou X, et al. Microvesicles derived from human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote human renal cancer cell growth and aggressiveness through induction of hepatocyte growth factor. *PLoS One*. 2014;9(5):e96836.
98. Nojehdehi S, Soudi S, Hesampour A, Rasouli S, Soleimani M, Hashemi SM. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on experimental type-1 autoimmune diabetes. *J Cell Biochem*. 2018;119(11):9433-43.
99. Aghajani Nargesi A, Lerman LO, Eirin A. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for kidney repair: current status and looming challenges. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):273.
100. Yu B, Kim HW, Gong M, Wang J, Millard RW, Wang Y, et al. Exosomes secreted from GATA-4 overexpressing mesenchymal stem cells serve as a reservoir of anti-apoptotic microRNAs for cardioprotection. *Int J Cardiol*. 2015;182:349-60.

101. Toh WS, Zhang B, Lai RC, Lim SK. Immune regulatory targets of mesenchymal stromal cell exosomes/small extracellular vesicles in tissue regeneration. *Cytotherapy*. 2018;20(12):1419-26.
102. Showalter MR, Wancewicz B, Fiehn O, Archard JA, Clayton S, Wagner J, et al. Primed mesenchymal stem cells package exosomes with metabolites associated with immunomodulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;512(4):729-35.
103. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007;110(10):3499-506.
104. Chen PM, Yen ML, Liu KJ, Sytwu HK, Yen BL. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 2011;18:49.
105. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belezmezova K, et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):552-70.
106. www.clinicaltrials.gov.
107. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(6):1445-51.
108. Galipeau J, Sensebe L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell*. 2018;22(6):824-33.
109. Kota DJ, Prabhakara KS, Toledano-Furman N, Bhattarai D, Chen Q, DiCarlo B, et al. Prostaglandin E2 Indicates Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem Cells in Experimental Traumatic Brain Injury. *Stem Cells*. 2017;35(5):1416-30.
110. Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(12):2173-85.
111. Venkatesh K, Sen D. Mesenchymal Stem Cells as a Source of Dopaminergic Neurons: A Potential Cell Based Therapy for Parkinson's Disease. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2017;12(4):326-47.
112. Ward MR, Abadeh A, Connelly KA. Concise Review: Rational Use of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Ischemic Heart Disease. *Stem Cells Transl Med*. 2018;7(7):543-50.
113. Ding DC, Chang YH, Shyu WC, Lin SZ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant*. 2015;24(3):339-47.

114. Cunningham CJ, Redondo-Castro E, Allan SM. The therapeutic potential of the mesenchymal stem cell secretome in ischaemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018;38(8):1276-92.
115. Mohr A, Zwacka R. The future of mesenchymal stem cell-based therapeutic approaches for cancer - From cells to ghosts. *Cancer Lett.* 2018;414:239-49.
116. Fisher SA, Doree C, Mathur A, Taggart DP, Martin-Rendon E. Stem cell therapy for chronic ischaemic heart disease and congestive heart failure. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;12:CD007888.
117. Yan W, Abu-El-Rub E, Saravanan S, Kirshenbaum LA, Arora RC, Dhingra S. Inflammation in myocardial injury: mesenchymal stem cells as potential immunomodulators. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2019;317(2):H213-H25.
118. Perasso L, Cogo CE, Giunti D, Gandolfo C, Ruggeri P, Uccelli A, et al. Systemic administration of mesenchymal stem cells increases neuron survival after global cerebral ischemia in vivo (2VO). *Neural Plast.* 2010;2010:534925.
119. Cofano F, Boido M, Monticelli M, Zenga F, Ducati A, Vercelli A, et al. Mesenchymal Stem Cells for Spinal Cord Injury: Current Options, Limitations, and Future of Cell Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11).
120. Cho JW, Seo MS, Kang KK, Sung SE. Effect of human thymus adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on myocardial infarction in rat model. *Regen Ther.* 2019;11:192-8.
121. Musial-Wysocka A, Kot M, Sulkowski M, Majka M. Regenerative Potential of the Product "CardioCell" Derived from the Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells for Treating Hindlimb Ischemia. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18).
122. Filomeno P, Dayan V, Tourino C. Stem cell research and clinical development in tendon repair. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2012;2(3):204-11.
123. Riazifar M, Mohammadi MR, Pone EJ, Yeri A, Lasser C, Segaliny AI, et al. Stem Cell-Derived Exosomes as Nanotherapeutics for Autoimmune and Neurodegenerative Disorders. *ACS Nano.* 2019;13(6):6670-88.
124. Heidari Barchi Nezhad R, Asadi F, Abtahi Froushani SM, Hassanshahi G, Kaeidi A, Khanamani Falahati-Pour S, et al. The effects of transplanted mesenchymal stem cells treated with 17-b estradiol on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Biol Rep.* 2019.
125. Valitsky M, Benhamron S, Nitzan K, Karussis D, Ella E, Abramsky O, et al. Cerebrospinal Fluid (CSF) Exchange with Artificial CSF Enriched with Mesenchymal Stem Cell Secretions Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7).

126. Vigo T, La Rocca C, Faicchia D, Procaccini C, Ruggieri M, Salvetti M, et al. IFN β enhances mesenchymal stromal (Stem) cells immunomodulatory function through STAT1-3 activation and mTOR-associated promotion of glucose metabolism. *Cell Death Dis.* 2019;10(2):85.

127. Kurtzberg J, Prockop S, Teira P, Bittencourt H, Lewis V, Chan KW, et al. Allogeneic human mesenchymal stem cell therapy (remestemcel-L, Prochymal) as a rescue agent for severe refractory acute graft-versus-host disease in pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(2):229-35.

128. FDA. Guidance for industry – implementation of acceptable full-length donor history questionnaire and accompanying materials for use in screening donors of blood and blood components U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration

Center for Biologics Evaluation and Research Rockville, MD. 2006.

129. FDA. Human cells, tissues, and cellular and tissue-based products. Report No: 21. 2005.

130. FACT-JACIE. International standard for cellular therapy product collection, processing, and administration. 2008.

131. AABB. Standards for cellular therapy product services, 4th edn. AABB, Bethesda

29. International Society for Stem Cell Research (2008) Guidelines for the clinical translation of stem cells Dec 3, 2008 ISSCR, Skokie, IL. United States Pharmacopeial Convention, Inc.

Rockville, MD. 2009.

132. Ancans J. Cell therapy medicinal product regulatory framework in Europe and its application for MSC-based therapy development. *Front Immunol.* 2012;3:253.

133. Phinney DG, Galipeau J, Msc Committee Of The International Society Of C, Gene T. Manufacturing mesenchymal stromal cells for clinical applications: A survey of Good Manufacturing Practices at U.S. academic centers. *Cytotherapy.* 2019;21(7):782-92.

134. Pal R, Hanwate M, Totey SM. Effect of holding time, temperature and different parenteral solutions on viability and functionality of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells before transplantation. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008;2(7):436-44.

135. Haack-Sorensen M, Bindslev L, Mortensen S, Friis T, Kastrup J. The influence of freezing and storage on the characteristics and functions of human mesenchymal stromal cells isolated for clinical use. *Cytotherapy.* 2007;9(4):328-37.

136. Hematti P, Keating A. *Mesenchymal Stromal Cells Biology and Clinical Applications*. Humana Press. 2013.
137. Le Blanc K, Rasmusson I, Gotherstrom C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol*. 2004;60(3):307-15.
138. Matthay MA, Thompson BT, Read EJ, McKenna DH, Jr., Liu KD, Calfee CS, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for severe acute lung injury. *Chest*. 2010;138(4):965-72.
139. Bernardo ME, Avanzini MA, Ciccocioppo R, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, et al. Phenotypical/functional characterization of in vitro-expanded mesenchymal stromal cells from patients with Crohn's disease. *Cytotherapy*. 2009;11(7):825-36.
140. De Bari C, Dell'Accio F, Karystinou A, Guillot PV, Fisk NM, Jones EA, et al. A biomarker-based mathematical model to predict bone-forming potency of human synovial and periosteal mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*. 2008;58(1):240-50.
141. Wagner W, Wein F, Roderburg C, Saffrich R, Diehlmann A, Eckstein V, et al. Adhesion of human hematopoietic progenitor cells to mesenchymal stromal cells involves CD44. *Cells Tissues Organs*. 2008;188(1-2):160-9.
142. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2010;107(7):913-22.
143. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*. 2002;20(6):530-41.
144. Haack-Sorensen M, Friis T, Bindslev L, Mortensen S, Johnsen HE, Kastrup J. Comparison of different culture conditions for human mesenchymal stromal cells for clinical stem cell therapy. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008;68(3):192-203.
145. Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Dejeneffe M, Massy M, Libertalis M, et al. Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *Eur J Haematol*. 2006;76(4):309-16.
146. Lange C, Cakiroglu F, Spiess AN, Cappallo-Obermann H, Dierlamm J, Zander AR. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007;213(1):18-26.

147. Heiskanen A, Satomaa T, Tiitinen S, Laitinen A, Mannelin S, Impola U, et al. N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells*. 2007;25(1):197-202.
148. Standardization WECOB. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. . Report No: WHO/BS/102132. 2010.
149. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(13):8932-7.
150. Simoes IN, Boura JS, dos Santos F, Andrade PZ, Cardoso CM, Gimble JM, et al. Human mesenchymal stem cells from the umbilical cord matrix: successful isolation and ex vivo expansion using serum-/xeno-free culture media. *Biotechnol J*. 2013;8(4):448-58.
151. Chase LG, Lakshmipathy U, Solchaga LA, Rao MS, Vemuri MC. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(1):8.
152. Lindroos B, Boucher S, Chase L, Kuokkanen H, Huhtala H, Haataja R, et al. Serum-free, xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells in vitro. *Cytotherapy*. 2009;11(7):958-72.
153. Shepherd AJ, Wilson NJ, Smith KT. Characterisation of endogenous retrovirus in rodent cell lines used for production of biologicals. *Biologicals*. 2003;31(4):251-60.
154. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol*. 2004;32(12):1212-25.
155. Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: Choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells*. 2005;23(9):1357-66.
156. Turnovcova K, Ruzickova K, Vanecek V, Sykova E, Jendelova P. Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media. *Cytotherapy*. 2009;11(7):874-85.
157. Gospodarowicz D, Ill CR. Do plasma and serum have different abilities to promote cell growth? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(5):2726-30.
158. Balk SD, Levine SP, Young LL, LaFleur MM, Raymond NM. Mitogenic factors present in serum but not in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(9):5656-60.

159. Zapata JC, Cox D, Salvato MS. The role of platelets in the pathogenesis of viral hemorrhagic fevers. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(6):e2858.
160. George JN. Platelets. *Lancet*. 2000;355(9214):1531-9.
161. Xiong G, Lingampalli N, Koltsov JCB, Leung LL, Bhutani N, Robinson WH, et al. Men and Women Differ in the Biochemical Composition of Platelet-Rich Plasma. *Am J Sports Med*. 2018;46(2):409-19.
162. Burnouf T, Strunk D, Koh MB, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. 2016;76:371-87.
163. Beaulieu LM, Freedman JE. The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes. *Thromb Res*. 2010;125(3):205-9.
164. Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun*. 2002;70(12):6524-33.
165. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):585-601.
166. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*. 2009;37(11):2259-72.
167. Schar MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nestic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clin Orthop Relat Res*. 2015;473(5):1635-43.
168. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components Recommendation No. R (95) 15 19th Edition. 2017:326-7.
169. Technical Manual. AABB. 2008:223-5.
170. Ulusal Kan ve Kan Bileşenleri Hazırlama Kullanım ve Kalite Güvencesi Rehberi 2016.
171. Schallmoser K, Strunk D. Preparation of pooled human platelet lysate (pHPL) as an efficient supplement for animal serum-free human stem cell cultures. *J Vis Exp*. 2009(32).
172. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*. 2005;205(2):228-36.

