



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**İNSAN ADİPOZ-KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN MİKROYERÇEKİMİ VE YERÇEKİMİ
ŞARTLARINDA ADİPOJENİK FARKLILAŞMASININ
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ**

Gülhan Erdem SUBAK

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE
YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN**

ANKARA

2016

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN ADİPOZ-KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN MİKROYERÇEKİMİ VE YERÇEKİMİ
ŞARTLARINDA ADİPOJENİK FARKLILAŞMASININ
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ**

Gülhan Erdem SUBAK

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE
YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün
15L0216001 numaralı projesi ile desteklenmiştir**

ANKARA

2016

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum **“İnsan Adipoz-Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Mikroyerçekimi Ve Yerçekimi Şartlarında Adipojenik Farklılaşmasının Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi”** başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Gülhan Erdem SUBAK

Tarih: 12.08.2016

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinlerarası Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalı'nda Gülhan Erdem
SUBAK tarafından hazırlanan "İnsan Adipoz-Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin
Mikroyerçekimi Ve Yerçekimi Şartlarında Adipojenik Farklılaşmasının
Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY

~~ÇOKLUĞU~~ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:



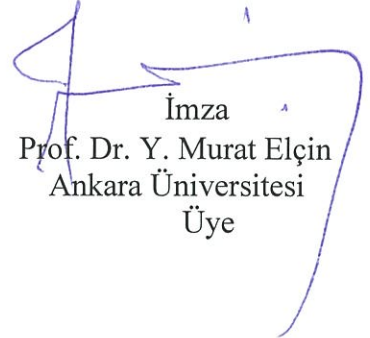
İmza

Prof. Dr. Sibel Sümer
Hacettepe Üniversitesi
Jüri Başkanı



İmza

Prof. Dr. Hakan Akbulut
Ankara Üniversitesi
Raportör



İmza

Prof. Dr. Y. Murat Elçin
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Zafer Karaer
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simge ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi

1. GİRİŞ

1.1. Yerçekimi	3
1.2. Yerçekiminin Hesaplanması	5
1.3. Mikroyerçekimi	8
1.3.1. Mikroyerçekimi Nedir?	8
1.3.2. Mikroyerçekiminin Canlılar Üzerine Etkisi	8
1.3.3. Dünya Yüzeyinde Mikroyerçekimi	10
1.4. Mikroyerçekiminde Hücre Kültürü	11
1.4.1. Mikroyerçekiminde Hücre Kültürü Fikri	11
1.4.2. Mikroyerçekimi Biyoreaktörleri	12
1.4.2.1. Klinostat	12
1.4.2.2. Rastgele Konumlama Makinesi	13
1.4.2.3. Döner Duvarlı Kap Biyoreaktörü	13
1.5. Mikroyerçekiminde Kök Hücre Uygulamaları	15
1.5.1. Mikroyerçekiminin Osteojenik Farklılaşmaya Etkisi	15
1.5.2. Mikroyerçekiminin Endotelyal Farklılaşmaya Etkisi	17
1.5.3. Mikroyerçekiminin Kondrojenik Farklılaşmaya Etkisi	17
1.5.4. Mikroyerçekiminde Hematopoetik Kök Hücre Kültürü	18
1.5.5. Mikroyerçekimi Koşullarının Diğer Etkileri	19
1.6. Kök Hücreler	20
1.6.1. Kök Hücre	20
1.6.2. Memeli Vücudundaki Kök Hücre Tipleri	21
1.6.3. Mezenkimal Kök Hücreler	24
1.7. Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipositlere Farklılaşması	26
1.7.1. Adipogenez	26
1.7.2. Adipojenik Belirteçler	27
1.7.3. Linoleik Asit	29

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	31
2.2. Cihazlar ve Kültür Ekipmanları	32
2.3. Dondurulmuş Adipoz Mezenkimal Kök Hücrelerin Çözülüp Kültüre Adapte Edilmesi	32
2.4. Döner Duvarlı Kap Biyoreaktörünün Hazırlanması	33

2.5. Hücre Kültürü ve Farklılaşması	37
2.6. İmmünohistokimyasal İncelemeler	39
2.7. Eş-Zamanlı PCR İncelemeleri	40
2.7.1. RNA İzolasyonu	40
2.7.2. cDNA Sentezi	41
2.7.3. cDNA'ların PCR İçin Hazırlanması	42
2.7.4. İstatistiksel Analiz	43
3. BULGULAR	
3.1. Adipojenik Farklılaşmanın <i>In Vitro</i> Görüntüsü	44
3.2. RNA Konsantrasyonları	45
3.3. RT-PCR Sonuçları	45
3.4. Üç Boyutlu Kümelenme	52
4. TARTIŞMA	54
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
ÖZET	60
SUMMARY	61
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	73

ÖNSÖZ

Yerçekiminin değişmesi canlı metabolizmasında değişiklikler ortaya çıkarmaktadır. Astronotlar uzayda uzun süreler yerçekiminin milyonda biri anlamına gelen mikroyerçekimi koşullarında çalışmaktadır. Çalışmamızda mikroyerçekimi şartlarının adipojenik indüksiyon ortamında adipoz doku oluşumu üzerine etkisinin, adipojenik belirteçlerin ekspresyon analizleri yapılarak araştırılması hedeflenmiştir.

Tez konusu araştırmalarına başladığım zamanlarda birçok konu arasında kararsızlıklar yaşarken bana “mikroyerçekimi” konusunu önererek, her aşamasında son derece keyif aldığım bu tez çalışmasının ortaya çıkmasını sağlayan danışmanım Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN’e,

Çalışmamda geçen tüm deneyler sırasında bana eşlik ederek, her konuda bilgisi ve tecrübesiyle bana destek olan değerli hocam Prof. Dr. A. Eser ELÇİN’e,

Deneylerim sırasında çeşitli birçok konuda bana yardımcı olan tüm ElçinLab araştırmacılarına,

Bana tüm lisans ve yüksek lisans eğitimlerim boyunca maddi manevi her zaman destek olan sevgili aileme sonsuz kez teşekkür ediyorum.

Bu çalışmadaki tüm deneyler Elçin Lab’da gerçekleştirilmiştir.

Gülhan Erdem SUBAK

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
ALP	Alkalın Fosfataz
AMKH	Adipoz-Kökenli Mezenkimal Kök Hücre
BMD	Kemik Mineral Yoğunluğu
CD	Yüzey Farklılaşma Antijenleri
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CFU	Koloni Oluşturan Birim
cm	Santimetre, metrenin yüzde biri (1/100).
Col I	Tip I Kollajen
δ	Delta
DDK	Döner Duvarlı Kap Biyoreaktörü
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EKH	Embriyonik Kök Hücre
F	Kuvvet
FBS	Fötal Sığır Serumı
Flk-1	Fötal Karaciğer Kinaz 1
γ	Gamma
G	Yerçekimi Katsayısı
g	Dünyanın Yerçekimi İvmesi (9,80665 m/sn ²)
GLUT4	Glukoz Taşıyıcı Tip 4
GRC	Glenn Araştırma Merkezi
HKH	Hematopoetik Kök Hücre

IHC	İmmünohistokimyasal Boyama Tekniği
iMKH	İnsan Mezenkimal Kök Hücresi
JSC	Johnson Uzay İstasyonu
KC-135	Boeing KC-135 mikroyerçekimi simülasyonu ve yakıt ikmal uçağı.
kg	Kilogram, gramın bin katı (1×1000)
KLA	Konjuge Linoleik Asit
LA(-)	Linoleik Asit Eklenmemiş Adipojenik Vasat
LA(+)	Linoleik Asit Eklenmiş Adipojenik Vasat
m	Kütle
MIR	1986 yılında uzaya gönderilen bir Sovyet uzay istasyonu
µG	Mikroyerçekimi, Yerçekiminin Milyonda Biri (1/1 000 000)
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
Myf5	Miyojenik Faktör 5
NASA	Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi, National Aeronautics and Space Administration
OCT4	Oktamer-Bağı Transkripsiyon Faktörü 4
ON	Osteonektin
PBS	Fosfat Tuz Tamponu
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PPARγ2	Peroksizom Proliferator-Aktifleştirici Reseptör Gamma 2
r	Yarıçap
RNA	Ribonükleik Asit

rpm	Bir Dakikadaki Devir Sayısı
RT-PCR	Eş-Zamanlı (Kantitatif) Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Runx2	Runt-ilişkili Transkripsiyon Faktörü 2
RWV	Rotating Wall Vessel (Döner Duvarlı Kap)
v	Hız
vWF	von Willebrand Faktörü
Wj	Wharton's Jelly
Wj-MKH	Wharton's Jelly kaynaklı mezenkimal kök hücreler



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Eski Tarihlerde Dünya Merkezli Ve Güneş Merkezli Sistem	4
Şekil 1.2. Nasa Glenn Araştırma Merkezi Düşüş Kuleleri	11
Şekil 1.3. Hızlı Dönüslü Klinostat (Fast Rotating Clinostat)	12
Şekil 1.4. Rastgele Konumlama Makinesi	13
Şekil 1.5. Döner Duvarlı Kap Biyoreaktörü	15
Şekil 1.6. Mikroyerçekimi Osteogenezi Baskılarken Adipogenezi Arttırmaktadır.	16
Şekil 1.7. Hastaya Nakil İçin Yeterli Mononükleer Hücre Üretimi Amaçlı DDK Biyoreaktör Stratejisi	19
Şekil 1.8. Hematopoetik Kök Hücrelerin Farklılaşması (Hematopoez)	24
Şekil 1.9. MKH'lerin Farklılaşması	25
Şekil 1.10. Adipositlerin Alt Tipleri Ve Orjinleri	27
Şekil 1.11. Linoleik Asitin İzomerleri	30
Şekil 2.1. İnkübatör İçerisinde Dönüş Hazır DDK Biyoreaktörü	35
Şekil 2.2. Dönel Kaplarda Vasat Değişimi	37
Şekil 2.3. Yükleme Öncesi Konfluent Haldeki AMKH'ler	38
Şekil 3.1. IHC Boyamalarının Işık Mikroskobu Görüntüleri	44
Şekil 3.2. Normal Yerçekiminde PPAR γ 2 Ekspresyonu	45
Şekil 3.3. Normal Yerçekiminde Adipsin Ekspresyonu	46
Şekil 3.4. Normal Yerçekiminde Leptin Ekspresyonu	47
Şekil 3.5. Normal Yerçekiminde Adiponektin Ekspresyonu	48
Şekil 3.6. Linoleik Asit Normal Yerçekiminde Yapılan Deneyde PPAR γ 2 Ekspresyonunu Yükseltirken, Leptin, Adipsin ve Adiponektin	49

Ekspresyonlarını Azaltmıştır

Şekil 3.7. 6. Gün Sonunda Yerçekimi Kültürüne Göre 50

Mikroyerçekimindeki Ekspresyon Artışları

Şekil 3.8. Mikroyerçekiminde (μ G) ve yerçekiminde (G) 3. Gün 51

Sonunda Hücrelerin Işık Mikroskobu Görüntüleri

Şekil 3.9. Linoleik Asitin Mikroyerçekimi Kültüründeki Etkisi 52

Şekil 3.10. Mikroyerçekiminde (μ G) ve yerçekiminde (G) 3. Gün 53

Sonunda Hücrelerin İnvert Mikroskobu Görüntüleri

Şekil 3.11. Mikroyerçekiminde 11. Gün Sonunda Hücre Kümelerinin 53

İnvert Mikroskobu Görüntüleri

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. 4 - 14,4 ay uzay seyahati sonrası BMD (Bone Mineral Density) ve doku değişimi analizi	9
Çizelge 1.2. Uzun süreli uzay uçuşu sonrası kas hacmi değişimiyle ilgili MRI sonuçları	10
Çizelge 2.1. Biyoreaktör Deney Planı Çizelgesi	36
Çizelge 2.2. Normal Yerçekimi Deney Planı Çizelgesi	39



1. GİRİŞ

İlk çağlardan bu yana, insanların en çok merak ettiği konulardan birisi uzay olmuştur. Güneş sistemi, gezegenlerin yapıları, Dünya dışında yaşam olasılığı, galaksiler, yıldızlar, karadelikler ve diğer uzay bileşenleri insanları uzay hakkında düşünmeye ve araştırmalar yapmaya itmiştir. Araştırmaların ilerlemesiyle beraber, Dünya'nın ilk uzay uydusu Sputnik-1'in 1957 yılında uzaya gönderilmesi ve yörüngeye oturtulması ile uzay araştırmalarında çok büyük bir adım atılmıştır. Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi'nin (NASA) kurulması ise uzay araştırmalarını ileri taşımak için en önemli adımlardan biri olmuştur. 20 Haziran 1969 tarihinde ABD, Apollo-11 uçuşu ile Ay'a ilk kez insan indirmeyi başararak uzay araştırmalarını önemli ölçüde ileri taşımıştır.

Uzay araştırmalarındaki ilerlemelerle beraber uzay teknolojileri de geliştirilmeye başlanmıştır. Daha büyük ve kapsamlı işler yapabilmeye olanak sağlayan ve astronotların daha uzun süreler uzayda kalarak araştırmalar yapabilmesini sağlayacak uzay istasyonları inşa edilmiştir. Uzayda kalma süresinin uzaması ile beraber astronotlarda birtakım problemler görülmeye başlanmıştır. Astronotların özellikle yük binen kemiklerinde yüksek oranlarda kemik kaybı olduğu saptanmıştır. Bunlar arasından kalça kemiğinde aylık %1,7 gibi çok yüksek bir oranda kütle kaybı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalarda kemik kaybının özellikle alt omurgalarda ve alt ekstremitelerde meydana geldiği gösterilmiştir (Arfat ve ark., 2014; Blaber ve ark., 2013; Keune ve ark., 2016; Lang ve ark., 2004; Sheyn ve ark., 2010; Zayzafoon ve ark., 2004).

Uzun uzay seyahatlerinde görülen bu problemler daha detaylı şekilde incelenmeye başlanmıştır. Hücre düzeyinde yapılan incelemelerde, uzaydaki yerçekimsiz koşulların hücrelerin gen ifade profilini değiştirdiği bulunmuştur. İnsan mezenkimal kök hücrelerinin (iMKH) yerçekimsiz koşullarda kültürü yapıldığında, 882 genin ifadesinin baskılandığı ve 505 genin ifadesinin yükseldiği bulunmuştur. Hücre

kompartımanları, biyolojik süreçler ve sinyal yolakları ile ilgili genlerin daha çok etkilendiği gösterilmiştir. (Sheyn ve ark., 2010).

Yerçekimsiz ortamda araştırmalar yapmak için uzay istasyonlarına araştırmacılar ve deneyler için ekipmanlar göndermek, araştırmaların maliyetini çok yükseltmektedir. Bu maliyetten kurtulmak ve Dünya üzerinde mikroyerçekimi araştırmaları yapabilmek için NASA tarafından sistemler geliştirilmiştir. Bu amaç ile geliştirilen Döner Duvarlı Kültür Sistemleri (*Rotary Cell Culture System*), bugüne kadar çok sayıda çalışmada kullanılmış ve uzay ortamında yapılan araştırmalarla yüksek derecede paralel sonuçlar elde edilmiştir (Chen ve ark., 2015; Hwang ve ark., 2009; Lei ve ark., 2011; Sun ve ark., 2014; Wu ve ark., 2013; Yu ve ark., 2011).

Uzun uzay seyahatlerinin en görünür etkisi olan kemik kaybı, mikroyerçekimi araştırmalarının yoğunlaştığı en önemli konu olmuştur. Ancak bu koşulların yağ doku üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalar oldukça az sayıdadır. Bu çalışmanın amacı; insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin (AMKH), adipojenik yönlendirme vasatının bulunduğu mikroyerçekimi biyoreaktöründe adipogeneze daha yüksek seviyede yönelip yönelmediğini incelemektir.

1.1. Yerçekimi

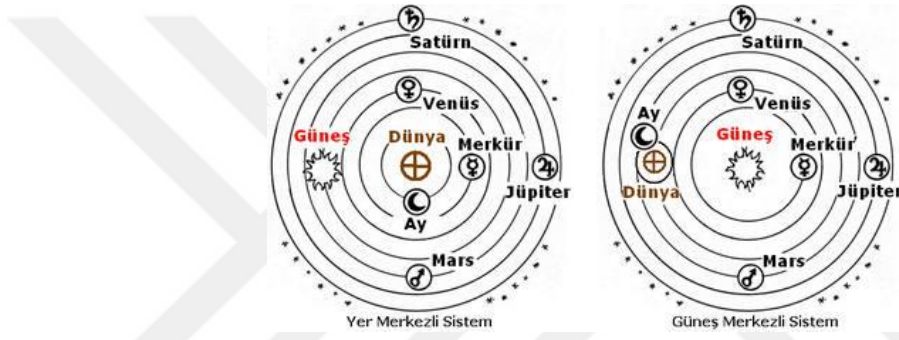
Babilliler Dünya'yı, gölün üzerinde kayan büyük bir sal şeklinde betimlemişlerdir. Bu betimlemede; Dünya'nın üzerinde sütunlarla desteklenen, büyük, kemerli bir kubbe bulunmaktaydı. Yıldızlar da bu kubbenin üzerine tutturulmuş bacalar olarak tanımlanmaktaydı ve yağmurun Dünya'ya bu bacalardan düştüğü inancı kabul görmekteydi. Bu ilkel teori, uzay ve yerçekimi araştırmaları için bir başlangıç teşkil etmekte ise de, gezegenlerin ve yıldızların hareketlerini açıklayamamıştır.