173. Azuma H, Hirayama J, Akino M, Ikeda H. Platelet additive solution - electrolytes. *Transfus Apher Sci.* 2011;44(3):277-81.
174. Kinzebach S, Dietz L, Kluter H, Thierse HJ, Bieback K. Functional and differential proteomic analyses to identify platelet derived factors affecting ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol.* 2013;14:48.
175. Bernardi M, Albiero E, Alghisi A, Chiericato K, Lievore C, Madeo D, et al. Production of human platelet lysate by use of ultrasound for ex vivo expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2013;15(8):920-9.
176. Strandberg G, Sellberg F, Sommar P, Ronaghi M, Lubenow N, Knutson F, et al. Standardizing the freeze-thaw preparation of growth factors from platelet lysate. *Transfusion.* 2017;57(4):1058-65.
177. Yin W, Xu H, Sheng J, Zhu Z, Jin D, Hsu P, et al. Optimization of pure platelet-rich plasma preparation: A comparative study of pure platelet-rich plasma obtained using different centrifugal conditions in a single-donor model. *Exp Ther Med.* 2017;14(3):2060-70.
178. Ulusal Kan ve Kan Ürünleri Rehberi. 2011:223-7.
179. Chan RK, Liu P, Lew DH, Ibrahim SI, Srey R, Valeri CR, et al. Expired liquid preserved platelet releasates retain proliferative activity. *J Surg Res.* 2005;126(1):55-8.
180. Paglia G, Sigurjonsson OE, Rolfsson O, Valgeirsdottir S, Hansen MB, Brynjolfsson S, et al. Comprehensive metabolomic study of platelets reveals the expression of discrete metabolic phenotypes during storage. *Transfusion.* 2014;54(11):2911-23.
181. Johnson L, Waters L, Green S, Wood B, Marks DC. Freezing expired platelets does not compromise in vitro quality: An opportunity to maximize inventory potential. *Transfusion.* 2019.
182. Yilmaz S, Cetinkaya RA, Eker I, Unlu A, Uyanik M, Tapan S, et al. Freezing of Apheresis Platelet Concentrates in 6% Dimethyl Sulfoxide: The First Preliminary Study in Turkey. *Turk J Haematol.* 2016;33(1):28-33.
183. Kelly K, Dumont LJ. Frozen platelets. *Transfus Apher Sci.* 2019;58(1):23-9.
184. Jonsdottir-Buch SM, Lieder R, Sigurjonsson OE. Platelet lysates produced from expired platelet concentrates support growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 2013;8(7):e68984.

185. Abdelrazik H, Spaggiari GM, Chiossone L, Moretta L. Mesenchymal stem cells expanded in human platelet lysate display a decreased inhibitory capacity on T- and NK-cell proliferation and function. *Eur J Immunol*. 2011;41(11):3281-90.
186. Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJ, Faloppa F, Belloti JC. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013(12):CD010071.
187. Svajger U. Human platelet lysate is a successful alternative serum supplement for propagation of monocyte-derived dendritic cells. *Cytotherapy*. 2017;19(4):486-99.
188. Hofbauer P, Riedl S, Witzeneder K, Hildner F, Wolbank S, Groeger M, et al. Human platelet lysate is a feasible candidate to replace fetal calf serum as medium supplement for blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Cytotherapy*. 2014;16(9):1238-44.
189. Ruggiu A, Ulivi V, Sanguineti F, Cancedda R, Descalzi F. The effect of Platelet Lysate on osteoblast proliferation associated with a transient increase of the inflammatory response in bone regeneration. *Biomaterials*. 2013;34(37):9318-30.
190. Astori G, Amati E, Bambi F, Bernardi M, Chiericato K, Schafer R, et al. Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):93.
191. Dozza B, Di Bella C, Lucarelli E, Giavaresi G, Fini M, Tazzari PL, et al. Mesenchymal stem cells and platelet lysate in fibrin or collagen scaffold promote non-cemented hip prosthesis integration. *J Orthop Res*. 2011;29(6):961-8.
192. Lange C, Brunswig-Spickenheier B, Eissing L, Scheja L. Platelet lysate suppresses the expression of lipocalin-type prostaglandin D2 synthase that positively controls adipogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res*. 2012;318(18):2284-96.
193. Flemming A, Schallmoser K, Strunk D, Stolk M, Volk HD, Seifert M. Immunomodulative efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured in human platelet lysate. *J Clin Immunol*. 2011;31(6):1143-56.
194. Perez-Illarbe M, Diez-Campelo M, Aranda P, Tabera S, Lopez T, del Canizo C, et al. Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. *Transfusion*. 2009;49(9):1901-10.
195. Bieback K, Fernandez-Munoz B, Pati S, Schafer R. Gaps in the knowledge of human platelet lysate as a cell culture supplement for cell therapy: a joint publication from the AABB and the International Society for Cell & Gene Therapy. *Cytotherapy*. 2019;21(9):911-24.

196. Muraglia A, Todeschi MR, Papait A, Poggi A, Spano R, Strada P, et al. Combined platelet and plasma derivatives enhance proliferation of stem/progenitor cells maintaining their differentiation potential. *Cytotherapy*. 2015;17(12):1793-806.
197. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnie H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006;81(10):1390-7.
198. Le Blanc K, Frasson F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371(9624):1579-86.
199. Kebriaei P, Hayes J, Daly A, Uberti J, Marks DI, Soiffer R, et al. A Phase 3 Randomized Study of Remestemcel-L versus Placebo Added to Second-Line Therapy in Patients with Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019.
200. Noone C, Kihm A, English K, O'Dea S, Mahon BP. IFN-gamma stimulated human umbilical-tissue-derived cells potently suppress NK activation and resist NK-mediated cytotoxicity in vitro. *Stem Cells Dev*. 2013;22(22):3003-14.
201. Gupta PK, Das AK, Chullikana A, Majumdar AS. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther*. 2012;3(4):25.
202. El Omar R, Beroud J, Stoltz JF, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng Part B Rev*. 2014;20(5):523-44.
203. Lee SJ, Yi T, Ahn SH, Lim DK, Kim SN, Lee HJ, et al. Comparative study on metabolite level in tissue-specific human mesenchymal stem cells by an ultra-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2018;1024:112-22.
204. Xu X, Duan S, Yi F, Ocampo A, Liu GH, Izpisua Belmonte JC. Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. *Cell Metab*. 2013;18(3):325-32.
205. Yetkin-Arik B, Vogels IMC, Nowak-Sliwinska P, Weiss A, Houtkooper RH, Van Noorden CJF, et al. The role of glycolysis and mitochondrial respiration in the formation and functioning of endothelial tip cells during angiogenesis. *Sci Rep*. 2019;9(1):12608.
206. Shyh-Chang N, Daley GQ, Cantley LC. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development*. 2013;140(12):2535-47.
207. Bertolo A, Capossela S, Frankl G, Baur M, Potzel T, Stoyanov J. Oxidative status predicts quality in human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):3.

208. Zhang J, Nuebel E, Daley GQ, Koehler CM, Teitell MA. Metabolic regulation in pluripotent stem cells during reprogramming and self-renewal. *Cell Stem Cell*. 2012;11(5):589-95.
209. Corbet C. Stem Cell Metabolism in Cancer and Healthy Tissues: Pyruvate in the Limelight. *Front Pharmacol*. 2017;8:958.
210. Osiezagha K, Ali S, Freeman C, Barker NC, Jabeen S, Maitra S, et al. Thiamine deficiency and delirium. *Innov Clin Neurosci*. 2013;10(4):26-32.
211. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, Deberardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, et al. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. 2010;7(3):380-90.
212. Panopoulos AD, Yanes O, Ruiz S, Kida YS, Diep D, Tautenhahn R, et al. The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res*. 2012;22(1):168-77.
213. MacIntyre DA, Melguizo Sanchis D, Jimenez B, Moreno R, Stojkovic M, Pineda-Lucena A. Characterisation of human embryonic stem cells conditioning media by ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *PLoS One*. 2011;6(2):e16732.
214. Cezar GG, Quam JA, Smith AM, Rosa GJ, Piekarczyk MS, Brown JF, et al. Identification of small molecules from human embryonic stem cells using metabolomics. *Stem Cells Dev*. 2007;16(6):869-82.
215. Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2010;28(8):848-55.
216. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell*. 2004;6(4):483-95.
217. De Pascale MR, Sommese L, Casamassimi A, Napoli C. Platelet derivatives in regenerative medicine: an update. *Transfus Med Rev*. 2015;29(1):52-61.
218. van der Meer PF, Cancelas JA, Vassallo RR, Rugg N, Einarson M, Hess JR, et al. Evaluation of the overnight hold of whole blood at room temperature, before component processing: platelets (PLTs) from PLT-rich plasma. *Transfusion*. 2011;51:45s-9s.
219. Jonsdottir-Buch SM, Sigurgrimsdottir H, Lieder R, Sigurjonsson OE. Expired and Pathogen-Inactivated Platelet Concentrates Support Differentiation and Immunomodulation of Mesenchymal Stromal Cells in Culture. *Cell Transplant*. 2015;24(8):1545-54.

220. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*. 2007;47(8):1436-46.
221. Burnouf T, Chou ML, Wu YW, Su CY, Lee LW. Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria. *Transfusion*. 2013;53(1):138-46.
222. Kim SH, Das A, Chai JC, Binas B, Choi MR, Park KS, et al. Transcriptome sequencing wide functional analysis of human mesenchymal stem cells in response to TLR4 ligand. *Sci Rep*. 2016;6:30311.
223. Herzmann N, Salamon A, Fiedler T, Peters K. Lipopolysaccharide induces proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stromal cells in vitro via TLR4 activation. *Exp Cell Res*. 2017;350(1):115-22.
224. Hou YS, Liu LY, Chai JK, Yu YH, Duan HJ, Hu Q, et al. Lipopolysaccharide pretreatment inhibits LPS-induced human umbilical cord mesenchymal stem cell apoptosis via upregulating the expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *Mol Med Rep*. 2015;12(2):2521-8.
225. Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Delforge A, Massy M, Mortier C, et al. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy*. 2004;6(4):372-9.
226. Farrokhi A, Eslaminejad MB, Nazarian H, Moradmamand A, Samadian A, Akhlaghi A. Appropriate reference gene selection for real-time PCR data normalization during rat mesenchymal stem cell differentiation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2012;58 Suppl:OL1660-70.
227. Aghajanova L, Houshdaran S, Balayan S, Manvelyan E, Irwin JC, Huddleston HG, et al. In vitro evidence that platelet-rich plasma stimulates cellular processes involved in endometrial regeneration. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(5):757-70.
228. Chen X, Zhang ZY, Zhou H, Zhou GW. Characterization of mesenchymal stem cells under the stimulation of Toll-like receptor agonists. *Dev Growth Differ*. 2014;56(3):233-44.
229. Wu Y, Li L. Sample normalization methods in quantitative metabolomics. *J Chromatogr A*. 2016;1430:80-95.
230. Ortmayr K, Charwat V, Kasper C, Hann S, Koellensperger G. Uncertainty budgeting in fold change determination and implications for non-targeted metabolomics studies in model systems. *Analyst*. 2016;142(1):80-90.

231. Liu Y, Yuan X, Munoz N, Logan TM, Ma T. Commitment to Aerobic Glycolysis Sustains Immunosuppression of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl Med.* 2019;8(1):93-106.
232. Kalhan SC, Hanson RW. Resurgence of serine: an often neglected but indispensable amino acid. *J Biol Chem.* 2012;287(24):19786-91.
233. Das UN. Pyruvate is an endogenous anti-inflammatory and anti-oxidant molecule. *Med Sci Monitor.* 2006;12(5):Ra79-Ra84.
234. Zhao JW, Cheng JW, Li CY, Xu MB, Ma CJ, Qin L, et al. Ethyl Pyruvate Attenuates CaCl₂-Induced Tubular Epithelial Cell Injury by Inhibiting Autophagy and Inflammatory Responses. *Kidney Blood Press R.* 2018;43(5):1585-95.
235. Li S, Liang F, Kwan K, Tang Y, Wang X, Tang Y, et al. Identification of ethyl pyruvate as a NLRP3 inflammasome inhibitor that preserves mitochondrial integrity. *Mol Med.* 2018;24(1):8.
236. Ji J, Fu T, Dong C, Zhu WY, Yang JL, Kong XL, et al. Targeting HMGB1 by ethyl pyruvate ameliorates systemic lupus erythematosus and reverses the senescent phenotype of bone marrow-mesenchymal stem cells. *Aging-U.S.* 2019;11(13):4338-53.
237. Higuera GA, Schop D, Spitters TW, van Dijkhuizen-Radersma R, Bracke M, de Bruijn JD, et al. Patterns of amino acid metabolism by proliferating human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(5-6):654-64.
238. Alberts BJ, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, P. *Molecular Biology of the Cell.* Garland Science. 2008;5th.
239. Avila MA, Garcia-Trevijano ER, Lu SC, Corrales FJ, Mato JM. Methylthioadenosine. *Int J Biochem Cell B.* 2004;36(11):2125-30.
240. Li Y, Wang Y, Wu P. 5'-Methylthioadenosine and Cancer: old molecules, new understanding. *J Cancer.* 2019;10(4):927-36.
241. Peng B, Ahrends R. Adaptation of Skyline for Targeted Lipidomics. *J Proteome Res.* 2016;15(1):291-301.
242. Qiu M, Liu X. Determination of sphinganine, sphingosine and Sa/So ratio in urine of humans exposed to dietary fumonisin B1. *Food Addit Contam.* 2001;18(3):263-9.
243. Moon SH, Kim JY, Song EH, Shin MK, Cho YH, Kim NI. Altered levels of sphingosine and sphinganine in psoriatic epidermis. *Ann Dermatol.* 2013;25(3):321-6.

244. Brogden G, Husein DM, Steinberg P, Naim HY. Isolation and Quantification of Sphingosine and Sphinganine from Rat Serum Revealed Gender Differences. *Biomolecules*. 2019;9(9).
245. Campos AM, Maciel E, Moreira AS, Sousa B, Melo T, Domingues P, et al. Lipidomics of Mesenchymal Stromal Cells: Understanding the Adaptation of Phospholipid Profile in Response to Pro-Inflammatory Cytokines. *J Cell Physiol*. 2016;231(5):1024-32.
246. Sun Y, Chen D, Liu J, Xu Y, Shi X, Luo X, et al. Metabolic profiling associated with autophagy of human placenta-derived mesenchymal stem cells by chemical isotope labeling LC-MS. *Exp Cell Res*. 2018;372(1):52-60.
247. Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD. II. Glutamine and glutamate. *Biomed Pharmacother*. 2002;56(9):446-57.
248. Amores-Sanchez MI, Medina MA. Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress. *Mol Genet Metab*. 1999;67(2):100-5.
249. Newsholme EA, Crabtree B, Ardawi MS. The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Biosci Rep*. 1985;5(5):393-400.
250. Newsholme P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J Nutr*. 2001;131(9):2515s-22s.
251. Agostini F, Ruzza M, Corpillo D, Biondi L, Acquadro E, Canepa B, et al. 1H-NMR and MALDI-TOF MS as metabolomic quality control tests to classify platelet derived medium additives for GMP compliant cell expansion procedures. *PLoS One*. 2018;13(9):e0203048.
252. Caseiro AR, Ivanova G, Pedrosa SS, Branquinho MV, Georgieva P, Barbosa PP, et al. Human umbilical cord blood plasma as an alternative to animal sera for mesenchymal stromal cells in vitro expansion - A multicomponent metabolomic analysis. *PLoS One*. 2018;13(10):e0203936.
253. Lefevre C, Panthu B, Naville D, Guibert S, Pinteur C, Elena-Herrmann B, et al. Metabolic Phenotyping of Adipose-Derived Stem Cells Reveals a Unique Signature and Intrinsic Differences between Fat Pads. *Stem Cells Int*. 2019;2019:9323864.
254. Singh K, Krug L, Basu A, Meyer P, Treiber N, Vander Beken S, et al. Alpha-Ketoglutarate Curbs Differentiation and Induces Cell Death in Mesenchymal Stromal Precursors with Mitochondrial Dysfunction. *Stem Cells*. 2017;35(7):1704-18.
255. Fujisawa K, Takami T, Fukui Y, Quintanilha LF, Matsumoto T, Yamamoto N, et al. Evaluating effects of L-carnitine on human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*. 2017;368(2):301-10.

256. Fujisawa K, Hara K, Takami T, Okada S, Matsumoto T, Yamamoto N, et al. Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):93.
257. Perrin-Cocon L, Agaugue S, Coutant F, Saint-Mezard P, Guironnet-Paquet A, Nicolas JF, et al. Lysophosphatidylcholine is a natural adjuvant that initiates cellular immune responses. *Vaccine.* 2006;24(9):1254-63.
258. Sabarirajan J, Vijayaraj P, Sarkar M, Nachiappan V. Effect of lipopolysaccharide on alteration of phospholipids and their fatty acid composition in spleen and thymus by in vitro metabolic labeling. *J Appl Toxicol.* 2013;33(6):418-25.



EKLER

**EK-1: Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
16969557-53 numaralı kararı**



**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 53

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 27.01.2016 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2016/03
Değerlendirme Tarihi : 27.01.2016
Karar No : 01

Etik Kurulumuza Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü tarafından değerlendirilmesi amacıyla gönderilmiş olan Kök Hücre ve Hücre Bankasına ait aydınlatılmış onam formunun amaç, yaklaşım ve uygulamalara yönelik yeterli bilgiyi barındırdığı görülmüş ve biyobanka amaçlı çalışmalarda kullanılmasının uygun olduğuna karar verilmiştir.

- | | |
|---|--|
| 1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan) | 9 Prof. Dr. Rahime Nohutçu (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nüket Ornek Buken (Üye) | 10. Prof. Dr. R. Köksal Özgül (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yücel Sara (Üye) | 11. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu (Üye) | İZİNLİ |
| İZİNLİ | 12. Prof. Dr. Leyla Dinç (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye) | 13. Prof. Dr. Hatice Doğan Buzoğlu (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | 14. Doç. Dr. S. Kutay Demirhan (Üye) |
| İZİNLİ | İZİNLİ |
| 7. Prof. Dr. Ali Düzova (Üye) | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Levent Akın (Üye) | İZİNLİ |
| | 16. Av. Meltem Onurlu (Üye) |

EK-2: Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi Biyobanka Bilgilendirilmiş Onam Formu (Erişkin verici için)

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ KÖK HÜCRE ARAŞTIRMA ve UYGULAMA MERKEZİ

BİYO BANKA BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

(ERİŞKİN VERİCİ İÇİN)

Yakınız veya kendi hastalığınız ile ilgili sizden alınan biyolojik örneklerin Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi bünyesindeki hücre/kök hücre biyobankasında araştırma amaçlı saklanması için onayınıza başvuruyoruz.

Biyobankalar, hücre/doku/DNA/serum/plazma/idrar gibi biyolojik örnek tanımına giren tüm örneklerin saklandığı ve bunlarla ilgili bilgilerin veri tabanlarında arşivlenerek gelecekteki çalışmalarda kullanılmak üzere uzun süreli korunduğu alt yapılardır. Biyobankalar, saklanan biyolojik örneklerin özelliğine ve bankanın amaçlarına göre farklı özelliklerdedir. Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin bünyesinde yer alan biyobanka, kök hücre/hücre bankası özelliğindedir.

Hücre/kök hücre bankası nedir?

Hücre bankaları; sağlıklı kişilerden ve/veya farklı hastalıkları olan hastalardan alınan kan, kemik iliği veya diğer doku örneklerinden elde edilen, laboratuvar ortamında geliştirilen hücre /kök hücrelerin ve bunlarla ilgili bilgilerin saklandığı alt yapılardır. Kök Hücreler, kan, kemik iliği veya diğer dokulardan elde edilen ve vücutta bulunan tüm hücre tiplerini oluşturabilen hücrelerdir. Bu özellikleriyle kök hücreler, hastalıkların tedavisi, mekanizmalarının anlaşılabilmesi, ilaç denemeleri ve tedaviye yönelik yeni yöntemlerin geliştirilebilmesi için kritik öneme sahiptirler.

Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin bünyesinde yer alan hücre ve kök hücre bankasında ne tür insan örnekleri saklanır?

Başta kan hastalıkları olmak üzere pek çok hastalıkta kan tablosunda bozukluklar meydana gelmekte ve hastalarda hayatı tehdit eden durumlar ortaya çıkabilmektedir. Merkezimizde, bu tip hastalığı olan hastalardan, ayrıca, sağlıklı ilik/kan nakli vericilerinden veya diğer gönüllü sağlıklı bireylerden elde edilen doku/hücre/kök hücreler ve ilgili bilgiler araştırmalarda kullanılmak üzere arşivlenerek saklanmaktadır. Bu arşivde, hastalığa ve genel sağlık durumuna ait veriler ile yaş, cinsiyet bilgileri tutulmaktadır.

Biyolojik örnekler nasıl saklanır ve ne gibi işlemler uygulanır?

Doku ve hücrelerin canlılığını yitirmeden uzun yıllar kalabilmesi için çok soğuk ortamlar (-80°C - -196°C) gereklidir. Bu koşullarda depolanan hücreler araştırmalarda kullanılabilir. Dokular doğrudan dondurularak saklanabildiği gibi laboratuvar ortamında hücreler/kök hücreler geliştirilerek de saklanabilmektedir. Ayrıca hücreler, çeşitli işlemlerden geçirilerek yeniden programlanıp IPS hücreleri (uyarılmış pluripotent kök hücre) elde edilebilmekte; bu hücrelerden de çeşitli doku/hücre ve hücre hatları üretilebilmektedir. Başlangıçta sizden alınan örnek ile kıyaslandığında tamamen farklı özellikler kazandırılmış olan bu hücreler, araştırma-geliştirme çalışmaları için günümüzde en fazla ilgi çeken hücrelerdir. İlaç araştırmaları, gen tedavileri, doku nakli, hücre tedavileri, doku mühendisliği alanlarında kullanım potansiyeline sahiptirler. Yüksek maliyet ve ileri teknoloji gerektiren bu üretim süreci, merkezimizin/üniversitemizin bütçesi ve olanakları ile karşılanmaktadır. İzniniz doğrultusunda, çoklu işlemlerle tamamen farklı özellik kazandırılacak olan hücreler kök hücre bankamızın arşivi bünyesine dahil edilmektedir. Bu aşamadan itibaren bu hücreler yeniden izniniz sunulmaksızın araştırma - geliştirme (ar-ge) faaliyetlerinde kullanılmak üzere yurt içi ve yurt dışı üniversiteler, kamu kurum ve kuruluşları ile ar-ge ve ilaç firmaları ile de paylaşılacaktır. Örnekleriniz hücre bankamızda sınırsız süre ile saklanacak ve daimi hücre kaynağı olarak kullanılacaktır.

Örnekler nasıl toplanıyor ve olası riskler nelerdir?

Biyolojik örnekler kan, kemik iliği veya diğer dokular olabilmektedir. Araştırma amaçlı saklanacak biyolojik örneklerin alınması için size tıbbi gereklilik nedeniyle yapılan girişimler dışında herhangi bir ek girişim yapılmayacaktır. Biyolojik örnekler, hasta veya vericiden tıbbi amaçla gereken koşullarda (ameliyathane veya servis koşullarında) toplanacaktır. Sizden kemik iliği veya herhangi bir doku örneği alınması gerekiyorsa o işlem sırasında alınan örneklerden tıbbi amaç için kullanılacak miktardan arta kalanı kullanılacak ya da toplanan biyolojik örneklerin kullanılmayan/atık kısımları araştırmalarda kullanılmak üzere saklanacaktır. Bunun için size örnek alma amaçlı olarak ek bir girişim yapılmayacağından örnek bağışlamanız fiziksel risk içermemektedir. Kan/kemik iliği nakli işlemlerinde vericilerinden hastanın ihtiyacına ve vericinin yaşına/ağırlığına göre değişmek üzere yaklaşık 300-1400 ml hücresel ürün toplanmaktadır. Bunun yalnızca 1-5 ml'si araştırmalarda kullanılmak üzere saklanacaktır. Ayrıca, tıbbi gerekçelerle kan alınırken araştırmalar için ek olarak 5-7 ml kan alınıp saklanacaktır. Ek olarak alınacak kan/ilik, sizin için risk oluşturmamaktadır.