İlerleyen tarihlerde Yunanlılar; Güneş'i, Tanrı Apollo'nun sürdüğü bir savaş arabası olarak betimleyerek bir mitoloji geliştirmişlerdir. Bu mitolojiye göre Apollo, gece boyunca dağların arkasında Dünya'nın etrafını dolaşmaktadır ve şafak vaktinde başlangıç noktasına geri dönmektedir. Araştırmalar ve fikirler geliştikçe, Dünya'nın bir küre olduğu düşünülmeye başlanmıştır. Bununla birlikte Güneş'in, Dünya'nın etrafındaki devasa bir kristal katmanda 24 saatte bir tur attığı ileri sürülmüştür ve diğer gezegenlerin de benzer şekilde görünmez katmanlarda Dünya'nın etrafında döndüğünü, yıldızların ise bu katmanların en dışında sabit olduğunu kaydetmişlerdir (Şekil 1.1). Bu teori, Dünya'yı evrenin merkezine koyduğu için insanları mutlu etmiştir. Şairler ise bu görünmez kristal katmaların, ince duygulu insanlar tarafından duyulabilen bir ilahi müzik yaydığını iddia etmişlerdir. Şair Milton da bu müzikle ilgili olan *Paradise Lost* adlı bir şiir yazmıştır.

Kristof Kolomb'un Amerika'yı keşfinden birkaç sene sonra Polonyalı bir papaz olan Kopernik, Dünya ve diğer gezegenlerin Güneş'in etrafında dairesel yörüngelerde hareket ettiğini ifade etmiştir. Yani evrenin merkezinin Dünya değil, Güneş olduğunu öne sürmüştür.

Kolomb'un teorisinin yayınlanmasından 10 yıl sonra Galileo teleskobu keşfetmiştir. Ay'ı görüntüleyen Galileo, Dünya'dakine benzer şekilde Ay'ın üzerinde de dağlar olduğunu keşfetmiştir. Daha sonra, Jüpiter'in etrafında, farklı hızlarda dönen dört tane ay olduğunu, Satürn'ün halkalarını ve Güneş'in üzerinde hareket eden koyu lekeler bulunduğunu gözlemlemiştir. Galileo'nun daha büyük bir keşfi ise, Venüs'ün

de Ay gibi fazlarının olduğunu ve bazı mevsimlerde diğerlerine oranla daha büyük görüldüğünü gözlemlemesidir. Galileo gözlemlerinin ardından şu sonuca varmıştır: “Eğer Venüs Dünya'nın etrafında dönüyor olsaydı aralarındaki uzaklık değişmezdi ve Venüs her zaman aynı büyüklükte görünürdü. Ancak, Dünya ile beraber Güneş'in etrafında dönüyorsa, o zaman Venüs ile Dünya'nın arasındaki uzaklık, gözlemlerinde fark ettiği gibi değişkenlik gösterecekti.” Galileo'nun bu buluşları “yeryüzündeki en hatalı ve sapkın hareket” olarak değerlendirilmiş ve Galileo yıllarca hapiste yatmıştır. Galileo'nun çabaları o zamanlar boşa harcanmış olsa da yeni nesiller, O'nun tekniklerini memnuniyetle kabul etmişlerdir.



Şekil 1.1. Eski Tarihlerde Dünya Merkezli ve Güneş Merkezli Sistem (<http://eglenceninyeri.eniyiforum.biz>)

Danimarkalı astronom Tycho Brahe, gezegenlerin konumlarını başarılı bir şekilde gözlemlemiştir. Brahe'nin ölümünün ardından öğrencisi olan Johannes Kepler, kayıtlar üzerinde çalışmış ve gezegenlerin dairesel yörüngelerde değil, elips şeklindeki yörüngelerde hareket ettiğini keşfetmiştir. Böylece, kristal katmanlar düşüncesi terk edilmiştir ve bu yeni keşif, yeni bir soruyu ortaya çıkartmıştır; bu gök kubbeleri destekleyen şey nedir? Bu sorunun cevabı, Galileo'nun ölümünden birkaç yıl sonra doğan Newton tarafından bulunmuştur.

Newton yirmi üç yaşında Cambridge Üniversitesi'nde öğrenciyken veba salgınına yakalandığı için okulu bırakmaya zorlanmıştır. Bir yıldan fazla süren bu zorunlu tatil sırasında Newton, bilime üç önemli katkıda bulunmuştur. İlk olarak, bir prizmadan geçen güneş ışığının gökkuşağının renklerine ayrıştığını ispatlamıştır. İkinci olarak,

kalkülüs adı verilen matematiğin bir alt dalını keşfetmiştir ve üçüncü olarak, Dünya'nın çekim etkisinin, Ay'ı yörüngesinde nasıl tuttuğunu açıklamıştır.

Newton, düşen bir elmayı gördükten sonra bu çekimin Ay'a etkisini düşünmeye başlamıştır. Dünya'nın Ay'ı, elmayı çektiği gibi mi çektiğini ve bu çekimin Ay'ı eliptik yörüngesinde tutan şey olup olmadığını merak etmiştir. Newton bu hipotezini test etmek için Dünya'nın merkezine çeşitli uzaklıklarda bulunan maddelere etkileyen çekim kuvvetlerini hesaplamıştır.

1.2. Yerçekiminin Hesaplanması

1 pound (453,59237 gram) ağırlığındaki bir cismin Dünya yüzeyinde yaylı terazi ile tartıldığını farz edersek; cisim bu pozisyonda iken Dünya'nın merkezine 4000 mil uzaklıkta olacaktır. Aynı cismi, Dünya'nın yüzeyinden 4000 mil uzaklıkta düşünersek, o zaman Dünya'nın merkezinden 8000 mil uzaklıkta olacaktır. Bu şekilde mesafe iki katına çıktığında, cismin ağırlığının önceki değerine göre 1/4 oranında azalması beklenmektedir. Cismin kütlesi sabit kaldığı halde, ağırlığı 1/4 oranında azalmaktadır. Dünya'nın merkezinden 16000 mil uzaklıktayken cisme uygulanan çekim kuvveti 1/16 oranında azalacaktır.

Ay'ın Dünya'ya uzaklığı, Dünya'nın yarıçapının yaklaşık 60 katıdır. Newton'a göre eğer hesapladığı ters kare kanunu doğru ise, Ay üzerindeki tüm cisimlere Dünya tarafından uygulanan çekim kuvveti 1/3600 olacaktır. Böylelikle, Ay'ın Dünya etrafındaki ivmesi 1/3600 g, başka bir ifadeyle dakikada 32 feet olacaktır.

Ay'ın bulunduğu bilinen yörüngenin yarıçapı r ve Ay'ın hızı v olursa, Ay'ın Dünya etrafındaki ivmesi aşağıdaki formülle hesaplanabilir;

$$\alpha = \frac{v^2}{r}$$

Ay'ın hızı (v), yörüngesinin çevre uzunluğunun, bir tur atması için gereken süreye bölünmesi ile hesaplanabilmektedir (27,5 gün). Doğru değerler kullanıldığında hesaplanan ivmenin, ters kare kanunu ile hesaplanan dakikada 32 feet'e yakın olduğu hesaplanmıştır. Bu uyuşma ters kare kanununun doğruluğuna inancı arttırmıştır.

Newton'un bu buluşu yaptığı günlerde Dünya'nın yarıçapı, %10 oranında yanlış hesaplanmaktaydı ve bu nedenle ivmenin hesaplanan iki değeri aynı sonucu vermemekteydi. 23 yaşında bir öğrenci olan Newton bu çalışmalarını o dönemlerde yayınlamamıştır. Yirmi yıl sonra Dünya'nın yarıçapı yeniden hesaplanmıştır ve doğru değer kullanıldığında iki hesaplamanın da aynı sonucu verdiği görülmüştür.

Böylelikle gezegenlerin hareketlerinin gizemi sonunda çözülmüştür. Bu şekilde hesaplanmış olan Newton'un evrensel çekim yasası şunu ifade etmektedir:

“Evrendeki her parçacık, diğer parçacıkları kütlelerinin çarpımı ile doğru orantılı ve aralarındaki uzaklığın karesi ile ters orantılı olarak çekmektedir.”

Küçük kütleler arasındaki gravitasyonel kuvvet hesaplanabilmektedir. 1 gram kütleyle sahip, merkezleri arasında 1 cm uzaklık bulunan iki topu düşünersek, birbirlerine yaklaşık 68×10^{-12} gram-ağırlık değerindeki bir kuvvetle çekim uygulamaktadır. Küçük kütleler arasındaki gravitasyonel etkileşimler Jolly yöntemi ile hesaplanmaktadır. Jolly, 5000 gram ağırlığına sahip cıva bilyeyi eşit kollu terazinin bir kefesine koymuş ve diğer kefeye de eşit ağırlık koyarak dengelemiştir. Ardından, 5775 kg (5 tondan daha fazla) kütleyle sahip büyük bir kurşun küreyi, cıva bilyenin altına yerleştirmiştir ve iki topun merkezleri arasındaki uzaklık 56.68 cm olarak ölçülmüştür. Bunun sonucunda kurşun küre, cıva bilyeyi hafifçe aşağı çekmiştir ve teraziye tekrar dengelemek için diğer kefeye 0,589 miligram kütleli bir ağırlık konulmuştur. Dolayısıyla kurşun küre, cıva bilyeye 0,589 miligram-ağırlık değerinde bir çekim kuvveti uygulamıştır.

Newton'un evrensel çekim kanununa göre, kütlesi m_1 olan bir bilye, aralarında r uzaklık bulunan ve kütlesi m_2 olan bir diğer bilyeyi, aşağıdaki formülde verildiği şekilde bir F kuvveti ile etkilemektedir:

$$F = G \frac{m_1 m_2}{r^2}$$

Jolly deneyine göre,

$$\begin{aligned} F &= 0.000589 \text{ gm} \times 980 \text{ cm/sn}^2 \\ &= 0.577 \text{ dyne} \\ m_1 &= 5,000 \text{ gm} \\ m_2 &= 5,775,000 \text{ gm} \\ r &= 56.86 \text{ cm} \end{aligned}$$

bu nedenle,

$$G = 6.47 \times 10^{-8} \frac{\text{dyne-cm}^2}{\text{gm}^2}$$

olarak hesaplanmıştır.

Günümüzde daha kesin yöntemlerle hesaplanan değeri ise;

$$G = 6.664 \times 10^{-8} \frac{\text{dyne-cm}^2}{\text{gm}^2} = 6.664 \times 10^{-11} \frac{\text{newton-m}^2}{\text{kg}^2}$$

G sembolü, Newton'un yerçekimi katsayısı olarak adlandırılır.

Dünya'nın bir cisme uyguladığı yerçekimi kuvveti, cismin bulunduğu yere göre farklılık göstermektedir. Bu farklılığın nedeni *yükseklik* ve *enlemin* değişkenlik göstermesidir. Bir cismin üzerine etkiyen yerçekimi kuvveti, Dünya'nın merkezinden uzaklaştıkça azalmaktadır. Ekvator çizgisinin Dünya'nın merkezine uzaklığı,

kutupların merkeze uzaklığından yaklaşık 12,5 mil daha fazladır. Kuzey kutbunda, 90° enlem ve yüksekliğin 0 olduğu deniz seviyesinde yerçekimi ivmesi 983,2 cm/sn² iken, ekvator da 0° enlemde ve deniz seviyesinde yerçekimi ivmesi 978,2 cm/sn² olarak ölçülmüştür (Blackwood ve ark., 1955).

1.3. Mikroyerçekimi

1.3.1. Mikroyerçekimi Nedir?

Dünya yüzeyindeki bir cisme etki eden yerçekimi kuvveti (normal gravite) $1g = 9,80665 \text{ m/sn}^2$ değerindedir. Dünya üzerinde, elimizde tuttuğumuz bir cismi bırakırsak yeryüzüne doğru $1g$ ile düşecektir. Eğer bu cismi uzay istasyonundaki bir astronot bırakırsa, cismin düşüşü Dünya'daki ile aynı şekilde olmayacaktır. Çünkü uzay istasyonu, astronot ve cisim beraber düşme halindedirler ve bu düşüşün yönü Dünya'ya doğru olmamakla beraber, Dünya'nın etrafında dönel bir düşüş şeklindedir. Bu birlikte düşüş sırasında uzay istasyonu içerisindeki cisimlerin uçuyor gibi göründükleri hal sıfır-yerçekimi (*zero-g*), veya daha doğru bir tanım olan **mikroyerçekimi** ($1 \times 10^{-6} g$) kelimesi ile ifade edilmektedir.

1.3.2. Mikroyerçekiminin Canlılar Üzerine Etkisi

Uzayda yerçekiminin değişmesi astronotlarda birtakım problemler yaratmaktadır. Bu problemler arasında en belirgin olan kemik kaybı çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (Collet ve ark., 1997; Nabavi ve ark., 2011; Rauh ve ark., 2011). Uzun süre yerçekimsiz ortamda kalındığında osteoporozun aksine tüm kemiklerde değil, baskın olarak ağırlık binen kemiklerde kütle azalması görülmektedir. Collet ve arkadaşları, 1 ve 6 ay uzayda (Rusya MIR istasyonunda) kalmış iki astronotun kemik mineral yoğunluğunu ve kemik hücrelerinin biyokimyasal parametrelerini ölçmüşlerdir. Birinci ayın sonunda trabeküler kemik kütlesinde hafif bir azalma tespit edilmiştir. 6. ayın sonunda yapılan incelemede ise, tibia kemiğinde trabeküler ve kortikal

kütlelerde daha büyük oranda azalma olduğu tespit edilmiştir. Tibia ile beraber, topuk kemiğinde (*Calcaneus*) birinci ayın sonunda kemik kütlesi dikkate değer bir düzeyde azalmış, altıncı ayın sonunda ise çarpıcı azalma olduğu tespit edilmiştir (Collet ve ark., 1997).

Uzayda uzun süre kalan astronotlar üzerinde yapılan araştırmalarda, kalça kemiği gibi ağırlık binen kemiklerde ayda %1,7 oranında kütle kaybı olduğu ifade edilmektedir. Elde edilen veriler kemik kaybının, yerçekiminin yüklendiği kemikler olan bel omurgası ve alt ekstremitelerde olduğunu göstermiştir. (Buckey, 2006; Gopalakrishnan ve ark., 2010)

Mir Uzay İstasyonunda 1990-1995 yılları arasında çeşitli görevler için uzaya giden astronotlar üzerinde yapılan incelemeler sonucunda, astronotların kemik kütlelerinde azalma olduğu ancak buna zıt olarak toplam yağ kütlelerinin arttığı gösterilmiştir (Çizelge 1.1) (LeBlanc, Schneider, ve ark., 2000).

Çizelge 1.1. 4 - 14,4 ay uzay seyahati sonrası BMD (*Bone Mineral Density*) ve doku değişimi analizi (LeBlanc, Schneider, ve ark., 2000)

Değişken	Sayı	%Ay
BMD Omurga	18	-1,06
BMD Boyun	18	-1,15
BMD Total	17	-0,35
BMD Pelvis	17	-1,35
BMD Kol	17	-0,04
BMD Bacak	16	-0,34
Toplam Yağ	17	+1,79

Uzun süre uzayda mikroyerçekimi koşullarında kalan astronotların bilek fleksör, bilek ekstensör, diz fleksör ve diz ekstensör kaslarında kas hacminin azaldığı gösterilmiştir (Lambertz ve ark., 2001). Benzer şekilde anterior bacak, kuadriseps, dirsek kirişi, sırt kasları ve psoas kaslarında hacim azalması olduğu da belirtilmiştir. 1970 yılında Skylab ekibinin yaptığı bir incelemede, yerçekimsiz ortamda uzun süre kalındığında üriner kortizol hormonunun yükseldiği gösterilmiş ve kas kaybında

etkisi olabileceği ifade edilmiştir (Smith ve ark., 1998; Whedon ve ark., 1976). 5 günlük uzay seyahatinde bir başka hormon olan testosteronun azaldığı gösterilmiştir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışma da, uzay şartlarında benzer şekilde testosteron hormon düzeyinin düştüğünü göstermiştir (Buckey, 2006).

Çizelge 1.2. Uzun süreli uzay uçuşu sonrası kas hacmi değişimi ile ilgili MRI sonuçları (Buckey, 2006).

Kas Grubu	Uzay Uçuşu Sonrası Kayıp Yüzdesi
Sırt	-10.9
İliopsoas	-20.0
Kuadriseps	-12.1
Hamstring	-15.7
Soleus	-19.6

Uzay yolculuğu araştırmalarında astronotların enerji dengelerinin negatif olduğu, daha fazla kalori yaktıkları ve kilo kaybettikleri birçok defa gösterilmiştir (Hughes-Fulford ve ark., 2015; Sambandam ve ark., 2014; Wei ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2013). Benzer şekilde, protein metabolizmasının hızlandığı ve bunun metabolik stresle sonuçlandığı belirtilmiştir (Arfat ve ark., 2014). Protein metabolizmasının hızlanması ve bununla beraber artan kalori yakımının, daha önce ifade edilen kas hacmi azalmasının nedeni olabileceği düşünülmektedir (Çizelge 1.2) (Buckey, 2006).