Kemik iliği/kan nakli vericilerine de tıbbi gereklilik dışında ek bir girişim yapılmayacağından bankaya bağışlanacak örnek için herhangi bir fiziksel risk mevcut değildir. Gönüllü olarak kan bağışı yapmanız durumunda alınacak örneğe göre ilgili bölgede kızarma, morarma gibi kalıcı olmayan, hafif riskler yaşanabilecektir.

Sağlık kayıtlarımdan neden bilgi vermem gerekiyor?

Bankalanmak üzere sizden alınacak olan biyolojik örnekler yanında size ait tanımlayıcı bilgiler de kaydedilecektir. Bu bilgiler, ileride yapılacak araştırmaların değerlendirilmesi, karşılaştırmalı çalışmaların yapılabilmesi, farklı hastalıklar veya farklı özelliklere sahip kişilere ait araştırma sonuçlarının doğru yorumlanabilmesi için gereklidir.

Gizliliğim nasıl korunacak?

Biyolojik örnekleriniz kişisel ve tıbbi bilgileriniz ile birlikte şifre korumalı bilgisayarlar kaydedilmektedir ve bu bilgisayarlar yalnızca yetkilendirilmiş biyobanka ekibi erişim sağlayabilmektedir. Biyolojik örnekleriniz kodlanarak saklanacaktır, tanımlayıcı kimlik (isim, soyadı, gibi) ve iletişim bilgileriniz "6698 sayılı, Kişisel Verilerin Korunması Kanunu" gereğince korunacaktır. Örnekler, araştırma başlamadan önce bağımsız etik kurul tarafından onay almış projelerde kullanılacaktır. Bu kişisel bilgiler laboratuvar sonuçları, araştırma sonuçları gibi çıktılarda kullanılmayacaktır. Sadece gerektiğinde, çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurul ya da resmi makamlarca incelenebilecektir. Tıbbi bilgiler ve araştırma sonuçları bilimsel nitelikteki toplantılarda/yayınlarda kimlik belirtilmeden kullanılabilir, yurt içi ve yurt dışı veri bankaları ile kimlik belirtilmeden paylaşılabilir.

Örneklerimin hücre bankasına bağışlanmasına nasıl katılabilirim? Fikrimi değiştirirsem ne olur?

Onay verdiğiniz takdirde sizden alınacak biyolojik örnekler araştırmalarda kullanılmak üzere hücre bankasına bağışlanmış olacaktır. Hücrelerin farklı işlemlerden geçirilerek yeniden programlanması ve banka arşivine katılması için de ayrıca onayınıza başvurulacaktır. Onamınızı ve biyolojik örneğinizi her zaman çekme hakkına sahipsiniz. Geri çekilme durumunda sağlık hizmetleri ve haklarınızda herhangi bir kısıtlama olmayacaktır. Talebiniz doğrultusunda örneğinizi ve verilerinizi imha edilecektir. Toplanan biyolojik örneklerden laboratuvar koşullarında uyarılmış hücre/hücre hattı oluşturulmasından itibaren hücrelerin tüm hakları Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne aktarılmış olacak ve bu örneklerin imhası veya geri çekilmesi mümkün olmayacak, gizlilik korunarak araştırmalarda kullanılabilir.

Örneklerimin hangi amaçla kullanılacağına karar verebilir miyim?

Bankalama amaçlı örnek bağışladığınız takdirde size bahsedilen alanları içeren araştırmalarda kullanılmasına onay vermiş oluyorsunuz. Bu örnekler genetik araştırmalar (DNA, RNA) da dahil olmak üzere tüm bilimsel çalışmalarda ve eğitim amaçlı olarak da kullanılabilir. Ayrıca örnekleriniz, ticari amaçlı ürün/ilaç geliştirmeye yönelik ar-ge çalışmaları ya da doku, hücre/hücre hattı üretimi amacıyla da kullanılabilir, talep doğrultusunda araştırmacılarla paylaşılabilir. Bu alanlarda kullanım sizin izninizle bağlıdır.

Örnek bağışı ile ilgili bana bir ödeme yapılacak mı? Bana bir yararı olacak mı?

Örnek bağışınız ile ilgili olarak sizden hiçbir ücret talep edilmeyecek ve size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır. Örnekler, ticari bir karşılığı olmaksızın, gönüllük esasına dayalı olarak toplanmaktadır. Biyolojik örneklerinizin araştırma amaçlı saklanması kısa vadede size bir yarar sağlamayacaktır. Sizin/yakınınızın hastalığı veya diğer hastalıkları ilgilendiren araştırmalarda kullanılabilir ve bu durum hastalıkların izlemine ışık tutacak bilgiler ortaya çıkarabilir. Ancak bunun size doğrudan bir fayda sağlaması beklenmemektedir. Elde edilen hücreler halen devam eden veya ileride yapılacak ar-ge çalışmalarında kullanılabilir. Bu araştırmalar şu anda tanımlanmamış olsa bile sizin/yakınınızın hastalığının ya da diğer hastalıkların tanı ve tedavisine yönelik olacaktır.

Örneklerimin kullanıldığı araştırma sonuçlarını öğrenebilecek miyim?

Belirli bir araştırma amaçlı örnek bağışlanması durumunda araştırma sonuçlarını öğrenmeniz talebinize bağlıdır. Ancak bankalama amaçlı örnek bağışlamanız durumunda, örneğiniz farklı araştırmalarda farklı araştırmacılar tarafından kullanılabilir. Bu nedenle sonuçların size bildirilmesi her zaman mümkün olmayacaktır. Ayrıca örneklerinizin kodlanarak saklanmış olmaları ve kişisel verilerinize ulaşımında kısıtlılık olması nedeniyle sonuçların paylaşılması biyobanka işleyişi ile de uyumlu değildir. Ancak araştırma sonuçlarının sizin/yakınınızın hastalığının önlenmesi veya tedavisine yönelik ümit vadeden bulgular içermesi ve araştırmacılar tarafından bankamıza bildirilmesi durumunda, yine talebiniz doğrultusunda sizinle paylaşılabilir.

Örnek bağışım ile ilgili bir sorum olduğunda kime sorabilirim?

Sorularınız için Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü, Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya (0 533 740 7524) ile görüşebilirsiniz.

ONAM BİLDİRİMİ

	İzin	İmza
Örneklerimin hücre bankasında saklanması ve araştırmalarda kullanılmasına	İZİN VERİYORUM.	
IPS hücre geliştirilmesine ve ileri araştırmalar (ticari ürün ve ilaç geliştirme, doku, hücre/hücre hattı üretimi, doku mühendisliği çalışmaları...) yapılmasına	İZİN VERİYORUM.	
Tıbbi bilgilerimin ve araştırma sonuçlarının yurt içi/yurt dışı veri bankalarına eklenmesine, başka araştırmalarda kullanılmak üzere veri değişimi yapılmasına	İZİN VERİYORUM.	

Sonuç Bildirimi

Araştırma sonuçlarının bildirilmesini

İSTEMİYORUM.

Benim/yakınımın hastalığının tanı ve tedavisine yönelik olması veya sonuçların önleyici olması durumunda araştırma sonuçlarının bana bildirilmesini İSTİYORUM.

Yukarıdaki bilgileri okudum, anladım. Biyobanka amaç ve içeriği hakkında açıklamalar yapıldı. Bana soru sormam için fırsat verildi. Örnek vermeyi kabul ediyorum. İmzaladığım bu formun bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı Soyadı _____ Doğum Tarihi _____ Tel _____ İmza _____

Tanık

Adı Soyadı _____ Tel _____ İmza _____

Hekim

Katılımcıya yukarıdaki bilgiler sözel olarak aktarılmış, biyobanka amaç ve içeriği açıklanmıştır.

Adı Soyadı :

Adres/Tel :

İmza :

Görüşme tarih ve saati:

EK-3: Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi Biyobanka Bilgilendirilmiş Onam Formu (Çocuk için Ebeveyn/Vasi Onamı)

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ KÖK HÜCRE ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ

BİYO BANKA BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

(ÇOCUK İÇİN EBEVEYN/VASİ ONAMI)

Çocuğunuzun/yakınınızın hastalığı ile ilgili kendisinden alınan biyolojik örneklerin, Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi bünyesindeki hücre/kök hücre biyobankasında araştırma amaçlı saklanması için onayınıza başvuruyoruz.

Biyobankalar, hücre/doku/DNA/serum/plazma/idrar gibi biyolojik örnek tanımına giren tüm örneklerin saklandığı ve bunlarla ilgili bilgilerin veri tabanlarında arşivlenerek gelecekteki çalışmalarda kullanılmak üzere uzun süreli korunduğu alt yapılardır. Biyobankalar, saklanan biyolojik örneklerin özelliğine ve bankanın amaçlarına göre farklı özelliklerdedir. Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin bünyesinde yer alan biyobanka, kök hücre/hücre bankası özelliğindedir.

Hücre/kök hücre bankası nedir?

Hücre bankaları; sağlıklı kişilerden ve/veya farklı hastalıkları olan hastalardan alınan kan, kemik iliği veya diğer doku örneklerinden elde edilen, laboratuvar ortamında geliştirilen hücre /kök hücrelerin ve bunlarla ilgili bilgilerin saklandığı alt yapılardır. Kök Hücreler, kan, kemik iliği veya diğer dokulardan elde edilen ve vücutta bulunan tüm hücre tiplerini oluşturabilen hücrelerdir. Bu özellikleriyle kök hücreler, hastalıkların tedavisi, mekanizmalarının anlaşılabilmesi, ilaç denemeleri ve tedaviye yönelik yeni yöntemlerin geliştirilebilmesi için kritik öneme sahiptirler.

Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin bünyesinde yer alan hücre ve kök hücre bankasında ne tür insan örnekleri saklanır?

Başta kan hastalıkları olmak üzere pek çok hastalıkta kan tablosunda bozukluklar meydana gelmekte ve hastalarda hayatı tehdit eden durumlar ortaya çıkabilmektedir. Merkezimizde, bu tip hastalığı olan hastalardan, ayrıca, sağlıklı ilik/kan nakli vericilerinden veya diğer gönüllü sağlıklı bireylerden elde edilen doku/hücre/kök hücreler ve ilgili bilgiler araştırmalarda kullanılmak üzere arşivlenerek saklanmaktadır. Bu arşivde, hastalığa ve genel sağlık durumuna ait veriler ile yaş, cinsiyet bilgileri tutulmaktadır.

Biyolojik örnekler nasıl saklanır ve ne gibi işlemler uygulanır?

Doku ve hücrelerin canlılığını yitirmeden uzun yıllar kalabilmesi için çok soğuk ortamlar (-80°C - -196°C) gereklidir. Bu koşullarda depolanan hücreler araştırmalarda kullanılabilir. Dokular doğrudan dondurularak saklanabildiği gibi laboratuvar ortamında hücreler/kök hücreler geliştirilerek de saklanabilmektedir. Ayrıca hücreler, çeşitli işlemlerden geçirilerek yeniden programlanıp IPS hücreleri (uyarılmış pluripotent kök hücre) elde edilebilmekte; bu hücrelerden de çeşitli doku, hücre ve hücre hatları üretilebilmektedir. Başlangıçta çocuğunuzdan/yakınınzdan alınan örnek ile kıyaslandığında tamamen farklı özellikler kazandırılmış olan bu hücreler, araştırma-geliştirme çalışmaları için günümüzde en fazla ilgi çeken hücrelerdir. İlaç araştırmaları, gen tedavileri, doku nakli, hücre tedavileri, doku mühendisliği alanlarında kullanım potansiyeline sahiptirler. Yüksek maliyet ve ileri teknoloji gerektiren bu üretim süreci, merkezimizin/üniversitemizin bütçesi ve olanakları ile karşılanmaktadır. İziniz doğrultusunda, çoklu işlemlerle tamamen farklı özellik kazandırılacak olan hücreler kök hücre bankamızın arşivi bünyesine dahil edilmektedir. Bu aşamadan itibaren bu hücreler yeniden iznimize sunulmaksızın araştırma - geliştirme (ar-ge) faaliyetlerinde kullanılmak üzere yurt içi ve yurt dışı üniversiteler, kamu kurum ve kuruluşları ile ar-ge ve ilaç firmaları ile de paylaşılacaktır.

Çocuğunuz/yakınız 18 yaşını doldurduğunda, konu kendi onayına sunulacaktır. Örnekleriniz hücre bankamızda sınırsız süre ile saklanacak ve daimi hücre kaynağı olarak kullanılacaktır.

Örnekler nasıl toplanıyor ve olası riskler nelerdir?

Biyolojik örnekler kan, kemik iliği veya diğer dokular olabilmektedir. Araştırma amaçlı saklanacak biyolojik örneklerin alınması için çocuğunuza/yakınıza tıbbi gereklilik nedeniyle yapılan girişimler dışında herhangi bir ek girişim yapılmayacaktır. Biyolojik örnekler, hasta veya vericiden tıbbi amaçla gereken koşullarda (ameliyathane veya servis koşullarında) toplanacaktır. Çocuğunuzdan/yakınızdaki kemik iliği veya herhangi bir doku örneği alınması gerekiyorsa o işlem sırasında alınan örneklerden tıbbi amaç için kullanılacak miktardan arta kalanı kullanılacak ya da toplanan biyolojik örneklerin kullanılmayan/atık kısımları araştırmalarda kullanılmak üzere saklanacaktır. Bunun için size örnek alma amaçlı olarak ek bir girişim yapılmayacağından örnek bağışlamanız fiziksel risk içermemektedir. Kan/kemik iliği nakli işlemlerinde vericilerinden hastanın ihtiyacına ve vericinin yaşına/ağırlığına göre değişmek üzere yaklaşık 300-1000 ml hücresel ürün toplanmaktadır. Bunun yalnızca 1-5 ml'si araştırmalarda kullanılmak üzere saklanacaktır. Ayrıca, tıbbi gerekçelerle kan alınırken araştırmalar için ek olarak kan (yaşa göre değişmek üzere 1-7 ml) alınıp saklanacaktır. Ek olarak alınacak kan/ilik, çocuğunuz/yakınız için risk oluşturmamaktadır.

Çocuğunuzdan/yakınızdaki tanı ya da tıbbi izlem amacı ile alınan kan, kemik iliği veya diğer biyolojik örneklerin bir kısmı ile hücreler/kök hücreler geliştirilerek saklanacaktır. Bunun için çocuğunuza/yakınıza örnek alma amaçlı olarak ek bir girişim yapılmayacağından bankaya bağışlanacak örnek için herhangi bir fiziksel risk mevcut değildir. Kemik iliği/kan nakli vericilerine de tıbbi gereklilik dışında ekstra bir girişim yapılmayacağından, bankaya bağışlanacak örnek için herhangi bir fiziksel risk mevcut değildir.

Sağlık kayıtlarımızdan neden bilgi vermemiz gerekiyor?

Bankalanmak üzere çocuğunuzdan/yakınızdaki alınacak olan biyolojik örnekler yanında kendilerine ait tanımlayıcı bilgiler de kaydedilecektir. Bu bilgiler, ileride yapılacak araştırmaların değerlendirilmesi, karşılaştırmalı çalışmaların yapılabilmesi, farklı hastalıklar veya farklı özelliklere sahip kişilere ait araştırma sonuçlarının doğru yorumlanabilmesi için gereklidir.

Gizliliğimiz nasıl korunacak?

Çocuğunuza/yakınıza ait biyolojik örnekler, kişisel ve tıbbi bilgiler ile birlikte şifre korumalı bilgisayarlara kaydedilmektedir ve bu bilgisayarlara yalnızca yetkilendirilmiş biyobanka ekibi erişim sağlayabilmektedir. Biyolojik örnekler kodlanarak saklanacaktır, tanımlayıcı kimlik (isim, soyadı, gibi) ve iletişim bilgileri "6698 sayılı, Kişisel Verilerin Korunması Kanunu" gereğince korunacaktır. Örnekler, araştırma başlamadan önce bağımsız etik kurul tarafından onay almış projelerde kullanılacaktır. Bu kişisel bilgiler laboratuvar sonuçları, araştırma sonuçları gibi çıktılarda kullanılmayacaktır. Sadece gerektiğinde, çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurul ya da resmi makamlarca incelenebilecektir. Tıbbi bilgiler ve araştırma sonuçları, bilimsel nitelikteki toplantılarda/yayınlarında kimlik belirtilmeden kullanılabilir, yurt içi ve yurt dışı veri bankaları ile yine kimlik belirtilmeden paylaşılabilir.

Örneklerimizin hücre bankasına bağışlanmasına nasıl katılabiliriz? Fikrimizi değiştirirsek ne olur?

Onay verdiğiniz takdirde çocuğunuzdan/yakınızdaki alınacak biyolojik örnekler araştırmalarda kullanılmak üzere hücre bankasına bağışlanmış olacaktır. Hücrelerin farklı işlemlerden geçirilerek yeniden programlanması ve banka arşivine katılması için de ayrıca onayınıza başvurulacaktır. Çocuğunuz/yakınız 18 yaşına geldiğinde bizzat kendi onayına da başvurulacaktır. Onayınızı ve biyolojik örneğinizi her zaman çekme hakkına sahipsiniz. Geri çekilme durumunda çocuğunuz/yakınız için sunulan sağlık hizmetleri ve haklarınızda herhangi bir kısıtlama olmayacaktır. Talebiniz doğrultusunda çocuğunuza/yakınıza ait örnek ve veriler imha edilecektir. Toplanan biyolojik

örneklerden laboratuvar koşullarında uyarılmış hücre/hücre hattı oluşturulmasından itibaren hücrelerin tüm hakları Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne aktarılmış olacak ve bu örneklerin imhası veya geri çekilmesi mümkün olmayacak, gizlilik korunarak araştırmalarda kullanılabilir.

Örneklerimizin hangi amaçla kullanılacağına karar verebilir miyiz?

Çocuğunuza/yakınına ait örneklerin bankalama amaçlı kullanımına izin verdiğiniz takdirde size bahsedilen alanları içeren araştırmalarda kullanılmasına onay vermiş oluyorsunuz. Bu örnekler genetik araştırmalar (DNA, RNA) da dahil olmak üzere tüm bilimsel çalışmalarda ve eğitim amaçlı olarak da kullanılabilir. Ayrıca bu örnekler, ticari amaçlı ürün/ilaç geliştirmeye yönelik ar-ge çalışmaları ya da doku, hücre/hücre hattı üretimi amacıyla da kullanılabilir, talep doğrultusunda araştırmacılarla paylaşılabilir. Bu alanlarda kullanım da iznimize bağlıdır.

Örnek bağışı ile ilgili bize bir ödeme yapılacak mı? Bize bir yararı olacak mı?

Çocuğunuza/yakınına ait örnek bağışınız ile ilgili olarak sizden hiçbir ücret talep edilmeyecek ve size/çocuğunuza/yakınına herhangi bir ödeme yapılmayacaktır. Örnekler, ticari bir karşılığı olmaksızın, gönüllük esasına dayalı olarak toplanmaktadır. Biyolojik örneklerinizin araştırma amaçlı saklanması kısa vadede size bir yarar sağlamayacaktır. Çocuğunuzun/yakınınızın hastalığı veya diğer hastalıkları ilgilendiren araştırmalarda kullanılabilir ve bu durum hastalıkların izlemine ışık tutacak bilgiler ortaya çıkarabilir. Ancak bunun size/çocuğunuza/yakınına doğrudan bir fayda sağlaması beklenmemektedir. Elde edilen hücreler halen devam eden veya ileride yapılacak ar-ge çalışmalarında kullanılabilir. Bu araştırmalar şu anda tanımlanmamış olsa bile sizin/yakınınızın/çocuğunuzun hastalığının ya da diğer hastalıkların tanı ve tedavisine yönelik olacaktır.

Örneklerimizin kullanıldığı araştırma sonuçlarını öğrenebilecek miyiz?

Belirli bir araştırma amaçlı örnek bağışlanması durumunda araştırma sonuçlarını öğrenmeniz talebinize bağlıdır. Ancak bankalama amaçlı örnek bağışlanması durumunda, örneğiniz farklı araştırmalarda farklı araştırmacılar tarafından kullanılabilir. Bu nedenle sonuçların size/çocuğunuza/yakınına bildirilmesi her zaman mümkün olmayacaktır. Ayrıca örneklerinizin kodlanarak saklanmış olmaları ve kişisel verilere ulaşımda kısıtlılık olması nedeniyle sonuçların paylaşılması biyobanka işleyişi ile de uyumlu değildir. Ancak araştırma sonuçlarının sizin/çocuğunuzun/yakınınızın hastalığının önlenmesi veya tedavisine yönelik ümit vadeden bulgular içermesi ve araştırmacılar tarafından bankamıza bildirilmesi durumunda, yine talebiniz doğrultusunda sonuçlar sizinle paylaşılabilir.

Örnek bağışımız ile ilgili bir sorumuz olduğunda kime sorabiliriz?

Sorularınız için Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü, Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya (0 533 740 7524) ile görüşebilirsiniz.

ONAM BİLDİRİMİ

	İzin	İmza
Çocuğumun/yakınınımın örneklerinin hücre bankasında saklanmasına ve araştırmalarda kullanılmasına	İZİN VERİYORUM.	
IPS hücre geliştirilmesine ve ileri araştırmalar (ticari ürün ve ilaç geliştirme, doku, hücre/hücre hattı üretimi, doku mühendisliği çalışmaları...) yapılmasına	İZİN VERİYORUM.	
Benim/çocuğumun/yakınınımın tıbbi bilgilerinin ve araştırma sonuçlarının yurt içi/yurt dışı veri bankalarına eklenmesini, başka araştırmalarda kullanılmak üzere veri değişimi yapılmasına	İZİN VERİYORUM.	

		İmza
Sonuç Bildirimi Araştırma sonuçlarının bildirilmesini	İSTEMİYORUM.	
Benim/çocuğumun/yakınınımın hastalığının tanı ve tedavisine yönelik olması veya sonuçların önleyici olması durumunda araştırma sonuçlarının bana bildirilmesini	İSTİYORUM.	

Yukarıdaki bilgileri okudum, anladım. Biyobanka amaç ve içeriği hakkında açıklamalar yapıldı. Bana soru sormam için fırsat verildi. Örnek vermeyi kabul ediyorum. İmzaladığım bu formun bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı Soyadı _____ Doğum Tarihi _____ Tel _____ İmza _____

Veli/Vasi

Adı Soyadı _____ Tel _____ İmza _____

Tanık

Adı Soyadı _____ Tel _____ İmza _____

Hekim

Katılımcıya/ebeveyne yukarıdaki bilgiler sözel olarak aktarılmış, biyobanka amaç ve içeriği açıklanmıştır.

Adı Soyadı :

Adres/Tel :

İmza :

Görüşme tarih ve saati:

EK-4: Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi 18 Yaşını Doldurmuş Birey İçin “Biyobanka Yeniden Bilgilendirilmiş Onam Formu”

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ KÖK HÜCRE ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ 18 YAŞINI DOLDURMUŞ BİREY İÇİN “BİYOBANKA YENİDEN BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU”

Sayın katılımcı,

Sizin/yakınınızın hastalığının teşhisi, tedavisi ya da araştırma çalışmaları için ----- tarihinde sizden alınan biyolojik örnekler (-----), o tarihte çocuk yaşta olmanız nedeniyle ebeveyninizin/yakınınızın izni ile Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi bünyesindeki biyobankada saklanmıştır. 18 yaşını tamamlamış olmanız nedeniyle biyolojik örneklerinizin ve/veya elde edilen/laboratuvar ortamında geliştirilen hücrelerin ve arşiv bilgilerinin saklanmaya devam edilebilmesi için sizin izniniz ve onayınıza başvurulmaktadır.

Biyobankalar, hücre/doku/DNA/serum/plazma/idrar gibi biyolojik örnek tanımına giren tüm örneklerin saklandığı ve bunlarla ilgili bilgilerin veri tabanlarında arşivlenerek gelecekteki çalışmalarda kullanılmak üzere uzun süreli korunduğu alt yapılardır. Biyobankalar, saklanan biyolojik örneklerin özelliğine ve bankanın amaçlarına göre farklı özelliklerdedir. Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin bünyesinde yer alan biyobanka, kök hücre/hücre bankası özelliindedir.