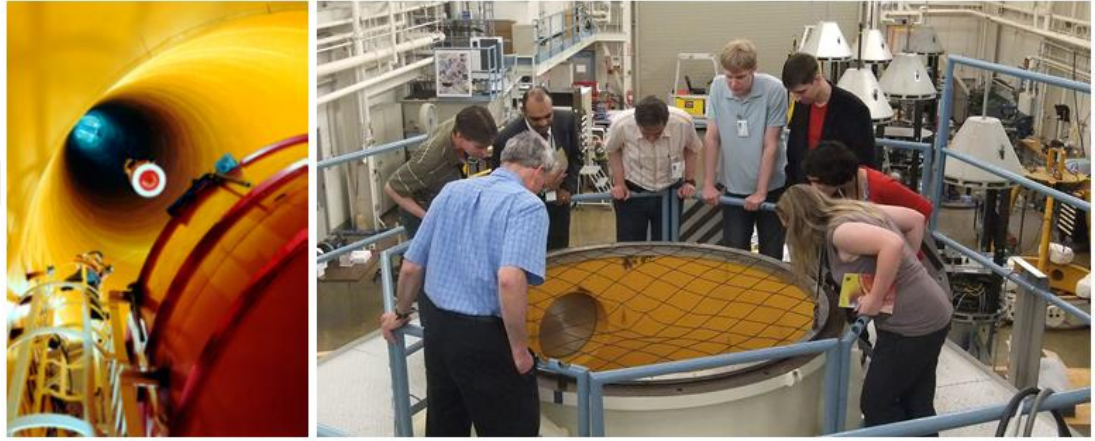
1.3.3. Dünya Yüzeyinde Mikroyerçekimi

NASA, Dünya yüzeyinde mikroyerçekimi koşullarını oluşturmak için Azaltılmış Yerçekimi Araştırma Programı (*Zero Gravity Research Facility*) kurmuştur. Burada geliştirilen sistemler arasında en çok ün kazanan, parabolik yaylar çizerek uçuş yapan ve 20-25 saniyelik mikroyerçekimi koşulları sağlayan *KC-135* uçağıdır. Astronot eğitimi ve mikroyerçekimi araştırmaları için üretilen, *Zero-G* adı da verilen bu uçak "Apollo 13" filmindeki yerçekimsiz sahnelerin çekimi için de kullanılmıştır.

KC-135, altı mil uzunluğundaki parabolik bir yay üzerinde, önce tırmanıp sonra hızla dalışa geçecek şekilde hareket etmektedir. Bu hareket ile uçak kısa süreli serbest

düşüşe maruz bırakılmaktadır ve uçağın içindekiler bu süreçte 20-25 saniye süren bir ağırlıksızlık hissetmektedirler.

Mikroyerçekimi araştırmaları için NASA Glenn Araştırma Merkezi (GRC) düşüş-kuleleri kurmuştur. Serbest düşme hareketinden yararlanan bu kulelerde çok kısa süreli mikroyerçekimi şartları oluşturulabilmektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. NASA Glenn Araştırma Merkezi Düşüş Kuleleri (facilities.grc.nasa.gov)

1.4. Mikroyerçekimde Hücre Kültürü

1.4.1. Mikroyerçekimde Hücre Kültürü Fikri

Araştırmacılar, yüzyıldan daha uzun bir süredir hücrelerin kültürünü yapmaktadır. Ancak bu süreç boyunca kültür tekniklerinde önemli değişiklikler olmamıştır. Eskiden olduğu gibi bugün de hücreler petri kaplarında veya kapaklı kültür kaplarında, yassı yüzeylerde, hücrelerin besin ve büyüme ihtiyaçlarını içeren vasatlar ile geliştirilmektedir. Vücudun dışında, *in vitro* ortamda geliştirilen bu hücreler iki boyutlu tabakalar oluşturmaktadır. Canlı vücudunda ise hücreler bunun aksine üç boyutlu büyüme göstermektedir.

1.4.2. Mikroyerçekimi Biyoreaktörleri

Hücre kültüründe yeni bir yöntem haline gelen mikroyerçekimi, geliştirilen çeşitli biyoreaktörler sayesinde doku kültürü laboratuvarlarında hücrelere uygulanabilmektedir. Günümüze kadar en sık kullanılmış ve halen kullanılmakta olan bazı biyoreaktörler; Hızlı Rotasyonlu Klinostat (*Fast Rotating Clinostat*), Rastgele Konumlama Makinesi (*Random Positioning Machine*) ve Döner Duvarlı Kap Biyoreaktörü'dür (*Rotating Wall Vessel*).

1.4.2.1. Klinostat

Klinostatlar motora bağlı bir disk içermektedir (Şekil 1.3). Bu diskin dönme hareketi, bir şaft etrafında ve yerçekimi vektörüne dik olacak şekilde uygulanmaktadır. Klinostatta ağırlıksızlık, ortalama olarak yerçekimi kuvveti kadar bir kuvvet aracılığıyla elde edilir ve yeteri kadar hızla çevrildiğinde (40-100 rpm) klinostattaki yerçekimi $1g$ 'nin altına düşmektedir. Kültüre edilecek hücreler klinostatın merkezine konulmaktadır.

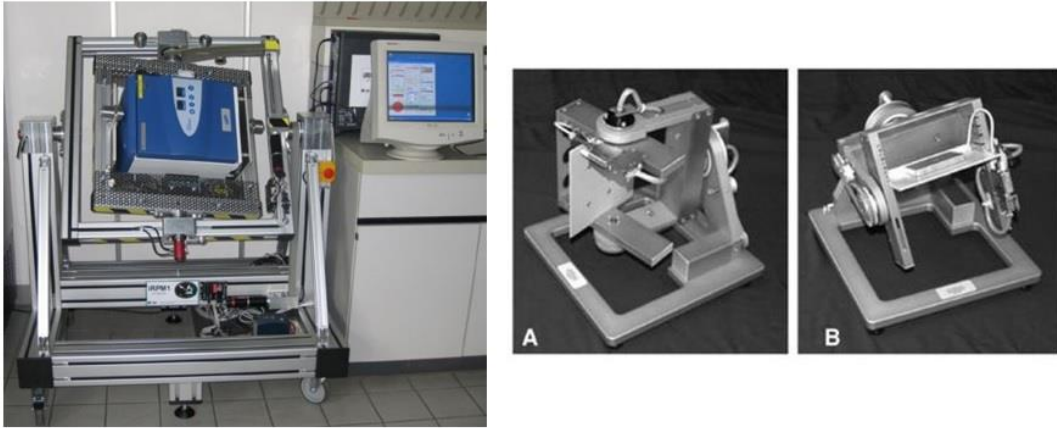


Şekil 1.3. Hızlı Dönüslü Klinostat (*Fast Rotating Clinostat*) (<http://www.grimm-space-research.com>)

Klinostatların önemli bir problemi rotasyon hızıdır. Dönüş hızı çok yüksek olduğundan klinostat bir santrifüje dönüşmektedir.

1.4.2.2. Rastgele Konumlama Makinesi

Rastgele konumlama makinesi (*Random Positioning Machine*), düşük yerçekimi koşullarını taklit eden bir diğer makinedir. Japonya’da, T. Hoson tarafından icat edilmiş ve *Dutch Space* tarafından imal edilmiştir. Bu makinenin temel prensibi, bir iç ve dış çerçevenin birbirinden bağımsız olarak düzensiz yönlerde dönmesine dayanmaktadır (Şekil 1.4). Makinenin merkezinde bulunan örnekler bu hareket ile düşük yerçekimine maruz bırakılmaktadır.



Şekil 1.4. Rastgele Konumlama Makinesi (<http://www.grimm-space-research.com>)

1.4.2.3. Döner Duvarlı Kap Biyoreaktörü

NASA Johnson Uzay Merkezi (*Johnson Space Center, JSC*) araştırmacılarından bir grup, yerçekimsiz ortamda hücre kültürü yapılabileceğini öne sürmüştür. Grubun teorisine göre; eğer hücreler, yerçekiminden bağımsız kültüre edilebilirse, kültür kabının dibine yapışmayacaktır. Bununla beraber hücreler besiyeri içinde asılı kalarak kümelenebilecek, canlı vücudundakine daha çok benzeyen dokular

oluşturabilecektir. Uzay araçlarının fırlatıldıkları andan yörüngeye oturdukları ana kadar geçen sürede, hücreler için mikroyerçekimi şartlarının sağlanamaması ve gerçek uzay araçlarındaki deneylerin yüksek maliyetli olması nedeniyle araştırmacılar laboratuvar ortamında mikroyerçekimi oluşturmak üzere sistemler geliştirme arayışına girmişlerdir. NASA mühendisleri çalışmalarının sonucunda **Döner Duvarlı Kap (DDK, *Rotating Wall Vessel, RWV*)** biyoreaktörünü geliştirmişlerdir (Lang ve ark., 2004).

DDK biyoreaktörü, yatay ekseninde dönen silindir şeklinde bir kap bulundurmaktadır (Şekil 1.5). Bu kap, yatay ekseninde dönüş hareketi ile gravitasyonal kuvvetleri etkisiz hale getirerek bir mikroyerçekimi simülasyonu meydana getirmektedir. Silindir şeklindeki bu kabın merkezinde difüzyon ile oksijen temini sağlayan bir silikon membran bulunmaktadır ve bu difüzyon sayesinde hücreler için zararlı olan baloncuk oluşumu engellenmektedir. Kabin içi tamamen vasat ile doldurulmaktadır ve bu şekilde vasat ile havanın teması kesilmektedir.

DDK biyoreaktörünün karakteristik özelliği, hücreleri etkileyen makaslama kuvvetlerini ve türbülansı minimuma indirmesidir (Becker ve ark., 2013). Mekanotransdüksiyon kuvvetlerinin bu şekilde minimuma inmesi, hücre kümelerinin üç-boyutlu yapılar kazanması (organoid oluşturma) için uygun bir kültür ortamı yaratmaktadır. Bu organoidler, 2 boyutlu kültür kaplarında yapılan kültürlerle göre gerçeğe daha yakın davranışlar göstermektedir. Bununla birlikte, 2 boyutlu kültür kaplarında yapılan kültürlerle kıyasla daha ileri bir farklılaşma gösterdikleri ve büyüklüklerinde artış olduğu kaydedilmiştir (Botta ve ark., 2006).

DDK biyoreaktöründe üretilmiş dokuların gerçek dokularla olan büyük benzerlikleri sayesinde protein etkileşimleri, gen ifade analizleri ve sinyal yollarının analizleri yüksek doğrulukta sonuçlar verebilmektedir. Vasatla tamamen dolu olan silindir kap, sürekli dönüş hareketi ile hücresel partiküllerin devamlı askıda kalmasını sağlamaktadır. DDK biyoreaktöründe, vasat içerisinde sürekli birlikte hareket eden yakın partiküller zamanla hücre birliktelikleri oluşturmaya başlarken, bu şekilde

oluşan hücre kümelerinin kütle ve büyüklüklerinde de hızlı bir artış görülmektedir (Botta ve ark., 2006).

Mikroyerçekimde hücre kültürü deneylerinde klinostatlar (*Fast Rotating Clinostat*) ve serbest konumlama makineleri (*Random Positioning Machine*) de kullanılmakla beraber, DDK biyoreaktörü en yaygın ve etkili mikroyerçekimi simülasyon sistemidir (Foster ve ark., 2013; Grimm ve ark., 2014; Rauh ve ark., 2011; Wei, Diao, ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2016).



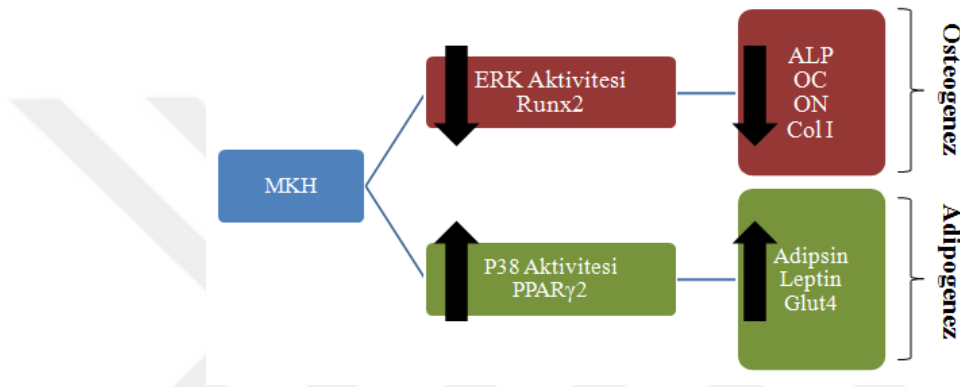
Şekil 1.5. Döner Duvarlı Kap Biyoreaktörü (*ElçinLab*)

1.5. Mikroyerçekimde Kök Hücre Uygulamaları

1.5.1. Mikroyerçekiminin Osteojenik Farklılaşmaya Etkisi

Normal yerçekiminde 7 gün süre ile kültürü yapılan MKH'ler osteojenik belirteçleri (ALP, Col I, ON) yüksek seviyede ifade ederken, mikroyerçekimli ortamda kültürü sürdürülen hücrelerde bu belirteçler çok düşük seviyelerde ifade edilmektedir. Zayzafoon ve ark., osteoblast gelişiminde, osteoblast olgunlaşmasında ve kemik oluşumunda son derece önemli olduğu bilinen Runx2 ifadesini de incelemişlerdir. 7

günlük mikroyerçekimi kültürü sonrasında Runx2 ifadesinin baskılandığı gösterilmiştir. İlginç bir sonuç olarak, mikroyerçekimi şartları yalnızca Runx2 ifadesini baskılamakla kalmayıp, adipogenezle yakından ilişkili olduğu bilinen PPAR γ 2 ifadesini arttırmıştır. Bununla beraber adipogenez belirteç genlerinin (Adipsin, leptin, GLUT4) ifadelerini de incelemişler ve mikroyerçekimi koşullarında ifadelerinin arttığını tespit etmişlerdir. Zayzafoon ve ark., bu çalışma ile mikroyerçekimi koşullarının osteogenezi baskımlarken adipogenezi arttırdığını göstermişlerdir (Zayzafoon ve ark., 2004) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Mikroyerçekimi osteogenezi baskımlarken adipogenezi arttırmaktadır.

Önemli bir kemik matriks bileşeni olan hidroksiprolin ve osteojenik belirteç olan ALP'nin ifadelerin de mikroyerçekiminde baskılandığı bulunmuştur (Huang ve ark., 2009; Uddin ve ark., 2013; Zayzafoon ve ark., 2004; Zheng ve ark., 2007). Osteoblastik farklılaşma için Col I ile integrin reseptörü $\alpha_2\beta_1$ 'in etkileşimi son derece önemlidir. Meyers ve ark. mikroyerçekiminin α_2 ve β_1 alt ünitelerinin ifadesini arttırdığını gözlemlemişlerdir. Bu integrine bağlanan kinazların (FAK ve PYK2) miktarını da inceleyen grup, bu kinazların ifadelerinin değişmediğini ancak otofosforilasyonlarının değiştiğini gözlemlemişlerdir. Yolağın daha aşağı-akış (downstream) üniteleri olan Ras ve ERK ifadesinin de önemli derecede düştüğünü göstermişlerdir (Meyers ve ark., 2004).

ElçinLab'da PLGA sünger üzerinde statik kültür ve DDK biyoreaktörde yapılan kültür karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve DDK biyoreaktörünün sünger iskele

üzerinde osteogenezi arttırdığı bulunmuştur. Buna paralel olarak, osteojenik belirteç ile (osteopontin) boyama sonucunda DDK biyoreaktör kültüründeki hücreler, statik kültüre oranla daha iyi boyanma göstermiştir. Bu çalışma ile mikroyerçekimi koşullarında PLGA iskelelerin osteogenezi arttırdığı gösterilmiştir (Koc ve ark., 2008).

1.5.2. Mikroyerçekiminin Endotelyal Farklaşmaya Etkisi

Mikroyerçekiminin, endotelyal farklılaşma üzerinde de etkisi olduğu gösterilmiştir. *Zhang ve ark.*, 72 saat mikroyerçekimi koşullarında kültürü yapılan MKH'lerin hücre iskelet yapısının değiştiğini ve hücrelerin iğ şeklinden küresel şekle dönüştüğünü göstermiştir (Chen ve ark., 2011; Wang ve ark., 2014). 4 saatlik mikroyerçekimi kültürü stres fiber gerilimlerinde fazla belirgin olmayan bir düşüşe neden olurken, 72 saatlik mikroyerçekimi kültürlerinde tekdüze bir mikrofilaman birlikteliği görülmüş ve stres fiber geriliminde önemli derecede düşüş olduğu kaydedilmiştir. Hücre iskeletinin 10 günlük mikroyerçekimi koşullarında yeniden yapılandığı gösterilmiştir.

Zhang ve ark., endotelyal belirteçler olan Flk-1 ve vWF mikroyerçekimi koşullarında önemli derecede arttığını göstermiştir. *Matrigel Angiogenesis Assay* tekniği ile mikroyerçekiminde damar oluşumu gözlemlenmiş ve mikroyerçekimi grubunda damar tübül uzunluğu, tübül çapı ve alanının yerçekimi grubuna göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (Kang ve ark., 2011; Sokolovskaya ve ark., 2014; Wang ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2013).