Hücre/kök hücre bankası nedir?

Hücre bankaları; sağlıklı kişilerden ve/veya farklı hastalıkları olan hastalardan alınan kan, kemik iliği veya diğer doku örneklerinden elde edilen, laboratuvar ortamında geliştirilen hücre /kök hücrelerin ve bunlarla ilgili bilgilerin saklandığı alt yapılardır. Kök Hücreler, kan, kemik iliği veya diğer dokulardan elde edilen ve vücutta bulunan tüm hücre tiplerini oluşturabilen hücrelerdir. Bu özellikleriyle kök hücreler, hastalıkların tedavisi, mekanizmalarının anlaşılabilmesi, ilaç denemeleri ve tedaviye yönelik yeni yöntemlerin geliştirilebilmesi için kritik öneme sahiptirler.

Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin bünyesinde yer alan hücre ve kök hücre bankasında ne tür insan örnekleri saklanır?

Başta kan hastalıkları olmak üzere pek çok hastalıkta kan tablosunda bozukluklar meydana gelmekte ve hastalarda hayatı tehdit eden durumlar ortaya çıkabilmektedir. Merkezimizde, bu tip hastalığı olan hastalardan, ayrıca, sağlıklı ilik/kan nakli vericilerinden veya diğer gönüllü sağlıklı bireylerden elde edilen doku/hücre/kök hücreler ve ilgili bilgiler araştırmalarda kullanılmak üzere arşivlenerek saklanmaktadır. Bu arşivde, hastalığa ve genel sağlık durumuna ait veriler ile yaş, cinsiyet bilgileri tutulmaktadır.

Biyolojik örnekler nasıl saklanır ve ne gibi işlemler uygulanır?

Doku ve hücrelerin canlılığını yitirmeden uzun yıllar kalabilmesi için çok soğuk ortamlar (-80°C - 196°C) gereklidir. Bu koşullarda depolanan hücreler araştırmalarda kullanılabilir. Dokular doğrudan dondurularak saklanabildiği gibi laboratuvar ortamında hücreler/kök hücreler geliştirilerek de saklanabilmektedir. Ayrıca hücreler, çeşitli işlemlerden geçirilerek yeniden programlanıp IPS hücreleri (uyarılmış pluripotent kök hücre) elde edilebilmekte; bu hücrelerden de çeşitli doku/hücre ve hücre hatları üretilebilmektedir. Başlangıçta sizden alınan örnek ile kıyaslandığında tamamen farklı özellikler kazandırılmış olan bu hücreler, araştırma-geliştirme çalışmaları için günümüzde en fazla ilgi çeken hücrelerdir. İlaç araştırmaları, gen tedavileri, doku nakli, hücre tedavileri, doku mühendisliği alanlarında kullanım potansiyeline sahiptirler. Yüksek maliyet ve ileri teknoloji gerektiren bu üretim süreci, merkezimizin/üniversitemizin bütçesi ve olanakları ile karşılanmaktadır. Velinizin/vasınızın izni doğrultusunda, çoklu işlemlerle tamamen farklı özellik kazandırılmış olabilen bu hücreler kök hücre bankamızın arşivi bünyesine dahil edilmiştir. Bu aşamadan itibaren bu hücreler yeniden izne sunulmaksızın araştırma - geliştirme (ar-ge) faaliyetlerinde kullanılmak üzere yurt içi ve

yurt dışı üniversiteler, kamu kurum ve kuruluşları ile ar-ge ve ilaç firmaları ile de paylaşılabilmiş veya paylaşılacaktır. Örnekleriniz hücre bankamızda sınırsız süre ile saklanmakta ve daimi hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Gizliliğim nasıl korunacak?

Biyolojik örnekleriniz kişisel ve tıbbi bilgileriniz ile birlikte şifre korumalı bilgisayarlar kaydedilmektedir ve bu bilgisayarlar yalnızca yetkilendirilmiş biyobanka ekibi erişim sağlayabilmektedir. Biyolojik örnekleriniz kodlanarak saklanmakta, tanımlayıcı kimlik (isim, soyadı, gibi) ve iletişim bilgileriniz “6698 sayılı, Kişisel Verilerin Korunması Kanunu” gereğince korunmaktadır. Örnekler, araştırma başlamadan önce bağımsız etik kurul tarafından onay almış projelerde kullanılır. Bu kişisel bilgiler laboratuvar sonuçları, araştırma sonuçları gibi çıktılarda kullanılmamakta ve kullanılmayacaktır. Sadece gerektiğinde, çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurul ya da resmi makamlarca incelenebilmiş ve incelenebilecektir. Tıbbi bilgiler ve araştırma sonuçları bilimsel nitelikteki toplantılarda/yayınlarda kimlik belirtilmeden kullanılabilmiş/kullanılabilecek, yurt içi ve yurt dışı veri bankaları ile kimlik belirtilmeden paylaşılabilmiş/paylaşılacaktır.

Örneklerimi geri çekebilir miyim?

Örnek bağışınız ile ilgili olarak yakınınzdan hiçbir ücret talep edilmemiş, herhangi bir ödeme yapılmamış ve size de yapılmayacaktır. Onamınızı ve biyolojik örneğinizi her zaman çekme hakkına sahipsiniz. Geri çekilme durumunda sağlık hizmetleri ve haklarınızda herhangi bir kısıtlama olmayacaktır. Onay verdiğiniz takdirde sizden daha önce alınmış olan biyolojik örnekler araştırmalarda kullanılmak üzere saklanmaya/kullanılmaya devam edebilecektir. Talebiniz doğrultusunda örneğiniz ve verileriniz imha edilecektir. Toplanan biyolojik örneklerden laboratuvar koşullarında uyarılmış hücre/hücre hattı oluşturulmasından itibaren hücrelerin tüm hakları Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne aktarılmış olduğundan ve bu örneklerin imhası veya geri çekilmesi mümkün olmadığından, gizlilik korunarak araştırmalarda kullanılabilecektir.

Örneklerimin kullanıldığı araştırma sonuçlarını öğrenebilecek miyim?

Geçmişe dönük araştırmalar ile ilgili bilgiler velinizin/vasinizin isteği/onamı doğrultusunda bildirilmiş olabilir. Ancak bundan sonraki dönemde belirli bir araştırma amaçlı çalışmanın sonuçlarını öğrenmenize talebinize bağlıdır. Örneklerinizin imha edilmesini isteme hakkına da sahipsiniz. Genel bankalama amaçlı izin vermeniz durumunda, örneğiniz farklı araştırmalarda farklı araştırmacılar tarafından kullanılabilecektir/kullanılmaya devam edecektir. Bu nedenle sonuçların size bildirilmesi her zaman mümkün olmayacaktır. Ayrıca örneklerinizin kodlanarak saklanmış olmaları ve kişisel verilerinize ulaşımında kısıtlılık olması nedeniyle sonuçların paylaşılması biyobanka işleyişi ile de uyumlu değildir. Ancak araştırma sonuçlarının sizin/yakınınzın hastalığının önlenmesi veya tedavisine yönelik ümit vadeden bulgular içermesi ve araştırmacılar tarafından bankamıza bildirilmesi durumunda, yine talebiniz doğrultusunda sizinle paylaşılacaktır.

Örnek bağışım ile ilgili bir sorum olduğunda kime sorabilirim?

Sorularınız için Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü, Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya (0 533 740 7524) ile görüşebilirsiniz.

ONAM BİLDİRİMİ

Lütfen aşağıda izin verdiğiniz/kabul ettiğiniz alanları imzalayınız.
(İzin vermediğiniz/istemediğiniz alanları lütfen boş bırakınız.)

İzin No	İzin	İmza
1.	Örneklerimin hücre bankasında saklanmasına ve araştırmalarda kullanılmasına İZİN VERİYORUM.	
2.	Örneklerimin İMHA edilmesini istiyorum.	
3.	IPS hücre geliştirilmesine ve ileri araştırmalar (ticari ürün ve ilaç geliştirme, doku, hücre/hücre hattı üretimi, doku mühendisliği çalışmaları...) yapılmasına İZİN VERİYORUM.	
4.	Tıbbi bilgilerimin ve araştırma sonuçlarının yurt içi/yurt dışı veri bankalarına eklenmesini, başka araştırmalarda kullanılmak üzere veri değişimi yapılmasını ONAYLIYORUM.	
5.	Araştırma sonuçlarının bana bildirilmesini İSTEMİYORUM.	
6.	Benim/yakınımın hastalığının tanı ve tedavisine yönelik olması ve önleyici olması durumunda araştırma sonuçlarının bana bildirilmesini İSTİYORUM.	

Yukarıdaki bilgileri okudum, anladım. Biyobanka amaç ve içeriği hakkında açıklamalar yapıldı. Bana soru sormam için fırsat verildi. Örnek vermeyi kabul ediyorum. İmzaladığım bu formun bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı Soyadı Doğum Tarihi Tel İmza

Tanık

Adı Soyadı Tel İmza

Hekim

Katılımcıya/ebeveyne yukarıdaki bilgiler sözel olarak aktarılmış, biyobanka amaç ve içeriği açıklanmıştır.

Adı Soyadı :
Adres/Tel :
İmza :
Görüşme tarih ve saati:

EK-5: 7-11 Yaş Çocuk Kabul Formu

7-11 YAŞ ÇOCUK KABUL FORMU

Araştırma amaçlı kan, ilik örneklerinin saklanması

Senin/kardeşinin hastalığı için senden kan veya ilik alınması gerekiyor. Bu işlemlerin nasıl yapılacağı sana doktor/hemşire tarafından anlatıldı. Alınan bu kan/ilik örneğinin küçük bir kısmını araştırmalarda kullanmak üzere Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde saklamak istiyoruz. Bunu senin kabul etmen halinde alınan kan/ilik örneğini saklayacağız. Daha sonra, araştırmalar için kullanacağız. Bu konu ile ilgili anne-babanla konuşabilir, onlardan, doktorlardan bilgi alabilirsin.

Araştırma amaçlı saklamak üzere sana fazladan herhangi bir işlem yapılmayacaktır. Senin/kardeşinin hastalığının tedavisi, izlenmesi için senden alınacak kan/ilik örneğinin yaklaşık 1-2 çorba kaşığı kadar miktarını ileride yapılacak araştırmalarda kullanmak üzere saklayacağız. Belki fazladan bir kez kan alınması gerekebilir. Kolundan kan alınması sırasında çok hafif bir ağrı hissedebilirsin. Orada morarma, hafif kanama olabilir.

Senden alınacak kan/ilik örneğinin saklanmasına izin vermenin sana bir yararı olmayacak. Ancak senden alınan örneklerden elde edilen hücrelerle yapılan araştırmalar kan, ilik hastalığı olan çocukların tedavisine yardımcı olabilir.

Bu kağıdı imzaladığın takdirde araştırmalar için saklanmak üzere kan/ilik örneğinin kullanılmasına izin veriyor olacaksın. Sen kabul etmediğin takdirde anne-baban, doktorlar veya hemşireler sana kızmayacak, senden alınan örnekler saklanmayacak. Kabul ettiğin takdirde ise örneklerin saklanacak, ama ileride her zaman vazgeçme hakkına sahipsin. 18 yaşına geldiğinde, konuyu tekrar sana anlatıp, kararını tekrar soracağız. İstedığın takdirde bu kağıdın bir kopyası sana verilecektir.

Bu çalışmaya katılmak istiyorsan lütfen imzala:

Adı-Soyadı

İmza

Çocuk doğum tarihi:
Formun imzalandığı tarih:
Formun geçerliliğinin bittiği tarih:
(18 yaşını dolduracağı tarih)

EK-6: 12-17 Yaş Çocuk Kabul Formu

12-17 YAŞ ÇOCUK KABUL FORMU

Araştırma Amaçlı Kan, İlik Örneklerinin Saklanması

Senin/kardeşinin hastalığı için senden kan veya ilik alınması gerekiyor. Alınacak bu örneğin küçük bir kısmını araştırmalarda kullanmak üzere Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde saklamak istiyoruz. Bunu senin kabul etmen halinde, alınan kan/ilik örneğini merkezimizin hücre/kök hücre bankasında saklayacağız. Bu örnekler, kök hücre, doku nakli araştırmalarında kullanılabilir.

Senin veya kardeşinin hastalığı için senden kan/ilik toplanması gerektiği ve bu toplamanın nasıl yapılacağı sana, doktor/hemşire tarafından anlatıldı. Araştırma amaçlı saklamak üzere alınacak örnek için sana fazladan herhangi bir işlem yapılmayacaktır. Senin/kardeşinin hastalığının tedavisi, izlenmesi için senden alınacak kan/ilik örneğinin yaklaşık 1-2 çorba kaşığı kadar miktarını ileride yapılacak araştırmalarda kullanmak üzere dondurarak saklayacağız. Belki fazladan bir kez kan alınması gerekebilir. Kolundan kan alınması sırasında hafif bir ağrı hissedebilirsin. Orada morarma, hafif kanama olabilir.

Hücre saklanması ve araştırmalar hakkında senin/kardeşinin doktoru tarafından sana bilgi verilecek. Doktora istediğin soruyu sorabilirsin. Ayrıca, anne-baban ile bu konuyu konuşabilirsin.

Senden alınacak kan/ilik örneğinin saklanmasına izin vermenin sana bir yararı olmayacak. Ancak senden alınan örneklerden elde edilen hücrelerle yapılan araştırmalar kan, ilik hastalığı olan hastalar için ileride bulunacak yeni tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

Senin veya kardeşinin tedavisi için senden kan/ilik alınırken küçük bir kısmının araştırmalar için Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde saklanmasını kabul etmek zorunda değilsin. Sen kabul etmediğin takdirde anne-baban/yakının doktorlar veya hemşireler sana kızmayacak ve senden alınan örnekler saklanmayacaktır. Kabul ettiğin takdirde ise örneklerin saklanacaktır, ancak saklanan bu örnekleri de ileride istediğin zaman geri çekme hakkına sahipsin. O durumda senin örneklerin saklanmayacak ve araştırmalar için kullanılmayacaktır. Sen 18 yaşına geldiğinde, konuyu tekrar sana anlatıp, kararını tekrar soracağız.

Bu kağıdı imzaladığın takdirde araştırmalar için saklanmak üzere kan/ilik örneğinin kullanılmasına izin veriyor olacaksın. İstediyin takdirde bu kağıdın bir kopyası sana da verilecektir.


Bu çalışmaya katılmak istiyorsan lütfen imzala:

Adı-Soyadı

İmza

Çocuk doğum tarihi:
Formun imzalandığı tarih:
Formun geçerliliğinin bittiği tarih:
(18 yaşını dolduracağı tarih)

EK-7: Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
16969557-744 numaralı kararı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-744
Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 03 MAYIS 2018 PERŞEMBE
Toplantı No : 2018/12
Proje No : GO 18/430 (Değerlendirme Tarihi: 27.03.2018)
Karar No : GO 18/430-23

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Duygu Uçkan ÇETİNKAYA'nın sorumlu araştırmacı olduğu, Dr. Öğr. Üyesi Fatima Aerts KAYA, Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU, Prof. Dr. Osman İlhami ÖZCEBE ile birlikte çalışacakları ve Dr. Tülay Karaağaç AKYOL'un doktora tezi olan, GO 18/430 kayıt numaralı ve "Mezenkimal Kök Hücre Üretiminde in vitro Temelli Metabolomik ve Analizler" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten AKARSU	(Başkan)	10 Doç. Dr. Gözde GİRGİN	(Üye)
2. Prof. Dr. Sevdâ F. MÜFTÜOĞLU	(Üye)	İZİNLI	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım S.	(Üye)	11 Doç. Dr. Fatma Visal OKUR	(Üye)
İZİNLI	(Üye)	12. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)
4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM	(Üye)	İZİNLI	(Üye)
5. Prof. Dr. Hatice Doğan B.	(Üye)	13. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL	(Üye)
İZİNLI	(Üye)	14. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ	(Üye)
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL	(Üye)	İZİNLI	(Üye)
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Üye)	15. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	(Üye)
8. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL	(Üye)	16. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN	(Üye)
9. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU	(Üye)	17. Av. Meltem ONURLU	(Üye)

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için:

Ek-8: Orjinallik Raporu**Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Tülay Akyol
Ödev başlığı: Tülay Tez
Gönderi Başlığı: Tez
Dosya adı: tulay_karaagac_akyol_tez_12.2.20_...
Dosya boyutu: 17.66M
Sayfa sayısı: 389
Kelime sayısı: 59,385
Karakter sayısı: 415,347
Gönderim Tarihi: 12-Şub-2020 11:47AM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1256044383



Mezenkimal Kök Hücre Üretiminde in vitro Temelli Metabolomik ve Analizlern

ORIJINALLIK RAPORU

% 10	% 7	% 2	% 5
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 4
2	Submitted to Kirikkale University Öğrenci Ödevi	% 1
3	Karolina Pietrowska, Diana Anna Dmuchowska, Paulina Samczuk, Tomasz Kowalczyk et al. "LC-MS-Based Metabolic Fingerprinting of Aqueous Humor", Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2017 Yayın	% 1
4	bidd2.nus.edu.sg İnternet Kaynağı	<% 1
5	www.kanver.org İnternet Kaynağı	<% 1
6	adumilas.adu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	git.embl.de İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: TÜLAY KARAAĞAÇ AKYOL

Doğum Tarihi ve Yeri: 1975, Edirne

Medeni durumu: Evli, iki çocuklu.

Halen Görevi: Hacettepe Üniv. Tıp Fakültesi; Hematoloji/Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi Sorumlu Doktoru, Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi (**Doktora Öğrencisi**)

Yazışma Adresi: Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Sıhhiye, 06100 Ankara

Telefon: 305 2821; 305 12 92; 505 6435418

E-Mail: drtulaykaraagac@yahoo.com,
tulay.akyol@hacettepe.edu.tr

EĞİTİM

2002: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

2001: Sağlık Bakanlığı, Aile Planlaması Sertifikası

2006: Sağlık Bakanlığı, Kan Bankacılığı Uygulamaları Eğitim Sertifikası

2009: Sağlık Bakanlığı, Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbı Eğitici Sertifikası

2010: Sağlık Bakanlığı, Terapötik Aferez Eğitimi Sertifikası

AKADEMİK DENEYİM

2002- günümüze: Hacettepe Üniversitesi Hematoloji/ Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi,
Tıp doktoru

ÇALIŞMA ALANLARI

Hematoloji: Kemik iliği mikroçevresi, Hematopoetik Kök hücre, Mezenkimal kök hücre, Terapötik aferez, Kan Bankacılığı

YAYINLARI:

SCI veya genişletilmiş SCI makaleleri

1. **Akyol TK**, Büyükaşık Y, Aksu S, Özcebe OI. How do we collect better granulocyte? Transfus Apher Sci. 2012 May 28.
2. Burak Uz, Evren Özdemir, Salih Aksu, **Tülay Karaağaç Akyol**, Roy Jones, Successful Treatment of Autoimmune Hemolytic Anemia with Steroid, IVIg, and Plasmapheresis in a Haploidentical Transplant Recipient. Turk J Hematol 2012; 29: 199-200.
3. Kayıkcıoğlu M, Tokgozolu L, Yılmaz M, Kaynar L, Aktan M, Durmuş RB, Gökçe C, Temizhan A, Özcebe OI, **Akyol TK**, Okutan H, Sağ S, Gul OO, Salcıoğlu Z, Yenercağ M, Altunkeser BB, Kuku I, Yasar HY, Kurtoglu E, Kose MD, Demircioğlu S, Pekkolay Z, İlhan O. A nation-wide survey of patients with homozygous familial hypercholesterolemia phenotype undergoing LDL-apheresis in Turkey (A-HIT 1 registry). Atherosclerosis. 2018 Mar; 270:42-48.
4. Kayıkcıoğlu M, Tokgozolu L, Dogan V, Ceyhan C, Tuncez A, Kutlu M, Onrat E, Alici G, Akbulut M, Celik A, Yesilbursa D, Sahin T, Sonmez A, Ozdogan O, Temizhan A, Kilic S, Bayram F, Sabuncu T, Coskun FY, Ildizli M, Durakoglugil E, Kirilmaz B, Yılmaz MB, Yigit Z, Yildirim AB, Gedikli O, Topcu S, Oğuz A, Demir M, Yenercağ M, Yıldırım A, Demircan S, Yılmaz M, Kaynar LG, Aktan M, Durmuş RB, Gökçe C, Özcebe OI, **Akyol TK**, Okutan H, Sağ S, Gul OO, Salcıoğlu Z, Altunkeser BB, Kuku I, Yasar HY, Kurtoglu E, Kose MD, Demircioğlu S, Pekkolay Z, İlhan O, Can LH. What have we learned from Turkish familial hypercholesterolemia registries (A-HIT1 and A-HIT2)? Atherosclerosis. 2018 Oct;277:341-346.
5. Kayıkcıoğlu M, Kuman-Tunçel O, Pirildar S, Yılmaz M, Kaynar L, Aktan M, Durmuş RB, Gökçe C, Temizhan A, Özcebe OI, **Akyol TK**, Okutan H, Sağ S, Oz Gul O, Salcıoğlu Z, Yenercağ M, Altunkeser BB, Kuku I, Yasar HY, Kurtoğlu E, Demir M, Demircioğlu S, Pekkolay Z, İlhan O, Tokgozolu L. Clinical management, psychosocial characteristics, and quality of life in patients with

homozygous familial hypercholesterolemia undergoing LDL-apheresis in Turkey: Results of a nationwide survey (A-HIT1 registry). J Clin Lipidol. 2019 May - Jun;13(3):455-467.

Ulusal tıp dergilerinde yayınlanan makaleleri (Türkiye)

1. Terapötik Aferez: Yöntem Ve Endikasyonlar (Therapeutic Apheresis: Procedure and Indications), **Dr. Tülay KARAAĞAÇ AKYOL**, Dr. Salih AKSU, Dr. Osman ÖZCEBE Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics 2011;4(2):86-90.
2. Otolog Kan Transfüzyonu (Autologous Blood Transfusion), **Tülay Karaağaç Akyol**, Osman İlhami Özcebe Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Hematoloji Ünitesi, Türkiye Klinikleri J Hematol-Special Topics 2013;6(3):75-8.
3. Aferezde İmmün Adsorbsiyon Uygulamaları, **Dr. Tülay KARAAĞAÇ AKYOL**, Dr. Osman ÖZCEBE, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Türk Hematoloji Derneği, Hematolog, 2015; Cilt:5, Sayı:1, 355-364.

Bildiri Özetleri (uluslararası kongreler)

1. The CD34+ cell count effects the CD34+ cell count! **Dr.Tülay Karaağaç Akyol**, Dr. Salih Aksu, Dr. Hakan Göker, Dr. Osman İlhami Özcebe Hacettepe University Blood Center and Apheresis Unit, Hacettepe University Stem Cell Reserch Center. 14th World Apheresis Congress, September 13-16th, 2012.