1.5.3. Mikroyerçekiminin Kondrojenik Farklaşmaya Etkisi

Mikroyerçekimi koşullarının, kondrojenik farklılaşmayı da etkilediği birçok çalışmada gösterilmiştir. *Yu ve ark.* mikroyerçekimi koşullarında kondrojenik belirteçlerin (Col2A1, agrekan, sox9, Col10A1) ifadesinin yükseldiğini göstermiş,

buna ek olarak p38 fosforilasyonunun da yükseldiğini, kondrojenik farklılaşmanın p38 fosforilasyonunun yükselmesi ile arttığını ifade etmiştir (Yu ve ark., 2011).

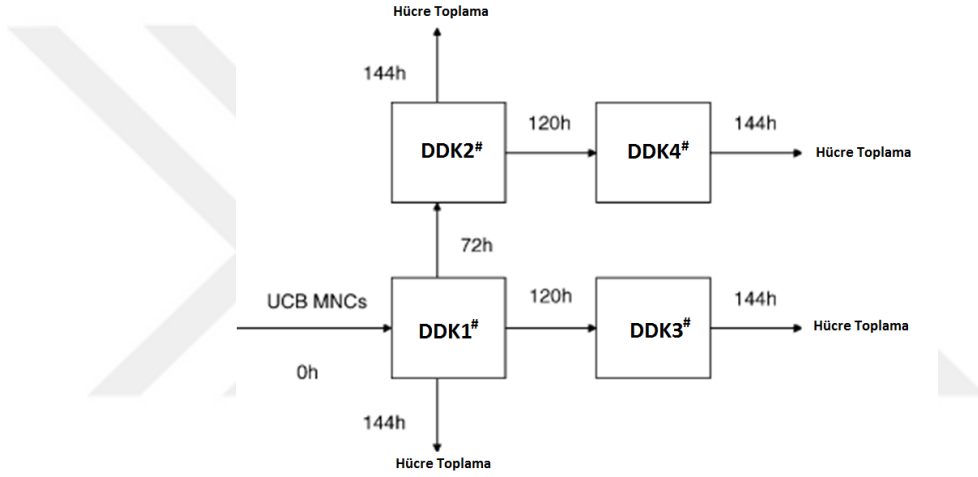
Emin ve ark., önceki çalışmalara paralel olarak DDK biyoreaktöründe kültürü yapılan hücrelerin PLGA süngerin üzerine ve içerisine daha homojen şekilde dağıldığını göstermiştir. Benzer şekilde DDK biyoreaktöründe hücre sayısının arttığı gösterilmiş, kondrojenik belirteçlerin (Anti-Rat kolajen tip I, Anti-Rat Aggrecan, Alcian mavisi) ifadesinin arttığı bulunmuştur (Luo ve ark., 2011; Sheyn ve ark., 2010; Wu ve ark., 2013; Yu ve ark., 2011). Bu çalışma ile PLGA sünger üzerine tohumlanan MKH'lerin, DDK biyoreaktöründe statik kültüre kıyasla kondrogenezinin arttığı gösterilmiştir (Emin ve ark., 2008).

1.5.4. Mikroyerçekiminde Hematopoetik Kök Hücre Kültürü

DDK biyoreaktörünün hematopoetik kök hücre (HKH) kültürü için başarılı bir sistem olduğu *Liu ve ark.*'ın 2006 yılında yaptıkları çalışma ile gösterilmiştir. Geleneksel hücre kültürü yöntemlerinde kullanılan kültür kapları, kültür vasatında yüksek konsantrasyon gradiyentleri oluşturmaktadır. Bununla beraber bu kaplarda, yalnızca yüzey alanının sınırladığı sayıda HKH çoğaltılabilmektedir. DDK biyoreaktörü, 3 boyutlu süspansiyon hücre kültürü ortamı sağlamaktadır (Ferrarini ve ark., 2013; Lei ve ark., 2011; Morabito ve ark., 2015). Vasat içinde asılı halde yaşayan hücrelerin sitokinlerden daha etkin şekilde faydalandığı belirtilmiştir. *Liu ve ark.*, kordon kanı mononükleer hücrelerini normal kültür kaplarında ve DDK biyoreaktöründe kültüre etmiş ve DDK biyoreaktöründe çok başarılı bir sonuç elde etmiştir. Kültür kaplarında 12 saatten sonra CFU-GM (Colony Forming Unit - Granülosit-Makrofaj) üretimi görülmezken, DDK biyoreaktöründe 216 saate kadar artış kaydedilmiştir (Liu ve ark., 2006).

Hastaya, kg başına $1,5 \times 10^7$ mononükleer hücre ve $1,5 \times 10^5$ CD34⁺ hücre verilmesi, güvenli kordon kanı transplantasyonu için eşik değerdir. Bu, 80 kg ağırlığında bir hasta için en az $1,2 \times 10^9$ mononükleer hücre ve $1,2 \times 10^7$ CD34⁺ hücre verilmesi

anlamına gelmektedir. 1×10^8 mononükleer hücrenin %1 $CD34^+$ hücre içerdiği varsayılmaktadır. Liu ve ark., bu miktarda HKH ve progenitörlerini DDK biyoreaktöründe geliştirmek için bir yöntem geliştirmiştir. Bu işlem için 4 DDK biyoreaktörü kullanan araştırmacılar, DDK1'e 2×10^5 mononükleer hücre ekmiştir. 72 saat kültür sonrasında DDK1'deki hücrelerin yarısını DDK2 ye aktarmış, 120 saat sonrasında ise her iki DDK'nın yarısını DDK3 ve DDK4'e transfer etmişlerdir. 144 saat sonunda istenen sayıda hücreye ulaşılmış ve hücreler toplanmış, hastaya nakledilmeye hazır hale getirilmiştir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Hastaya Nakil İçin Yeterli Mononükleer Hücre Üretimi Amaçlı DDK Biyoreaktör Stratejisi, (Liu ve ark., 2006)

1.5.5. Mikroyerçekimi Koşullarının Diğer Etkileri

MKH'lerin, 72 saat mikroyerçekimi koşullarında küresel şekil aldıklarını gösteren bir diğer çalışmada, bir pluripotens belirteci olan OCT4 ifadesinin 48 ve 72 saat süreli mikroyerçekiminde yükseldiğini göstermiştir. Bu veriler ışığında, MKH'lerin 72 saat mikroyerçekiminde kültüre edilmesi ile maksimum pluripotens seviyesine ulaşabileceği ifade edilmiştir (Wang ve ark., 2014).

DDK biyoreaktöründe kültür vasatı içerisinde kullanılan mikrotasıyıcılar (Cytodex-3) üzerinde geliştirilen hücrelerin gerçek çok tabakalı epitel dokusuna benzer 3-

boyutlu yapılanmalar oluşturduğu gösterilmiştir. Yerçekimi kültüründe ise tek tabakalı bir yapı oluşturduğu belirtilmiştir (Lei ve ark., 2011). DDK biyoreaktöründe kültürü yapılan BHK-21 hücrelerinin birbirlerine daha iyi tutundukları ve 3-boyutlu yapı oluşturdıkları gösterilmiştir (Schwarz ve ark., 1992).

Mikroyerçekimi koşullarının nöronal farklılaşmaya etkisi de araştırılmıştır. Nöronal farklılaşma belirteçlerinin (MAP-2, TH, CHAT) mikroyerçekimi koşullarında daha yüksek miktarlarda ifade edildiği gösterilmiştir (Chen ve ark., 2011).

Mikroyerçekimi koşullarının kas-iskelet yapısında birçok değişikliğe neden olduğu bilinmektedir. Müsküler atrofi ve kasılma kuvvetinde azalma en sık görülen değişikliklerdir (Gopalakrishnan ve ark., 2010; Lambertz ve ark., 2001; LeBlanc, Lin, ve ark., 2000; Narici ve ark., 2003).

Uzun süre uzayda kalan astronotların saç foliküllerinde hücre bölünmesinin baskılandığı bulunmuştur (Terada ve ark., 2016).

1.6. Kök Hücreler

1.6.1. Kök Hücre

Kök hücreler, özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen ve daha fazla kök hücre üretmek için kendini yenileyebilen, tüm çok hücreli canlıların doku ve organlarını oluşturan ana hücrelerdir.

Bir hücrenin kök hücre olabilmesi için; **kendini yenileme** ve **özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilme** özelliklerini bulundurması gereklidir (Elcin, 2016a; Gardner, 2002; He ve ark., 2009). Kendini yenileme, kök hücrelerin farklılaşmamış hallerini sürdürerek çok sayıda hücre bölünmesi yapabilme yeteneğidir. Bir kök hücrenin, kendisiyle özdeş olan bir ana hücre ile beraber, farklılaşma yoluna girmiş

bir başka hücre üretmesine **asimetrik hücre bölünmesi** denir. Kök hücreler kendini yenileme özelliklerini asimetrik hücre bölünmesi yetenekleri ile sağlamaktadır.

Kök hücreler özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilmektedirler. Bu yeteneklerinin genişliği, kök hücrelerin **yetkinliği (potensi)** ile ilgilidir. **Totipotent** kök hücreler, bir organizmayı tamamı ile oluşturabilen hücrelerdir. Organizmadaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilmektedirler. Yumurta ve spermin birleşmesiyle meydana gelen zigotun ilk birkaç bölünmesiyle meydana gelen hücreler totipotenttir. **Pluripotent** kök hücreler, üç germ tabakasına (ektoderm, endoderm ve mezoderm) farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir, fakat plazenta gibi trofoblast kökenli embriyo dışı dokulara dönüşemezler ve bu nedenle tek başlarına yeni bir birey oluşturamazlar. **Multipotent** kök hücreler daha sınırlı sayıda hücre tiplerine, **oligopotent** kök hücreler ise sadece birkaç hücre tipine farklılaşabilen hücrelerdir. **Unipotent** kök hücreler ise yalnızca bir hücre tipini üretebilen kök hücrelerdir. (Seydoux ve ark., 2006; Spencer ve ark., 2011).

1.6.2. Memeli Vücudundaki Kök Hücre Tipleri

Kök hücreler, kökenlerine göre dört ana sınıfta incelenmektedir; embriyodan elde edilen kök hücreler, fetustan elde edilen kök hücreler, kordon bağından elde edilen kök hücreler yetişkinlerden elde edilen kök hücreler (Bongso ve ark., 2005; Elcin, 2016b; Kern ve ark., 2006).

Memelilerde döllenmiş yumurta 2, 4, 8 hücreye bölünmektedir ve bölünmeye devam ederek morulayı meydana getirmektedir. Döllenme ile blastula safhası arasındaki bu aşamalarda tüm hücreler totipotent hücrelerdir (Bongso ve ark., 2004).

Blastokistin iç hücre kümesinden elde edilen embriyonik kök hücreler (EKH) pluripotent hücrelerdir. EKH'ler, yüksek telomeraz aktivitesine sahip, çoğalma kapasitesi çok yüksek olan hücrelerdir. EKH'ler üç germ tabakası olan ektoderm,

endoderm ve mezoderme farklılaşabilmektedir. Yetişkin bir insan vücudundaki 200'den fazla hücreye farklılaşabilme yeteneğindedirler.

Çok sayıda hücre tipine farklılaşabilen EKH'lerin, doku mühendisliği için kullanışlı bir transplantasyon kaynağı potansiyeli taşıdığı ifade edilmiştir (Levenberg ve ark., 2002). EKH'lerin kardiyomiyositlere, nöronlara, hepatositlere, kemik iliği hücrelerine, adacık hücrelerine, endotelyal hücrelere vb. birçok hücreye farklılaştığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Davila ve ark., 2004). Araştırmacılar Parkinson hastalığının tedavisinde kullanabilmek için EKH'leri dopamin üreten hücrelere farklılaştırmışlardır (Parish ve ark., 2007; Perrier ve ark., 2004). Bir diğer çalışmada, diyabet hastalığına çözüm yolu geliştirmek amacıyla EKH'ler insülin üreten hücrelere farklılaştırılmıştır (D'Amour ve ark., 2006).

EKH'lerin blastokist iç hücre kütesinden elde edilmesi, genellikle blastokistin parçalanmasını gerektirdiğinden etik problemler oluşturmuştur ve insan EKH'lerinin kullanımı günümüzde halen tartışılmaktadır.

Fetüsten elde edilen kök hücreler. Genellikle düşük yapılmasının ardından fetüsün kendisinden elde edilen **fetal kök hücreler** ve embriyonik membrandan elde edilen **ekstraembriyonik fetal kök hücreler** olmak üzere iki tip fetal kök hücre bulunmaktadır (Bongso ve ark., 2005; Wagner Jr ve ark., 2016; White-Walker).

Kordon kanı, fetal hematopoietik kök hücrece zengin bir kaynaktır (Bongso ve ark., 2004). Bununla beraber kordon kanının aynı zamanda bir MKH kaynağı olduğu gösterilmiştir (Bongso ve ark., 2005).

Wharton's jelly (WJ), MKH'ler için önemli bir kaynak sağlamaktadır. WJ, ekstraembriyonik bir dokudur ve doğumdan sonra kolaylıkla elde edilebilmektedir. WJ'de bulunan MKH'ler kemik iliğine göre daha yüksek erişilebilirliğe sahiptir ve etik kısıtlaması da kemik iliğine göre daha azdır. Kemik iliğinden MKH izolasyonu donör için ağırlı bir sürece neden olurken, WJ'den MKH izole etmek için donöre

herhangi bir müdahaleye ihtiyaç duyulmamaktadır (El Omar ve ark., 2014; Subramanian ve ark., 2012).

WJ-MKH'lerin, yetişkin dokulardan elde edilen MKH'lere göre daha ilkel hücreler olduğu ve embriyonik ile yetişkin kök hücreler arasında özellikleri olduğu ifade edilmektedir (Troyer ve ark., 2008). Ayrıca, WJ-MKH'lerin potansiyel olarak daha yüksek miktarlarda mevcut olduğu, daha yüksek proliferasyon oranına sahip oldukları, iyi derecede yayılma özellikleri gösterdikleri, teratomayı indüklediği ve güçlü bir immünmodülatör kapasite barındırdıkları çalışmalarda ifade edilmiştir (El Omar ve ark., 2014).

Yetişkin kök hücrelerin büyük bölümü multipotenttir. Belirli hücre tiplerine farklılaşabilen erişkin kök hücreleri insan vücudunda hasarlı dokuların onarımı için son derece önem taşımaktadır.

Kemik iliği, erişkin kök hücrelerin bulunduğu en zengin kaynaklardan biridir. Kemik iliği kök hücrelerinin, omurilik yaralanmaları, karaciğer sirozu, kalp yetmezliği, kronik iskemiler gibi hastalıklara tedavi geliştirmek için kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Subramanian ve ark., 2011; Terai ve ark., 2006; William ve ark., 2011).

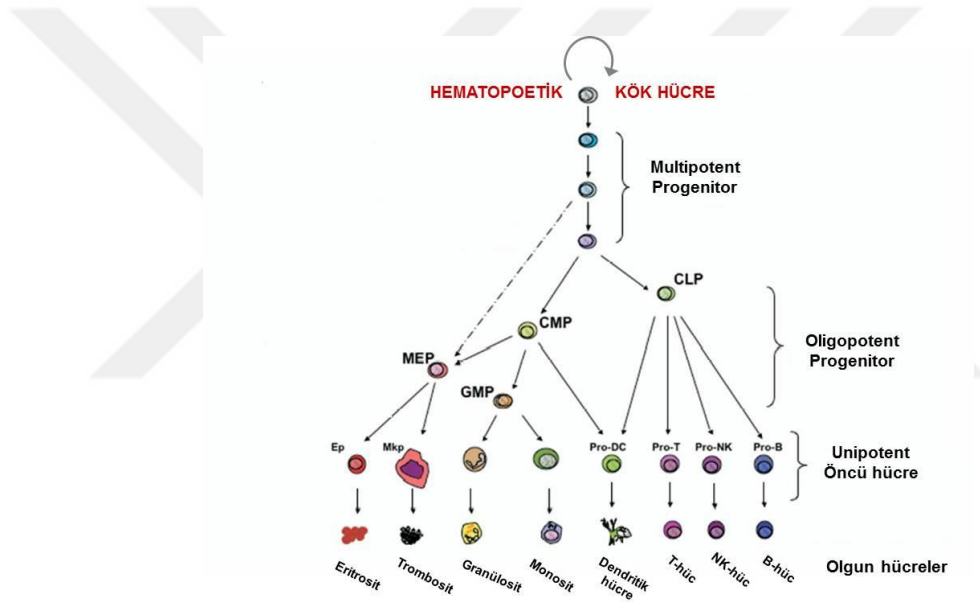
Hematopoietik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler, bağırsak kök hücreleri, karaciğer kök hücreleri, kemik ve kıkırdak kök hücreleri, epidermal kök hücreler, nöronal kök hücreler, pankreatik kök hücreler ve göz kök hücreleri yetişkin kök hücre tipleridir.

Hematopoietik kök hücreler (HKH) ve mezenkimal kök hücreler (MKH), kemik iliğinde bulunan erişkin kök hücrelerdir.

HKH'ler, kırmızı kemik iliğinde konuşlanmış kan kök hücreleridir. Miyeloid (monositler, makrofajlar, bazofiller, eozinofiller, megakaryositler/plateletler, dendritik

hücreler) ve lenfoid (T hücreleri, B hücreleri, NK hücreleri) hücre soylarına farklılaşabilmektedir (Şekil 1.8).

HKH'lerin temel kaynakları pelvis, femur ve sternum kemik ilikleridir. Kordon kanı ve periferel kanda da HKH'lerin varlığı bilinmektedir. HKH'lerin temel belirteci CD34 hücre yüzey belirtecidir. Uzun süreli koloni oluşturabilen HKH'lerin çoğunluğu CD34+CD38- hücrelerdir (Ural, 2012). HKH'ler hastalara otolog (Hastanın kendi kök hücreleri) veya allojenik (Donörden alınan kök hücreler) olarak transplante edilebilirler.



Şekil 1.8. Hematopoetik Kök Hücrelerin Farklılaşması (Hematopoez) (<http://kanbilim.com>)

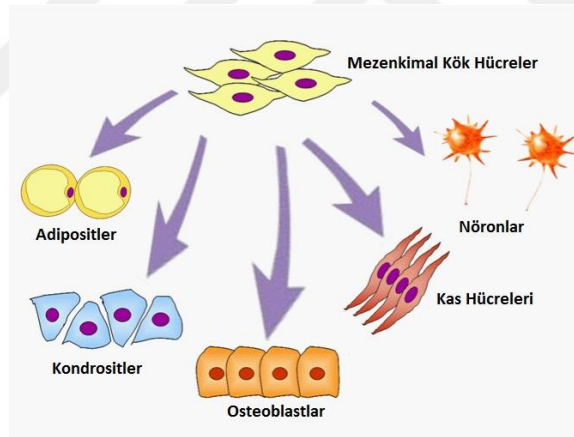
1.6.3. Mezenkimal Kök Hücreler

MKH'ler kemik iliği stromasının hematopoietik olmayan bölgelerinde bulunmaktadır (Bongso ve ark., 2005). MKH'ler; osteoblastlara, kondrositlere, adipositlere ve myelositlere, tendonlara ve ligamentlere farklılaşabilen multipotent kök hücrelerdir (Beyer Nardi ve ark., 2006; Brighton ve ark., 1997; Elcin, 2003; Koc ve ark., 2008; Oni, 1992) (Şekil 1.9). Stromal kök hücreler olarak da bilinen MKH'ler kemik iliği,

kordon kanı, yağ doku, Wharton's Jelly, diş pulpası gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedir (Elcin, 2016c; Koc ve ark., 2008; Sanz ve ark., 2015). MKH'lerin periferik kanda da bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Chong ve ark., 2012).

MKH'ler yüksek seviyede kendini yenileme kapasitesine sahiptir. Osteoblastlara, adipositlere ve kondrositlere (*3-lineage* özelliği) farklılaşabilme yetenekleri MKH'lerin karakterize özelliğidir. MKH'lerin nöron-benzeri hücrelere farklılaştığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Birbrair ve ark., 2011; Jiang ve ark., 2002).

MKH'lerin, salgıladıkları sitokinler aracılığıyla dendritik ve T-hücrelerini etkileyerek immünmodülatör etkilerinin olduğu da bilinmektedir (Ryan ve ark., 2005).



Şekil 1.9. MKH'lerin Farklılaşması (<https://omicsonline.org>)

1.7. Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipositlere Farklılaşması

1.7.1. Adipogenez

Adipogenez, yeni bir adipoz doku oluşturan biyolojik süreçtir. Adipoz doku enerji homeostazında, lipid metabolizmasında ve insülin eylemlerinde büyük rol oynamaktadır. Memelilerde iki tip adipoz dokusu tanımlanmıştır; beyaz adipoz doku ve kahverengi adipoz doku (Cinti, 2005). Beyaz adipoz dokunun esas rolü, triaçilgliserol salımı ve depolanması aracılığı ile enerji homeostazını düzenlemektir (Rosen ve ark., 2006). Beyaz adipoz doku, salgıladığı adipokinler aracılığıyla besin alımı ve enerji homeostazında görev alırken, metabolik bozuklukların inflamatuvar evrelerinde de görev almaktadır (Waki ve ark., 2007). Kahverengi adipoz doku, ısı üretimi aracılığıyla enerji yayan termojenik aktiviteye sahiptir (Spiegelman ve ark., 2001).

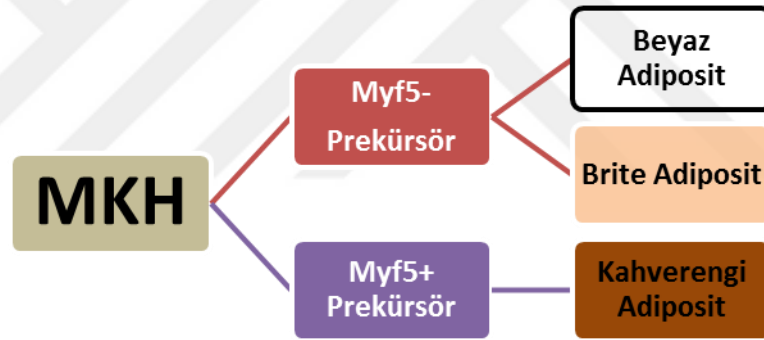
Beyaz adipositler, tek ve büyük lipid damlacığına ve az sayıda mitokondriye sahip olmaları ile karakterizedir. Kahverengi adipositler ise birçok lipid damlacıklarına ve çok sayıda mitokondriye sahiptir (Cai ve ark., 2013). Kahverengi adipositlerin BATokinler (*Brown Adipose Tissue*, *BAT-derived adipokines*) olarak bilinen adipokinleri salgıladıkları, trigliserit ve glukoz yıkımında da rolleri olduğu da gösterilmiştir (Chartoumpakis ve ark., 2011; Hondares ve ark., 2010).

Son dönemlerde yapılan çalışmalarla, farelerde hem beyaz hem de kahverengi adiposit özelliklerini gösteren hücre tipi keşfedilmiştir. *Brite* adipositler (*Brown and White*) olarak adlandırılan bu hücreler, her iki hücre tipinin de özelliklerini taşımaktadırlar.

Mezenkimal kök hücreler adipojenik farklılaşma sürecinde, beyaz ve kahverengi adipoz dokuların alt tipleri olan adiposit prekürsörlerine farklılaşmaktadır. Kahverengi adipositlerin prekürsörleri miyojenik transkripsiyon faktörü Myf5'i ifade etmektedir. Buna zıt olarak beyaz adipositler Myf5 ifade etmemektedir (Şekil 1.10).

Brite adipositlerin ise, kahverengi adipositlerin birçok özelliğini gösterirken *Myf5* ifade etmedikleri tespit edilmiştir (Barbatelli ve ark., 2010; Petrovic ve ark., 2010; Seale ve ark., 2008).

Adiposit formasyonu iki basamaklı bir süreçtir; determinasyon aşaması ve terminal farklılaşma fazı. Determinasyon fazında MKH'ler adipositik nesile yönelmiştir ve diğer mezenkimal nesillere farklılaşma yeteneğini kaybetmiştir. Sonraki aşama olan terminal farklılaşma fazında, yönlendirilmiş hücreler farklılaşarak olgun adiposit karakteri kazanmaktadır (Feve, 2005). Farklılaşma orijinlerindeki ve fizyolojik fonksiyonlarındaki farklılıklara rağmen kahverengi ve beyaz adipositlerin transkripsiyonel farklılaşma kaskatları çok benzerdir.



Şekil 1.10. Adipositlerin Alt Tipleri ve Orjinleri

1.7.2. Adipojenik Belirteçler

PPAR γ 2

Peroksizom Proliferatör ile Aktifleştirilen Reseptörler (PPAR), ligant-aktif transkripsiyon faktörleri arasındadır ve çekirdek hormon reseptörleri süperailisinin

bir üyesidir. Memelilerin adipoz dokusunda yüksek miktarlarda ifade edilen bir reseptördür. Alt grubuna göre isimlendirilen üç alt tipi bulunmaktadır; PPAR α , PPAR δ ve PPAR γ (Michalik ve ark., 2006).

PPAR γ , PPAR γ 1 ve PPAR γ 2 olmak üzere iki izoforma sahiptir; PPAR γ 1 kas dokusu dışında tüm dokularda ifade edilirken, PPAR γ 2 adipoz dokuda ifade edilmektedir ve adiposit farklılaşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Preadipositlerin adipositlere farklılaşması sırasında PPAR γ ifadesinin arttığı çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir (Elbrecht ve ark., 1996; Fajas ve ark., 1997; Lin ve ark., 2008; Wang ve ark., 2012).

PPAR γ ifadesinin genetik mühendisliği yöntemleriyle susturulduğu farelerde kahverengi ve beyaz adipoz doku oluşumunda ve işlevlerinde anormallikler gözlenmiştir. Yüksek yağlı diyetle beslenen bu farelerde kilo artışının oldukça düştüğü ve adipogenez için önemli belirteçler olan leptin ve adiponektin konsantrasyonlarının da oldukça azaldığı kaydedilmiştir (Jones ve ark., 2005).

Kahverengi ve beyaz adipositlerin her ikisinin de adipojenik programı, PPAR γ ifadesi ve aktivasyonuna dayanmaktadır. PPAR γ , lipit sensörü görevi yapan bir nükleer hormon reseptörüdür ve adipogenezin esas transkripsiyonel regülatörüdür (Rosen ve ark., 2000). Ayrıca PPAR γ yalnızca adipogenez için değil, farklılaşmış adipositlerin devamlılığı için de çok kritiktir (Tamori ve ark., 2002).

Leptin, Adiponektin ve Adipsin

Yağ hücrelerinin salgıladığı önemli bazı spesifik belirteçler adiponektin ve leptin hormonlarıdır (Feve, 2005; Gimble ve ark., 2008; Moreno-Navarrete ve ark., 2012). Leptin, adipozitede rolü olduğu keşfedilen ilk adipokindir. Leptin yalnızca yağ doku tarafından salgılanır. Besin alımını baskılayarak ve enerji tüketimini kontrol ederek adipostat görevi görmektedir. Leptin veya leptin reseptörü mutant olan hayvan ve insanlarda obezite görülmektedir (Rosen ve ark., 2006). Leptin çok sayıda çalışmada adiposit belirteci olarak kullanılmıştır (Choi ve ark., 2016; Conde ve ark., 2011;

Ronti ve ark., 2006; Sackmann-Sala ve ark., 2014; Trayhurn ve ark., 2008; Wabitsch ve ark., 2001).

Birçok farklı ismi (apM1, GBP28, AdipoQ ve ACRP30) bulunan adiponektin, ileri evreye ulaşmış adipositlerde lipit kürelerinin oluşumuyla beraber ifade edilmektedir (Fink ve ark., 2011; Jones ve ark., 2005; Wang ve ark., 2013; Wei, Li, ve ark., 2013). Adiponektin, glukoz regülasyonu ve yağ asidi oksidasyonu dahil bir çok metabolik işlemi modüle etmektedir (Diez ve ark., 2003).

Adipositlerde önemli derecede ifade edilen bir diğer protein adipsindir (Adiposit tripsin; kısaca adipsin) (Cowherd ve ark., 1999). Adipsin, adipoz hücrelerde glukoz transportunu uyararak trigliserit depolanmasını harekete geçirmektedir. Bununla beraber yağ asitlerinin yeniden esterleşmesini arttırmakta ve yağ yıkımını azaltmaktadır (Ronti ve ark., 2006).

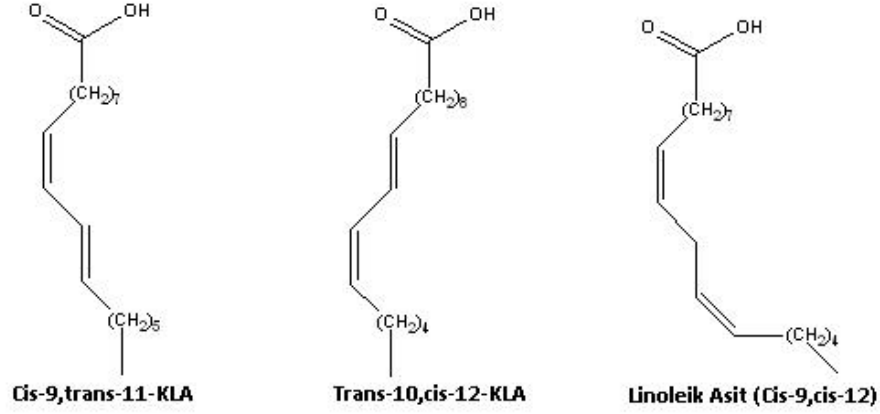
1.7.3. Linoleik Asit

Linoleik asit, esas yağ asitleri ailesinin bir üyesidir. Esas yağ asitleri, insan vücudunda diğer besin bileşenlerinden sentezlenemeyen yağ asitleridir (Burr ve ark., 1930).

Linoleik asidin, açık formülündeki çift bağların dizilimine göre isimlendirilen birçok izomeri bulunmaktadır (Şekil 1.11). Bu izomerlerin yağ dokusu oluşumu üzerine etkileri birçok araştırmacı tarafından incelenmektedir.

Linoleik asidin yağ dokusu oluşum sürecini nasıl etkilediğini inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan bir araştırmada cis-9,trans-11 ve trans-10,cis-12 konjuge linoleik asitleri preadiposit farklılaşması aşamasında vasata eklenmiştir. Her iki yağ asitinin de adipogenezi baskıladığı gösterilmiştir (Yeganeh ve ark., 2016). Buna ilave olarak trans-10,cis-12 konjuge linoleik asidin adipogenezi baskıladığı, yağ depolanmasını azalttığı ve bunlara zıt olarak kemik formasyonunu arttırdığı ifade

edilmiştir (Brown ve McIntosh, 2003; Kim ve ark., 2013; McNeel ve ark., 2003; Platt ve ark., 2009).



Şekil 1.11. Linoleik Asitin İzomerleri (<http://www.jyi.org/>)

Yapılan araştırmalarda cis-9,trans-11 ve trans-10,cis-12 konjuge linoleik asidin adipogenez ile yakından ilişkisi bulunan PPAR γ 'nın ifadesini azalttığı gösterilmiştir (Kennedy ve ark., 2008; McNeel ve ark., 2003; Platt ve ark., 2009).

Cis-9,trans-11 ve trans-10,cis-12 konjuge linoleik asitlerin adipogenez üzerine etkileri yapılan araştırmalarda gösterilirken, linoleik asidin esas formu olan cis-9,cis-12'nin adipogenez üzerine etkileri net bir şekilde araştırılmamıştır. Bu çalışmanın mikroyerçekimi koşullarının adipogenez üzerine etkilerinden başka bir diğer hedefi de, cis-9,cis-12 linoleik asidin adipogenez üzerine etkilerinin hem yerçekiminde hem de mikroyerçekimi koşullarında incelenmesidir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

DMEM F-12	Lonza, No: 5MB038
DMEM 4,5 g/L Glukoz	Lonza, No: 5MB045
RNA Later	Ambion
Trypsin/EDTA	Sigma
PBS	Sigma, Merck
Metanol	Merck
Gluteraldehit	Electron Microscopy Sciences
İnsülin	Sigma-Aldrich
Dekzametazon	Sigma-Aldrich
3-izobütil-1-metilksantin (IBMX)	Sigma-Aldrich
Linoleik Asit	Sigma-Aldrich
Adipsin (P-16)	Santa Cruz Biotechnology, inc., Sc-12402
GLUT4 (IF8)	Santa Cruz Biotechnology, inc., Sc-53566
Leptin (Ob)	Santa Cruz Biotechnology, inc., Sc-48408
PPAR γ 2 (A-1)	Santa Cruz Biotechnology, inc., Sc-166731
High Pure RNA Isolation Kit	Roche
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche
Light Cycler [®] 480 Probes Master	Roche

2.2. Cihazlar ve Kùltür Ekipmanları

DDK Biyoreaktörü	Synhecon
Rotary Cell Culture Vessel (10 ml)	Synhecon, No: D-110
Santrifüj	Beckman Coulter, Allegra® X-15R
İnversiyon Mikroskobu	Zeiss
İnkübatör	Thermo Scientific, Heracell 150i
Laminer Kabin	K system IVF Workstation L226
Otoklav	Sanyo, MLS-3780
Kùltür Kapları (75, 225 cm ²)	Corning
Tüpler (50 ml, 15 ml)	Corning
Mini Santrifüj	Gilson, GmCLab
Elektroforez	Bio-Rad Powerpac Universal
Jel Görüntüleme	G:BOX, Syngene
Nanodrop	Thermo Scientific
PCR Kabini	Isocide
Thermal Cycler	Bio-Rad
Real Time PCR	Light Cycler® 480 II

2.3. Dondurulmuş Adipoz Mezenkimal Kök Hücrelerin Çözölüp Kùltüre Adapte Edilmesi

Bu çalışmada, daha önceden etik kurul izni ile (AÜTF; 01/03/2010; 08-129) temin edilen; atık adipoz dokudan izole edilip, çoğaltılan ve immünfenotiplendirmesi yapılmış bulunan insan adipoz mezenkimal kök hücreleri (AMKH'ler) kullanıldı. Dondurulmuş olarak saklanan AMKH'ler standart yöntemle çözölüp kùltüre adapte edildi ve istenilen hücre sayısına ulaşılana kadar pasajlandı. Kùltür işlemleri, AMKH'ler için standart kùltür vasat ortamında (DMEM/F12-%10 FBS) ve 37°C, 5% CO₂, 95% nem şartlarında tutulan karbondioksitli inkübatörde sürdürüldü.