Bildiri Özetleri (ulusal kongreler)

1. Nasıl daha iyi granülosit toplarız? **Dr.Tülay Karaağaç Akyol**, Dr. Yahya Büyükaşık, Dr. Salih Aksu, Dr. Osman İlhami Özcebe Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi. 4th National Apheresis Congress, 23-26 Eylül 2009, Girne. **[Poster which Received 4th Award]**
2. Hematopoietik Kök Hücre Naklinde ABO Uyumsuzluğu. Yasemin Karacan, Fatma Tekin, Hakan Göker, Salih Aksu, **Tülay Karaağaç Akyol**, Yahya Büyükaşık, İbrahim C. Haznedaroğlu, Nilgün Sayınalp, Özlen Bektaş, Burak Uz, Osman İ. Özcebe. Hacettepe Hastanesi Erişkin Hematoloji-KİTÜ, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi. 4th National Apheresis Congress, 23-26 Eylül 2009, Girne.
3. Steroide Refrakter GVHH'de ECP Uygulaması: Olgu Sunumu. Yasemin Karacan, Fatma Tekin, Hakan Göker, Salih Aksu, **Tülay Karaağaç Akyol**, Yahya Büyükaşık, İbrahim C. Haznedaroğlu, Nilgün Sayınalp, Özlen Bektaş, Burak Uz, Osman İ. Özcebe. Hacettepe Hastanesi Erişkin Hematoloji-KİTÜ, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi. 4th National Apheresis Congress, 23-26 Eylül 2009, Girne.
4. Tek Merkez Deneyimi: Allojenik Kök Hücre Mobilizasyonunda Filgrastim veya Lenograstim. Yasemin Karacan, Fatma Tekin, Hakan Göker, Salih Aksu, **Tülay Karaağaç Akyol**, Yahya Büyükaşık, İbrahim C. Haznedaroğlu, Nilgün Sayınalp, Özlen Bektaş, Burak Uz, Osman İ. Özcebe. Hacettepe Hastanesi Erişkin

- Hematoloji-KİTÜ, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi. 4th National Apheresis Congress, 23-26 Eylül 2009, Girne.
5. Pediatrik Entoksikasyon Olgularımızda Plazma Değişimi Sonuçlarımız. Şule Ünal, Benan Bayrakçı, Salih Aksu, **Tülay Karaağaç Akyol**, Fatma Gümrük, Osman İlhami Özcebe, Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Hematoloji Ünitesi, Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Yoğun Bakım Ünitesi, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi. 4th National Apheresis Congress, 23-26 Eylül 2009, Girne.
 6. Trombositopeni ilişkili Çoklu Organ Yetmezliği Bulunan Olgularımızda Plazma Değişimi Sonuçlarımız. Şule Ünal, Benan Bayrakçı, Salih Aksu, **Tülay Karaağaç Akyol**, Fatma Gümrük, Osman İlhami Özcebe, Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Hematoloji Ünitesi, Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Yoğun Bakım Ünitesi, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi. 4th National Apheresis Congress, 23-26 Eylül 2009, Girne.
 7. Steroide Refrakter GVHH'de ECP Uygulaması: Olgu Sunumu. Hakan Göker, Yasemin Karacan, Fatma Tekin, Salih Aksu, Mehmet Turgut, **Tülay Karaağaç Akyol**, Yahya Büyükaşık, İbrahim C. Haznedaroğlu, Nilgün Sayinalp, Özlen Bektaş, Burak Uz, Osman İ. Özcebe. Hacettepe Hastanesi Erişkin Hematoloji-KİTÜ, 19 Mayıs Üniversitesi Hematoloji Bölümü, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi. 4th National Apheresis Congress, 23-26 Eylül 2009, Girne.
 8. Baxter Amicus Ve Cobe Trima Cihazlarının 30 Aynı Donörden Ayrılan Trombosit Ürünlerinin Karşılaştırılması, **Dr.Tülay Karaağaç Akyol**, Dr. Salih Aksu, Dr. Osman İlhami Özcebe Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi. 5th National Apheresis Congress, 23-26 Eylül 2010, Girne.
 9. Türkiye'de Nadir Görülen Bir Kan Grubu: Bombay **Dr.Tülay Karaağaç Akyol**, Dr. Salih Aksu, Dr. Şule Ünal, Dr. Fatma Gümrük, Dr. Osman İlhami Özcebe Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi, Hematoloji Bilim Dalı, Pediatri Hematoloji Bilim Dalı. 5th National Apheresis Congress, 23-26 Eylül 2010, Girne.
 10. Trombosit Aferez Donörlerinin Giriş Değerlerinin Ürüne Olan Etkileri, **Dr.Tülay Karaağaç Akyol**, Dr. Salih Aksu, Dr. Osman İlhami Özcebe Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi. 5th National Apheresis Congress, 23-26 Eylül 2010, Girne.
 11. Lipid Aferezi Yöntemlerinin Etkinliklerinin Karşılaştırılması, **Dr.Tülay Karaağaç Akyol**, Dr. Yahya Büyükaşık, Dr. Salih Aksu, Dr. Osman İlhami Özcebe Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi. 5th National Apheresis Congress, 23-26 Eylül 2010, Girne. **[Poster which Received 1st Award]**
 12. Geçici Süre İlaç Kullanamayacak Hiperlipidemi Hastasının Aferez Tedavisi İle Güvenli Gebelik İdamasının Sağlanması, **Dr.Tülay Karaağaç Akyol**, Dr. Salih Aksu, Dr. Osman İlhami Özcebe Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi. 5th National Apheresis Congress, 23-26 Eylül 2010, Girne.

13. Aferez trombositleri filtrelenmeli mi? **Dr. Tülay Karaağaç Akyol**, Dr. Salih Aksu, Bio. Doruk Taylan, Dr. Osman İlhami Özcebe Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi, Ankara, Türkiye. 6th National Apheresis Congress, 29 Eylül-2 Ekim 2011, Girne. **[Poster which Received 3th Award]**
14. Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hematoloji Hematopoyetik Kök Hücre Nakil Ünitesi Aferez Deneyimi. Hakan Göker, Fatma Tekin, Sevilay Ünal, Salih Aksu, Yahya Büyükaşık, İbrahim C. Haznedaroğlu, Nilgün Sayınalp, Özlen Bektaş, **Tülay Karaağaç Akyol**, Osman İ. Özcebe. Hacettepe Hastanesi Erişkin Hematoloji-KİTÜ, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi. 6th National Apheresis Congress, 29 Eylül-2 Ekim 2011, Girne.
15. Miyeloperoksidaz Enziminin İnsan Lökositlerinden Saflaştırılması [Purification of Myeloperoxidase from Human Leukocytes], Bahram Sarkarati, **Tülay Karaağaç Akyol**, Kamer Kılınç. [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem] 2012; 37 (1) ; 106–109. **[Poster which Received Compliment Award]**
16. Kan Gruplarına Göre Eritrosit Süspansiyonu İmha Oranları, Dr. Osman İlhami Özcebe, **Dr. Tülay Karaağaç Akyol**, Dr. Salih Aksu. 8th National Apheresis Congress, 5-8 Eylül 2013, Girne.
17. Çocuk ve Erişkin GVHH Hastalarında Güvenli Ekstrakorporeal Fotoferez Tedavisi, **Tülay Karaağaç Akyol**, Salih Aksu, Barış Kuşkonmaz, Güliz Karataş, Nermin Kutlu, Hakan Göker, Duygu Uçkan Çetinkaya, Osman İlhami Özcebe. 9th National Apheresis Congress, 4-7 Eylül 2014, KKTC.
18. Geçici Alloimmunizasyonu Olan Orak Hücreli Anemi Hastasında Terapötik Eritrosit Değişimi, **Tülay Karaağaç Akyol**, Salih Aksu, Osman İlhami Özcebe. 9th National Apheresis Congress, 4-7 Eylül 2014, KKTC.
19. İnsan Kemik İliğinde RANTES ve Reseptörlerinin İncelenmesi, Tülay Karaağaç Akyol, Fatima Aerts Kaya, Duygu Uçkan Çetinkaya. 42. Ulusal Hematoloji Kongresi, 19-22 Ekim 2016, Antalya. **[which Received Best Clinical Laboratory Award]**
20. Türkiye’de Lipid Aferezi Alan Ailevi Hiperkolesterolemi Hastalarının Ulusal Kayıt Çalışması: A-HIT1. Durmuş RB, Tokgözoğlu L, Yılmaz M, Kaynar LG, Gökçe C, Temizhan A, Özcebe Oİ, **Karaağaç T**, Okutan H, Sag S, Oz Gul O, Salcıoğlu SZ, Yenerçağ M, Altunkeser BB, Kuku I, Yılmaz H, Kurtoğlu H, Demir M, Demircioğlu S, Pekkolay Z, İlhan O, Aktan M, Kayıkçoğlu M. 12th National Apheresis Congress, 26-29 Ekim 2017, İstanbul.
21. Türkiye’de terapötik plazma exchange aktivitesi: Ulusal araştırma. Serdal Korkmaz, Şerife Solmaz Medeni, Fatih Demirkan, Sevgi Kalayoğlu Beşışık, Senem Altay Dadın, Gülsüm Akgün Çağlıyan, Sibel Kabukçu Hacıoğlu, Deniz Gören Şahin, Mutlu Arat, Simten Dağdaş, Gülsüm Özet, Nermin Kutlu, **Tülay Karaağaç Akyol**, Osman İlhami Özcebe, Hava Üsküdar Teke, Demet Kiper Ünal, Naile Güner, Anıl Tombak, Halil Çelik, İlker Bay, İlhami Kiki, Gökhan Özgür, Mehmet Ali Erkurt, Düzgün Özatlı, Özgür Meletli, Sinan Demircioğlu, Cengiz Demir, Erdal Kurtoğlu, Filiz Vural, Mahmut Töbü, Abdullah Karakuş, Orhan Ayyıldız, Mehmet Sinan Dal, Berna Afacan Öztürk, Murat Albayrak,

Serkan Ocağcı, Zahit Bolaman, Mehmet Sönmez, Volkan Karakuş, Ömür Gökmen Sevindik, İlhami Berber, Mehmet Hilmi Doğu, Emine Gültürk, Turgay Ulaş, Bahriye Payzın, İrfan Kuku, Seçkin Çağırğan, Fevzi Altuntaş. 1. Hematolojik Nadir Hastalıklar Kongresi, 8-10 Şubat 2018, Girne, K.K.T.C. **[which Received 1st Award]**

Davetli konuşmacı (uluslararası kongreler)

1. Our Therapeutic Leukopheresis Experience, **Tülay Karaağaç Akyol, Md.** Hacettepe University Blood Center and Apheresis Unit, Hacettepe University Stem Cell Reserch Center. 14th World Apheresis Congress, September 13-16th, 2012, İstanbul.

Davetli konuşmacı (ulusal kongreler)

1. Lipidaferezi, Hangi Yöntemle, Hangi Endikasyonda? **Dr. Tülay Karaağaç Akyol**, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi. 3th National Apheresis Congress, 1-4 Kasım 2007, Girne.
2. Plazmaferez mi? Kaskat, double filtrasyon mu? **Dr. Tülay Karaağaç Akyol**, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi. 5th National Apheresis Congress, 23-26 Eylül 2010, Girne.
3. Terapötik Aferez Uygulamalarında Elektrolit Yönetimi, **Dr. Tülay Karaağaç Akyol**, Hacettepe Üniversitesi Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi. 6th National Apheresis Congress, 29 Eylül-2 Ekim 2011, Girne.
4. Başarısız Flebotomi Oranını Nasıl Azaltabilirim? **Dr. Tülay Karaağaç Akyol**, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi, 8th National Apheresis Congress, 5-8 Eylül 2013, Girne.
5. Mezenkimal Kök Hücrelerin kültür koşullarının optimizasyonu. **Dr. Tülay Karaağaç Akyol**, Hacettepe University Stem Cell Reserch Center, Kök Hücre Günü, 11-8th-2013, Ankara.
6. Periferik Kök Hücre Aferezinde Sık Sorulan Sorular. **Dr. Tülay Karaağaç Akyol**, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi, Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, 9th National Apheresis Congress, 4-7 Eylül 2014, Girne.
7. Pediatrik Terapötik Aferez ve Dikkat Edilmesi Gerekenler. **Dr. Tülay Karaağaç Akyol**, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi, Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, 11th National Apheresis Congress, 4-5 Kasım 2016, İstanbul.
8. Temel Aferez Yöntemleri ve Aferez Matematiği. **Dr. Tülay Karaağaç Akyol**, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Kan Merkezi ve Aferez Ünitesi, Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, 12th National Apheresis Congress, 26-29 Ekim 2017, İstanbul.

Oturum Başkanı

1. Mobilizasyondan infüzyona kök hücre. 12th National Apheresis Congress, 26-29 Ekim 2017, İstanbul.

Ulusal Kitap

1. Ulusal Kan ve Kan Bileşenleri Hazırlama Kullanım ve Kalite Güvencesi Rehberi, 2016.

YURT DIŞI EĞİTİMLER VE SÜRELERİ:**Observer:**

1. Weizmann Institute Of Science, Immunology Department, Stem Cell Reserch, 12.06.2012-19.07.2012, Rehovot, Israel.
2. Cleveland Clinic, Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, 02.06.2014 - 27.06.2014, Cleveland, Ohio, USA.