Dondurulmuş hücrelerin açılması işleminde, izole edilip dondurulmuş hücrelerin yeniden çözülmesi için bir beherin içine su konularak 37° C' ye ısıtıldı. Isıtılan suyun içine numune (-86° C) konuldu. Konulan kriyotüp çözülene kadar beklendi. Son kristal-buz parçası kaldığında vasata eklendi. Tam vasat hazırlandı. 15 ml'lik kapaklı santrifüj tüpüne 2-3 ml konuldu. Kriyotüpün içindeki hücreler ve DMSO tam çözünmeden alınarak 15 ml'lik tüpün içerisine damla damla eklendi (Çözünme işleminin uzaması, DMSO'nun hücreleri etkileyerek hücre canlılığının azalmasına yol açar). İçinde tam vasat, hücreler ve DMSO bulunan 15' ml'lik tüp, 1100 rpm'de 11 dk. santrifüj edildi. Tüpün içinde santrifüjleme sonucu elde edilen pellette hücreler bulunmakta olup, süpernatant atıldı. Pelletin üzerine tam vasat konularak pipetleme yapıldı. Hücreler 75 cm²'lik kültür kaplarına aktararak üzerlerine tam vasat eklendi ve 37°C, 5% CO₂, 95% nem şartlarında tutulan karbondioksitli inkübatöre konuldu.

2.4. Döner Duvarlı Kap Biyoreaktörünün Hazırlanması

Ön Temizleme

1. Cıvatalar sökülerek kap parçalarına ayrıldı. Ön ve arka kapağın iç yüzünde bulunan halkalar, göbekteki oksijen membranı ve port söküldü.
2. Tüm parçalar, çok fazla asidik veya bazik olmayan bir laboratuvar deterjanı ile dolu bir kap içerisine yerleştirildi ve 1 saat bekletildi.
3. Parçalar hiçbir sert fırça kullanmadan, lateks eldivenler ile hafif hareketlerle temizlendi.
4. Tüm parçalar musluk suyunda durulandı.
5. Tüm parçalar bir gece boyunca saf su içerisinde bekletildi.
6. Parçalar açık havada kurumaya bırakıldı.

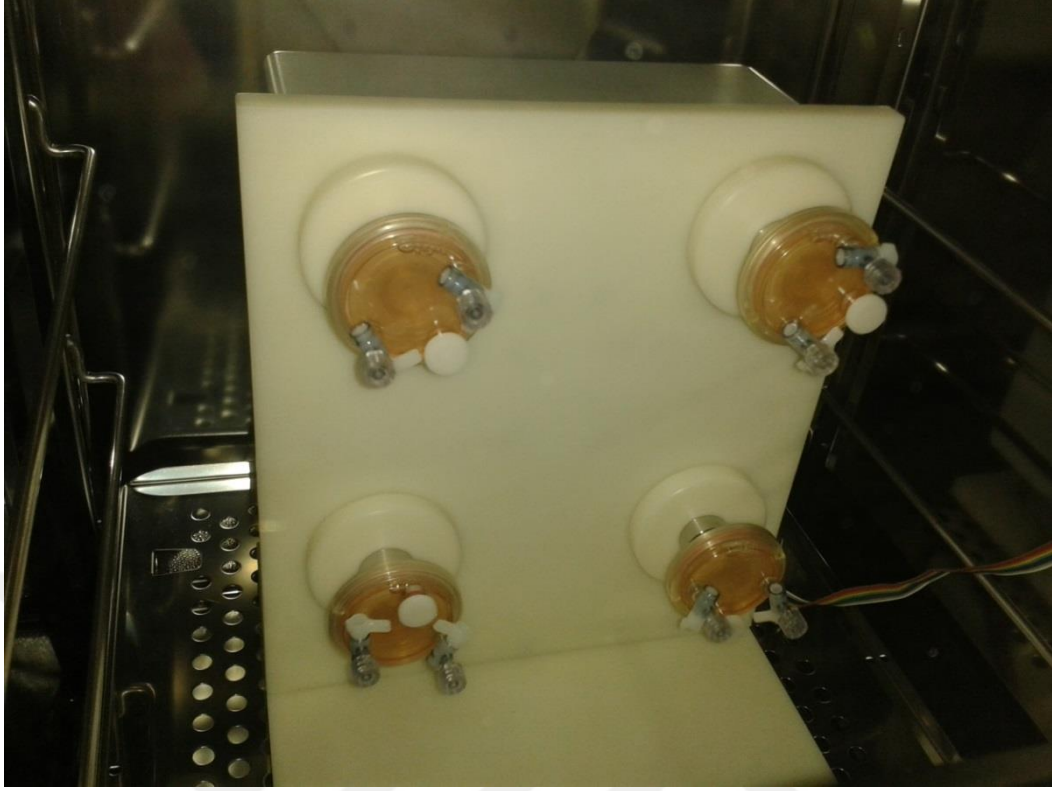
7. Kap yeniden birleştirildi.

Otoklavda Sterilizasyon

1. Doldurma portu yerinden çıkartıldı.
2. Kaplar ve portlar ayrı ayrı alüminyum folyolara sarıldı.
3. Otoklava konulmadan önce kabin cıvataları birkaç tur gevşetildi.
4. 121°C de 20 dakika sterilizasyon için otoklav başlatıldı.
5. Otoklavın ardından parçalar kurumaya bırakıldı.

225 cm² kültür kaplarında geliştirilip konfluent hale ulaştıktan sonra tripsinleme işlemine alınan pasaj 7 aşamasındaki AMKH'ler 4 adet biyoreaktöre, 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde tohumlandı.

DDK biyoreaktörüne hücrelerin yüklenmesi aşamasında kabin içerisinde steril paketlerinden çıkartılan döner kaplar, çalışmayı kolaylaştırmak amacı ile 6'lık kuyu üzerine yerleştirildi (Şekil 2.1). Döner kap üzerindeki kapakçık dikkatlice çıkartıldı. 10 ml'lik steril şırınga içerisine 5 ml vasat çekilerek açılan kapakçıktan yavaşça döner kap içerisine dolduruldu. Daha önceden hazır hale getirilmiş hücreler de aynı şekilde kapakçıktan döner kap içerisine aktarıldı.



Şekil 2.1. İnkübatör içerisinde dönüşe hazır DDK Biyoreaktörü (*ElçinLab*)

Döner kap içinde kalan hava boşluğunun doldurulması için iki adet insülin şırıngası (1 ml) kullanıldı. Bir insülin şırıngası vasat doldurmak için, diğer şırınga döner kap içinde kalan hava boşluğunu çekmek için kullanıldı. Döner kap üzerindeki muslukların kapakları açıldı. Bu işlem sırasında musluk vanaları açılmamalıdır. Vasatla doldurulan şırınga, döner kap üzerindeki musluğa takıldı. Boş olan şırınga da diğer musluğa takıldı. Döner kap hareket ettirilerek içindeki hava boşluğu musluğun altına getirildi, bu musluk vanası dik konuma getirilerek açıldı ve boş şırınga içine bu hava kabarcıkları çekildi. Hava çekildikten sonra bu musluğun vanası kapatıldı. Vana kapatıldıktan sonra şırınga içindeki hava bir atık kabına boşaltılarak yeniden musluğa takıldı. Vasatla doldurulan şırınganın takılı olduğu musluk, vanası açıldıktan sonra yavaşça döner kap içerisine dolduruldu. Şırınga içindeki tüm vasat doldurulduktan sonra musluk vanası yatay konuma getirilerek kapatıldı ve şırıngaya yeniden vasat dolduruldu. Bu işlemler döner kap içerisinde hava kabarcığı kalmayana dek tekrarlandı. İçinde hava kabarcığı kalmayan döner kap, biyoreaktöre takılmaya hazır halde getirildi. Döner kaplar biyoreaktöre dikkatli bir şekilde takıldı ve herhangi bir

akıntı-sızıntı olup olmadığı kontrol edildi. Cihaz üzerindeki anahtar “ON” konumuna getirilerek rotasyon başlatıldı. Hücrelerin yeni ortama alışması için 10 rpm hızında 30 dk süre ile çevrildi. Sonrasında dönüş hızı 30 rpm’ ye çıkartıldı. 24 saatte bir vasat değişimi yapıldı.

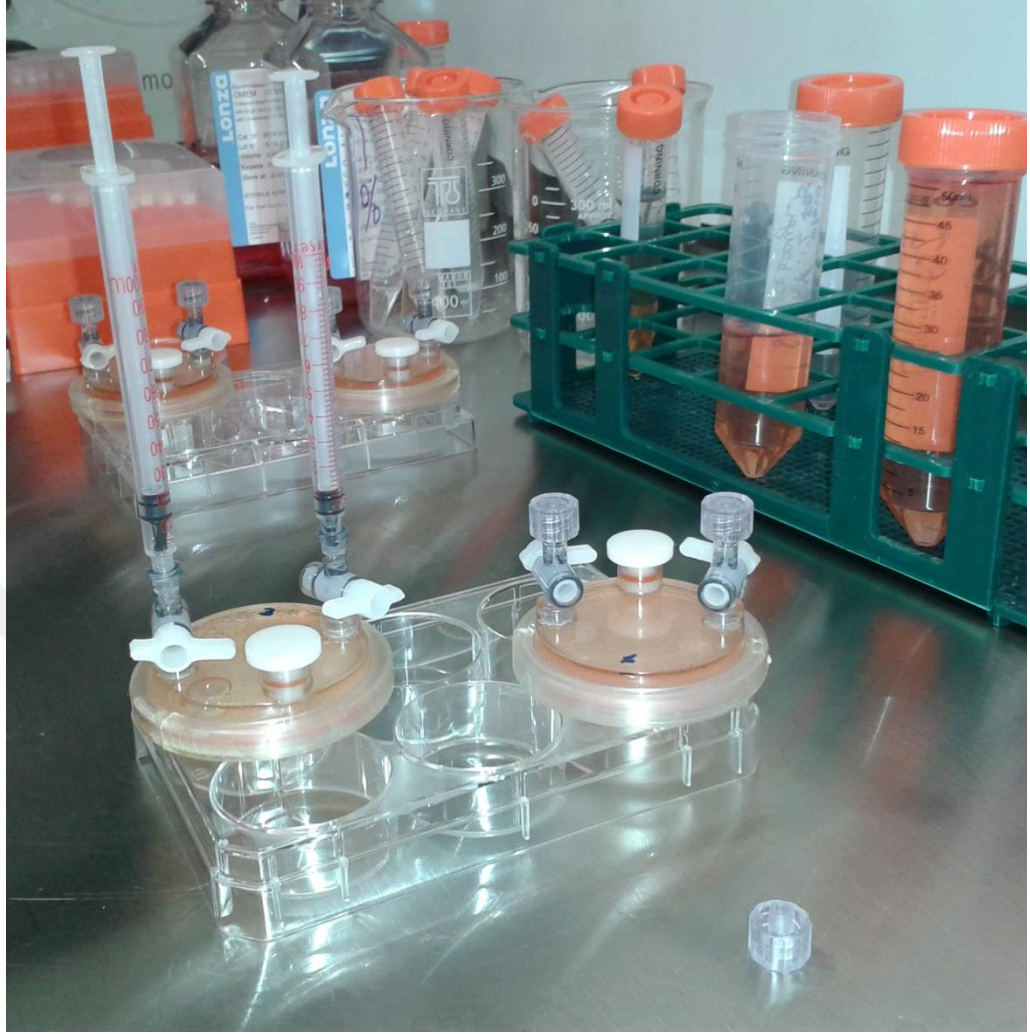
DDK biyoreaktöründe vasat değişimi işlemi başlangıcında cihaz üzerindeki anahtar “OFF” konumuna getirilerek durduruldu. Yerlerinden çıkartılan döner kaplar inkübatör içerisindeki kuyu üzerine yerleştirilerek, 40 dk. hücrelerin döner kap dibine çökmesi beklendi (Şekil 2.2). 40 dk sonra yukarıda verilen yöntem kullanılarak vasat değişimi tamamlandı. Döner kaplar yerlerine dikkatlice yerleştirildikten sonra cihaz anahtarı “ON” konumuna getirilerek dönüş tekrar başlatıldı.

Çalışmada 3. günün sonunda DDK-1, 6. günün sonunda DDK-2 ve 11. gün sonunda kalan iki döner kap (DDK-3 ve DDK-4) analiz için durduruldu (Çizelge 2.1). Döner kap içerisindeki hücreler PBS ile yıkanarak 50 ml’lik tüp içerisine alındı. 1500 rpm’de 11 dk santrifüj edildi. PBS ile tekrar yıkandıktan sonra bir kez daha aynı ayarda santrifüj edildi. Santrifüjün ardından pellet alındı ve 100 µL RNA Later çözeltisi konularak kriyotüp içerisinde +4 °C’de 18 saat bekletildi. Sonrasında -86 °C’deki dondurucuya alındı.

Çizelge 2.1. Biyoreaktör Deney Planı Çizelgesi

	Normal Büyüme Vasatı			Adipojenik Yönlendirme Vasatı			İleri Farklılaştırma Vasatı				
Reaktör \ Gün	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
DDK-1	✓	✓	✓	□	□	□	□	□	□	□	□
DDK-2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	□	□	□	□	□
DDK-3*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
DDK-4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

* DDK-3 adipojenik yönlendirme vasatında devam edildi.

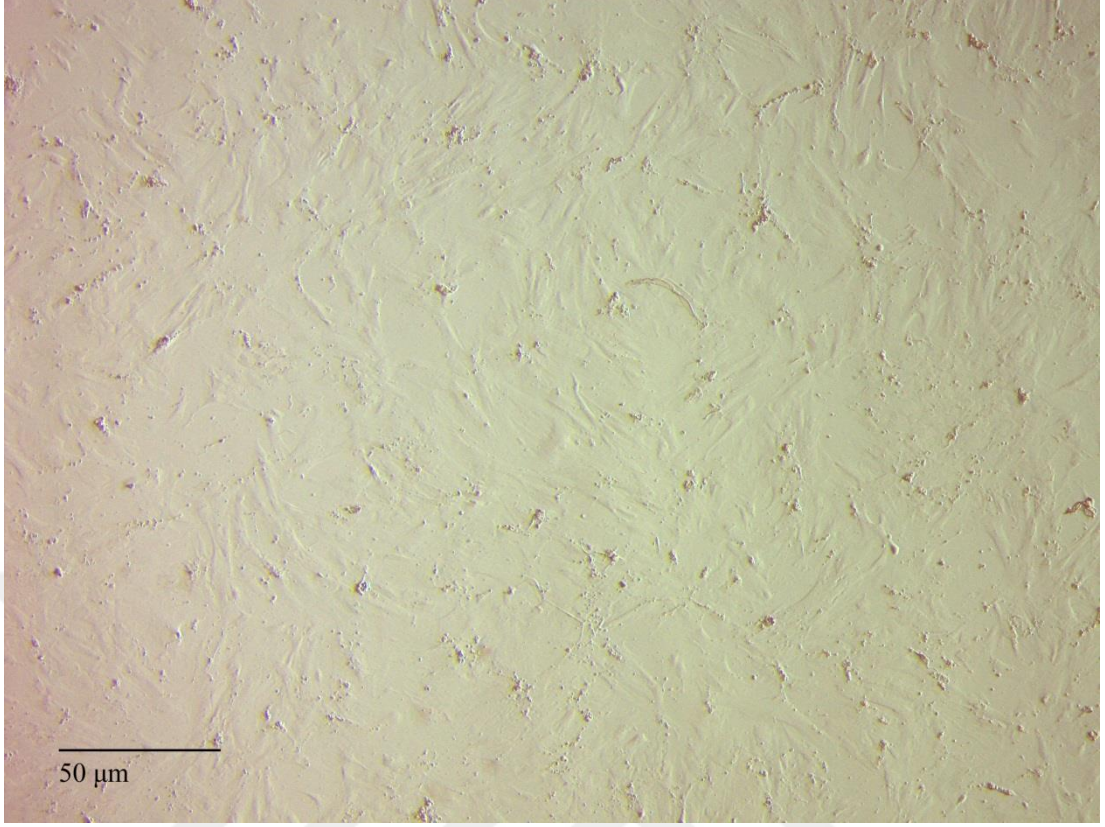


Şekil 2.2. Döner kaplarda vasat değişimi

2.5. Hücre Kültürü ve Farklılaştırması

Önceden kültürü yapılp 7. pasajda doygunluk seviyesine ulaşan AMKH'ler ile deneye başlandı (Şekil 2.3). Hücrelerin 3 gün boyunca %10 FBS (Lonza), %1 L-Glutamin (Lonza) ve % 1 penisilin/streptomisin (Lonza) içeren DMEM F:12 (Lonza) vasat ortamında kültürü sürdürüldü (Çizelge 2.2). Her gün vasat değişimi yapıldı.

Adipojenik farklılaşma deneylerinde hücrelerin 3 gün %10 FBS, %1 L-Glutamin, %1 penisilin/streptomisin, 1 μ M deksametazon (Sigma), 0,5 μ M 3-izobütil-1-metilksantin (Sigma), 0,1 U/ml insülin (Sigma) içeren DMEM (4,5 g/L glukoz) ile



Şekil 2.3. Biyoreaktöre Yükleme Öncesi Bolluğa Ulaşan (Konfluent) AMKH’lerin (Pasaj 7) İnvirt Mikrografı.

kültürü yapıldı. Her gün vasat değişimi yapıldı. 6. günün sonunda deney grubu ikiye ayrılarak birinci grup %10 FBS, %1 L-Glutamin, %1 penisilin/streptomisin, 1 µM dekzametazon, 0,5 µM 3-izobütil-1-metilksantin, 0,2 U/ml insülin içeren DMEM (4,5 g/L glukoz) ile 5 gün daha kültür sürdürüldü (LA(-) vasat). İkinci grup ise birinci grubun vasatına 0,5 mM linoleik asit (Sigma) ilave edilerek 5 gün daha kültür gerçekleştirildi (LA(+)) vasat). Tüm hücre kültürlerinde günlük vasat değişimleri yapıldı.

Histokimyasal incelemeler için 8 adet dört kuyucuklu lam üzerine, her kuyucuğa 50.000 hücre tohumlandı. 5 gün sonra hücreler her kuyucukta konfluent hale ulaştı ve deneye başlandı. İlk 3 gün tüm gruplarda normal vasat kullanıldı. 3. günün sonunda 2 lam inceleme için soğuk metanol ile muamele edilerek + 4 °C’deki soğutucuda saklandı. Kalan altı lama adipojenik vasat konuldu ve 3 gün sonra iki lam daha incelenmek üzere soğuk metanol ile muamele edildi. Deneyin son

aşamasında iki lam adipojenik vasatla devam ederken diğer iki lama ileri farklılaşma vasatı konuldu ve 5 gün sonra bu lamlar da soğuk metanol ile muamele edilerek +4 °C’deki buzdolabında saklandı.

Çizelge 2.2. Normal Yerçekimi Deney Planı Çizelgesi

	Normal Büyüme Vasatı			Adipojenik Yönlendirme Vasatı			İleri Farklılaşma Vasatı				
T75\Gün	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	✓	✓	✓	□	□	□	□	□	□	□	□
2	✓	✓	✓	□	□	□	□	□	□	□	□
3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	□	□	□	□	□
4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	□	□	□	□	□
5*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
8	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

* 5 ve 6 adipojenik yönlendirme vasatında devam edildi.

2.6. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Dört kuyucuklu lamlar üzerinde geliştirilen hücreler adipojenik farklılaşmayı incelemek üzere adipsin, adiponektin, leptin ve PPAR γ 2 belirteçleri ile muamele edildi.

Adipojenik belirteçler ile boyama öncesinde dört kuyucuklu lamların her biri saf metanolde 5 dakika bekletildi. Su ile yıkandıktan sonra spesifik olmayan boyanmaların azaltılması için 10 dakika “hidrojen peroksit blok” ile muamele edildi. Su ile yıkandı ve spesifik olmayan antikor bağlanmalarını baskılamak için “ultra V Blok” ile 5 dakika inkübe edildi. %1 oranında FBS içeren PBS 1:100 oranında seyreltilmiş çözelti ile hazırlanmış primer antikorlarla (Adipsin, Adiponektin, Leptin ve PPAR γ 2) ayrı ayrı boyama işlemlerinin ardından +4°C’de 24 saat boyunca bekletildi. Sonrasında su ile yıkama yapıldı. “biyotinli keçi anti-fare/rat sekonder

antikoru” ile 10 dk muamele edildikten sonra su ile yıkama yapıldı. Bu işlemin ardından “streptavidin peroksidaz” ile 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve tekrar su ile yıkama yapıldı. 5-20 dk süresince AEC Kromojen – AEC Substrat karışımı ile karanlıkta muamele edildi ve distile su ile yıkanarak görüntülemeye hazır hale getirildi.

2.7. Eş-Zamanlı PCR İncelemeleri

2.7.1. RNA İzolasyonu

1. RNA Later ile -80°C’de saklanan hücreler oda sıcaklığında çözüldü.
2. RNA izolasyonu için hücreler 200 µL PBS ile pipetlenerek yeniden süspansiyon haline getirildi.
3. 400 µL Lizis /Bağlanma tamponu eklendi ve 15 saniye vortekslendi.
4. Bir toplama tüpünün içine *High Pure* Filtreli Tüp yerleştirildi. Örnekler üst hazneden filtreli tüpe eklendi.
5. 8,000 × *g* de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında filtreli tüp toplama tüpünden ayrılıp toplama tüpündeki sıvı atıldı ve filtreli tüp tekrar takıldı.
6. Her tüpe 90 µL DNaz inkübasyon tamponu ve 10 µL DNaz I eklendi. 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
7. Inkübasyonun ardından filtreli tüpe 500 µL Yıkama tamponu-I eklenerek 8000 × *g*’de 15 sn santrifüj edildi.

8. Santrifüjün ardından toplama tüpündeki sıvı atıldı ve filtre tekrar tüpe takıldı. Filtreli tüpe 200 µL Yıkama tamponu II eklenerek $13.000 \times g$ de 2 dakika santrifüj edildi.

9. Toplama tüpleri santrifüjün ardından atıldı ve filtreli tüpler yeni steril eppendorf tüplerine yerleştirildi. Filtreli tüpe 100 µL Elüsyon tamponu eklendi ve $8.000 \times g$ de 1 dk santrifüj edildi. Bu aşamadan sonra RNA'lar mikrosantrifüj tüpleri içerisinde.

10. RNA miktarları nanodrop cihazı ile ölçüldü ve -80°C 'deki dondurucuya aktarıldı.

2.7.2. cDNA Sentezi

İzole edilip -80°C de saklanan RNA'lar çözöldü ve kısa süreyle santrifüj edildi. Reaksiyon başlatılana dek tüm örnekler buz içerisinde tutuldu. Buz üzerine steril, nükleaz-içermeyen, ince duvarlı bir PZR tüpü konuldu ve 20 µL lik reaksiyon için aşağıdaki bileşenler eklendi:

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
Total RNA		1 ng - 4 µL
Anchored-oligo(dT) ₁₈	1 µL	2,5 µM
Primer, 50 pmol/µL		
Random Hexamer Primer, 600 pmol/µL	2 µL	60 µM
Su, PZR saflığında		Toplam hacmi 11,4 µL yapmak için
Toplam Hacim	11,4 µL	

Örnek primer karışımı 65°C de 10 dk tutularak denatüre edildi. Bu adım RNA ikincil yapılarını denatüre etmeyi garantiye almak için yapılır. Tüp derhal buz üzerinde soğutuldu. Daha sonra tüpe aşağıdaki bileşenler eklendi:

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	4 µL	1 × (8 mM MgCl ₂)
Reaction Buffer, 5x Protector RNase Inhibitor, 40 U/µL	0,5 µL	20 U
Deoxynucleotide Mix, her biri için 10 mM	2 µL	Her biri 1 mM
DDT	1 µL	5 mM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1,1 µL	22 U
Toplam Hacim	20 µL	

Reaktifler tüp içerisinde dikkatli şekilde karıştırıldı. Tüp, buharlaşmayı önlemek amacıyla ısıtılmış Termal devir cihazına yerleştirildi. +55°C de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Örnek +85°C de 5 dk tutularak *Transcriptor High Fidelity Reverse Transkriptaz*'ın inaktivasyonu sağlandı. Reaksiyonun durması için tüp buz üzerine konuldu. Bu aşamada reaksiyon tüpü +2°C - +8°C de 1-2 saat veya -15° ile -25°C arasında uzun süre saklanabilir. Bu işlemler sonucunda cDNA, amplifikasyon için kullanılabilir hale gelmiş durumdadır. PCR için 1 – 5 µL reaksiyon ürünü, 20 veya 50 µL son konsantrasyona ayarlanarak kullanılabilir.

2.7.3. cDNA'ların PCR İçin Hazırlanması

1. cDNA halinde -80°C de saklanan hücreler çözüldü.
2. Hücrelerin dibe çökmesi için kısa bir santrifüj işlemi yapıldı.
3. Buz üzerindeki bir 1,5 ml reaksiyon tüpü içerisine aşağıdaki bileşenler eklendi;

Su	3 µl
Primer-Prob Karışımı, 10x kons.	2 µl
Light Cycler® 480 Probes Master, 2x kons.	10 µl
Toplam Hacim	15 µl

Bu aşamada adipogenez için PPAR γ 2, adipsin, adiponektin ve leptin problemleri, referans için ise β -aktin ve 18S rRNA problemleri kullanıldı.

4. Pipetleme yaparak dikkatlice karıştırıldı. Bu aşamada vorteks yapılmamalıdır.
5. PCR-Plakası üzerindeki her kuyucuğa 15 µl yukarıdaki karışım eklendi.
6. Kuyucuklara 5 µl DNA eklendi.
7. Plaka kapağı, plakanın üzerine dikkatli bir şekilde kapatıldı.
8. Plaka PCR içerisine yerleştirildi ve işlem başlatıldı.

2.7.4. İstatistiksel Analiz

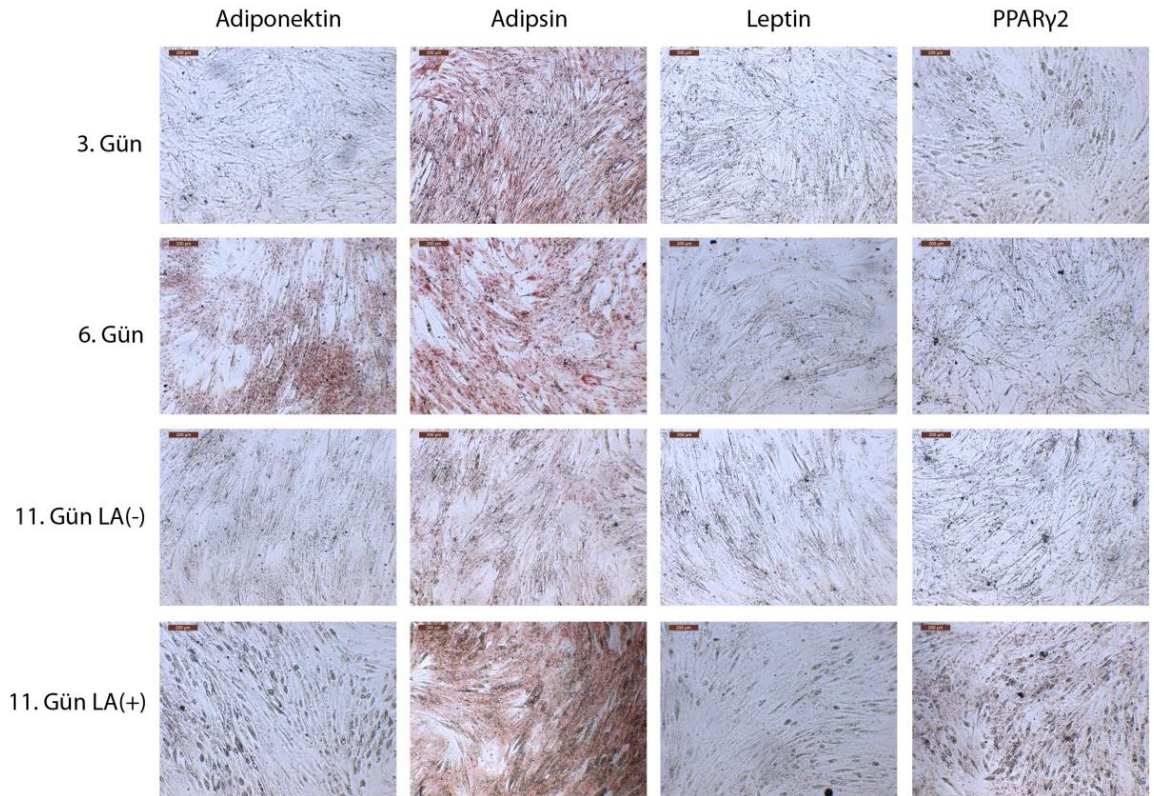
Tüm deneysel çalışmalar üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verildi. Örneklerin anlamlılık düzeylerinin belirlenebilmesi amacıyla “Oneway Anova” testi kullanıldı. Minimum güven düzeyleri %95 ($p<0,05$) olarak belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. Adipojenik Farklılaşmanın *In Vitro* Görüntüsü

İndüksiyonun başlatıldığı 3. günden sonra hücrelerin farklılaşması immünohistokimyasal boyamalar sonrasında ışık mikroskobu ile incelenmiştir. 6. günden itibaren farklılaşma belirginleşmiş, hücrelerin adiponektin, adipsin, leptin ve PPAR γ 2 belirteçleri ile boyandığı görülmüştür.

İndüksiyondan sonra 11 gün boyunca PPAR γ 2 ifadesinin sürekli arttığı gözlenmiştir. 11. gün sonunda LA(+) vasatta geliştirilen hücrelerde LA(-)'ye göre daha yüksek miktarda PPAR γ 2 boyanması olduğu gözlenmiştir. Buna zıt olarak, adipsin ve leptin ve adiponektin LA(-) vasatta daha iyi boyanma göstermiştir. Linoleik asit PPAR γ 2 ifadesini artırırken adipsin, leptin ve adiponektinin ifadelerini azaltmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. IHC Boyama Işık Mikroskobu Görüntüleri

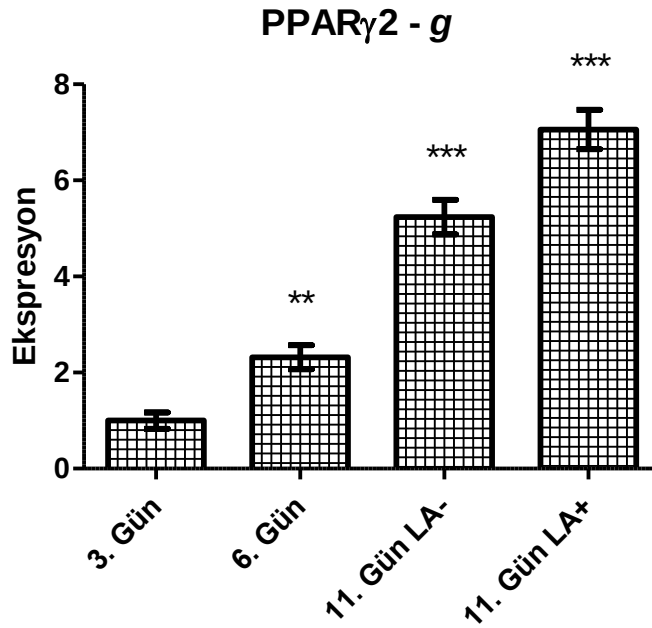
3.2. RNA Konsantrasyonları

Deneyler sonucunda total RNA konsantrasyonları nanodrop ile ölçülmüştür.

	G	μ G
3. Gün	42,8 ng/ μ L	30,9 ng/ μ L
6. Gün	33,9 ng/ μ L	253,7 ng/ μ L
11. Gün	363,2 ng/ μ L	67,3 ng/ μ L
11. Gün + LA	186,5 ng/ μ L	47,4 ng/ μ L

3.3. Eş-Zamanlı PCR Sonuçları

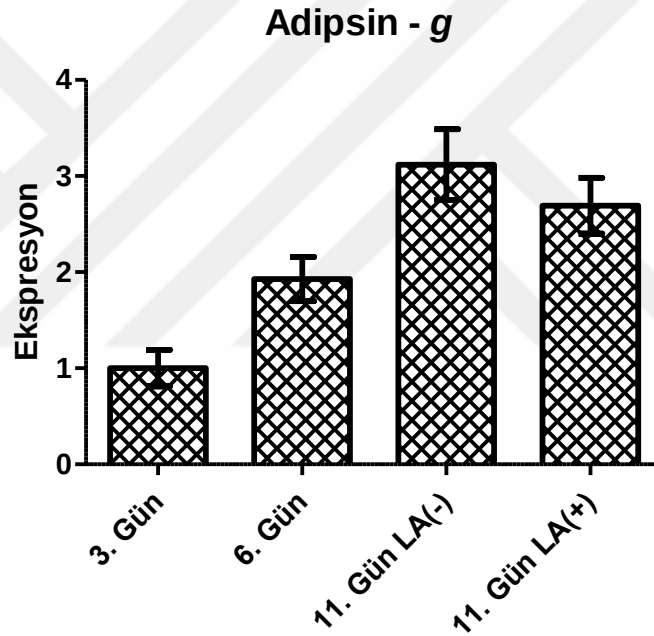
Normal yerçekiminde PPAR γ 2 ifadesi, indüksiyonun başlatıldığı 3. günden sonra sürekli artış göstermiştir. 6. günde PPAR γ 2 ifadesi 1,32 kat yükselmiştir. İleri farklılaşma vasatına geçilen 6. günün ardından PPAR γ 2 ifadesi yükselmeye devam etmiştir. LA(-) ileri farklılaşma vasatında geliştirilen hücrelerde 11. gün sonunda PPAR γ 2 ifadesi 3. güne göre 4,24 kat artarken, LA(+) ileri farklılaşma vasatında 11. gün sonunda 6,06 kat artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Normal Yerçekiminde PPAR γ 2 Ekspresyonu. Referans gen olarak β -aktin kullanılmıştır. ($p < 0,05$)

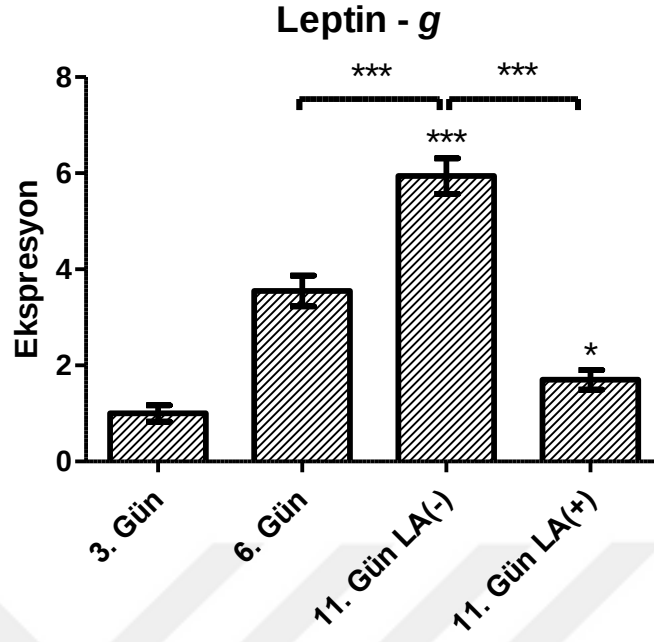
IHC boyama bulgularına paralel şekilde linoleik asitin PPAR γ 2 ekspresyonunu yükselttiği gözlenmiştir. LA(+) vasatında geliştirilen hücrelerde 11. gün sonunda PPAR γ 2, LA(-) vasatında geliştirilen hücelere göre 1,34 kat fazla ifade edilmiştir.

İndüksiyonun başlatıldığı 3. günden itibaren adipsin ifadesi sürekli yükselmiştir. 6. günün sonunda adipsin ekspresyonu 3,55 kat yükselmiştir. LA(-) vasatta 11. gün sonunda adipsin ekspresyonu, IHC boyama bulgularına paralel şekilde daha fazla artış göstermiştir. LA(-) vasatta adipsin ekspresyonu 6. güne göre 1,67 kat yükselirken, LA(+) vasatta 1,39 kat yükselmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Normal Yerçekiminde Adipsin Ekspresyonu. Referans gen olarak β -aktin kullanılmıştır. ($p < 0,05$).

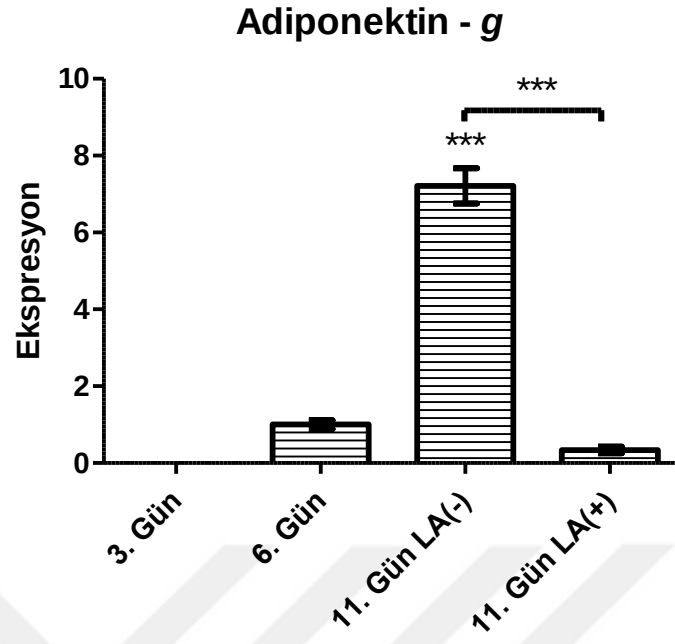
İndüksiyonun ardından leptin ekspresyonu sürekli artmıştır (Şekil 3.4). 6. günün sonunda leptin ekspresyonu 2,55 kat artmıştır. Linoleik asit leptin ekspresyonunu azaltmıştır. 11. günün sonunda sonra LA(-) vasatta leptin ekspresyonu 6. güne oranla 1,49 kat artarken, LA(+) vasatta 0,52 kat azalmıştır. 11 gün sonunda LA(-) vasatta leptin LA(+)'ya göre 3,49 kat daha fazla eksprese edilmiştir. IHC boyama bulgularında da gözlemlendiği gibi, linoleik asit leptin ekspresyonunu azaltmıştır.



Şekil 3.4. Normal Yerçekiminde Leptin Ekspresyonu. Referans gen olarak β -aktin kullanılmıştır. ($p < 0.05$)

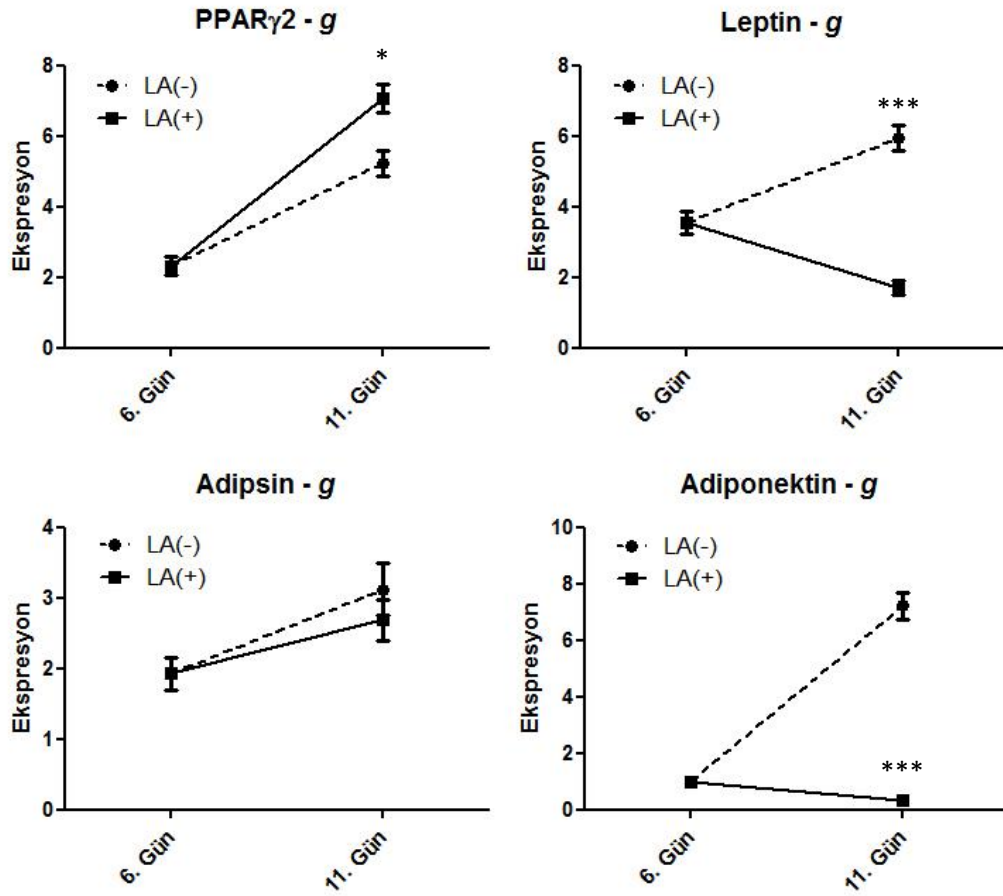
Yetişkin adipositlerde ifade edildiği bilinen adiponektinin, indüksiyonun henüz başlatılmadığı 3. günde hiç ifade olmadığı görülmüştür. Adiponektin ifadesi indüksiyondan sonra artmaya başlamıştır.

İleri farklılaşma vasatına geçilmesi ile beraber adiponektin ifadesi 11. gün sonunda, 6. güne göre 6,21 kat yükselmiştir. Bununla beraber LA(+) vasatında adiponektin ifadesi 6. güne göre 0,66 kat azalmıştır. LA(-) vasatında adiponektin, LA(+) vasatındakine göre 21 kat daha fazla ifade edilmiştir (Şekil 3.5).



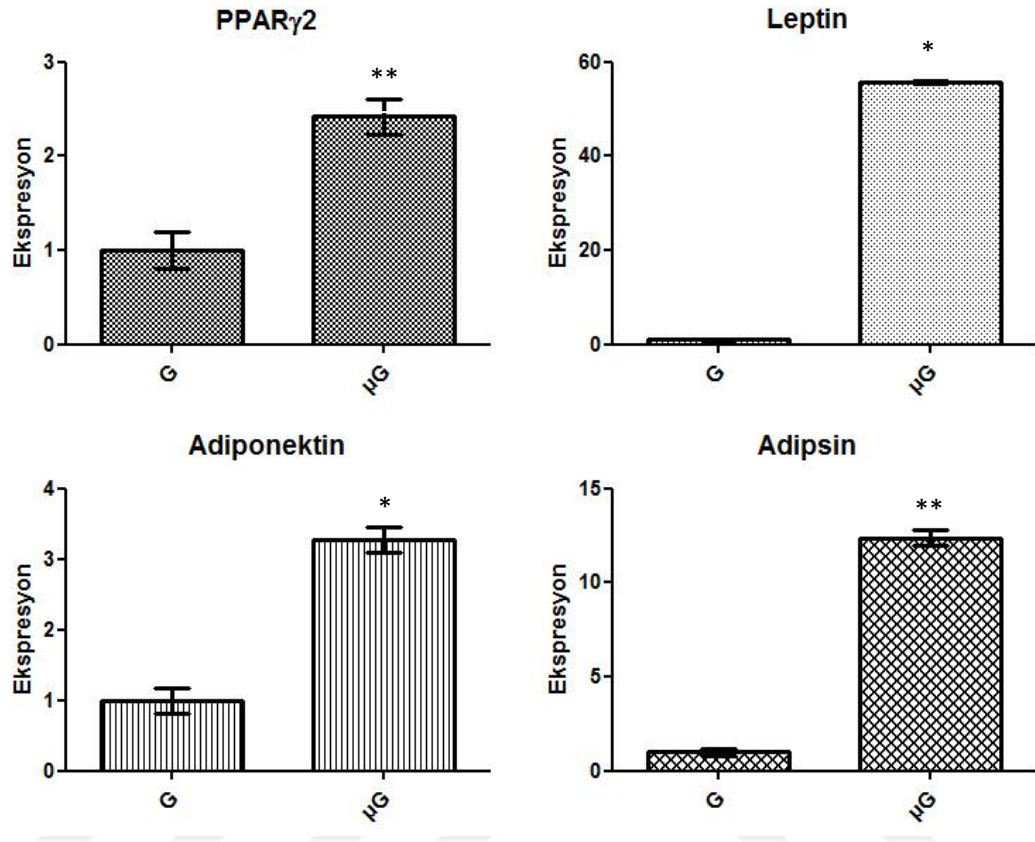
Şekil 3.5. Normal Yerçekiminde Adiponektin Ekspresyonu. Referans gen olarak β -aktin kullanılmıştır. ($p < 0,05$)

Linoleik asit IHC boyamalarında da görüldüğü gibi $PPAR\gamma 2$ ifadesini arttırırken, leptin, adipsin ve adiponektin ifadesini azaltmıştır. Elde edilen verilere göre 11. gün sonunda $PPAR\gamma 2$ ifadesinin LA(+) vasatında 1,34 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Buna zıt olarak leptin ifadesi 3,49 kat, adipsin ifadesi 1,15 kat ve adiponektin ifadesi 21 kat azalmıştır (Şekil 3.6).



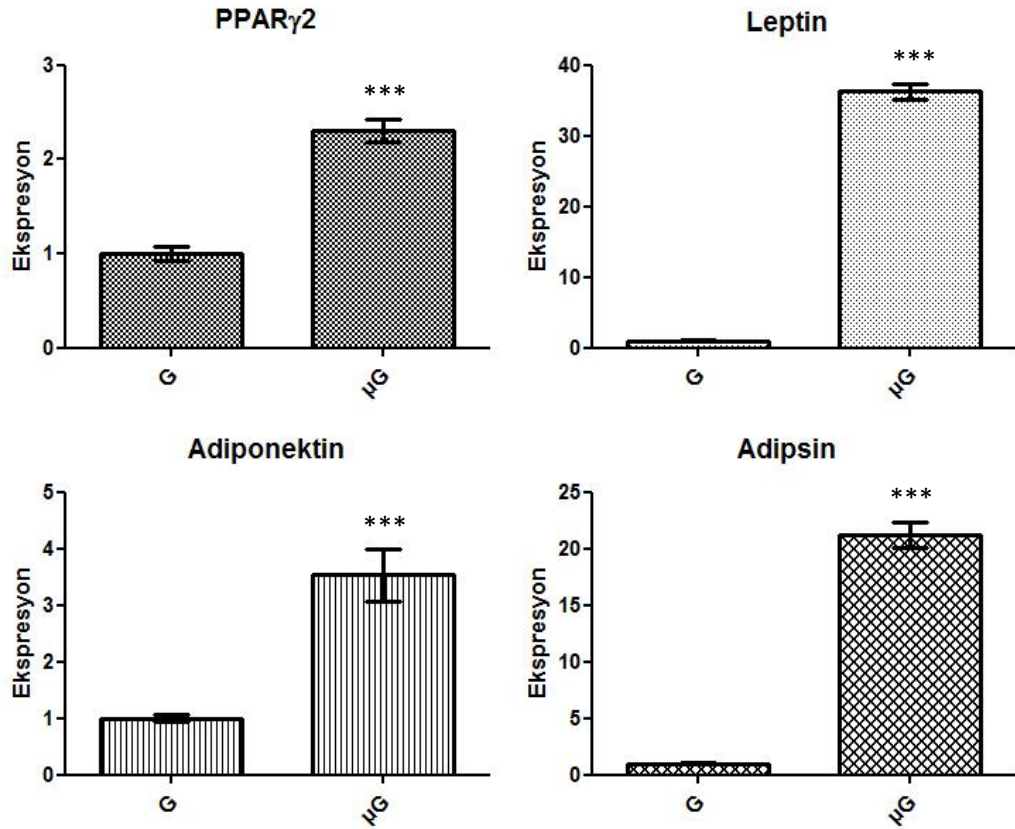
Şekil 3.6. Linoleik Asit Normal Yerçekiminde Yapılan Deneyde PPAR γ 2 Ekspresyonunu Yükseltirken, Leptin, Adipsin ve Adiponektin Ekspresyonlarını Azaltmıştır. Referans gen olarak β -aktin kullanılmıştır. ($p < 0,05$).

Mikroyerçekimi koşullarında kültürü gerçekleştirilen hücrelerde adipojenik indüksiyonun başlatıldığı günden sonra tüm adipojenik belirteçlerin ifadenmesinde artış olmuştur. 6. günün sonunda mikroyerçekimi ve yerçekimi koşulları karşılaştırıldığında, tüm belirteçlerin mikroyerçekimde daha yüksek oranda ifade edildiği görülmüştür (Şekil 3.7). Mikroyerçekimi koşullarında PPAR γ 2 ifadesi 6. günün sonunda 1,42 kat, leptin ifadesi 54,71 kat, adipsin ifadesi 11,38 kat, adiponektin ifadesi 2,27 kat artmıştır.



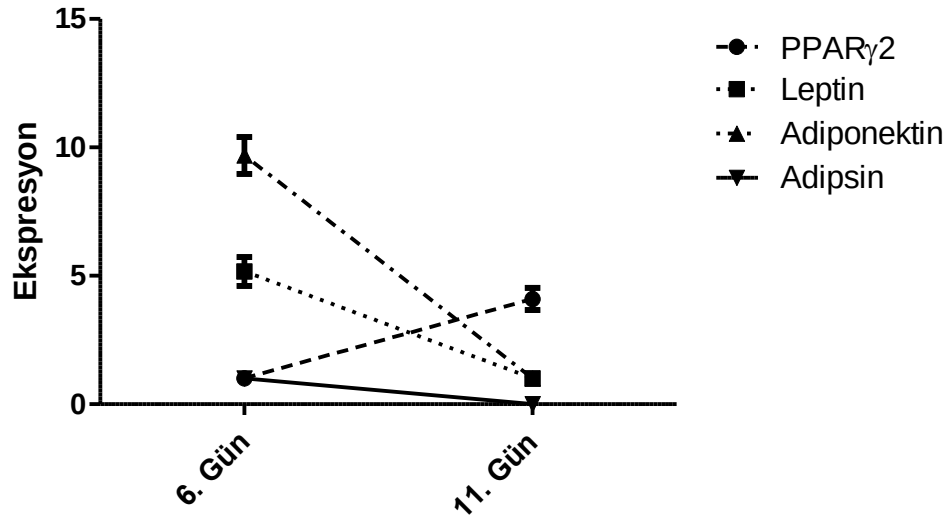
Şekil 3.7. 6. Gün Sonunda Yerçekimi Kültürüne Göre Mikroyerçekimindeki Ekspresyon Artışları. Referans gen olarak β -aktin kullanılmıştır. ($p < 0.05$)

Mikroyerçekimi koşullarında 6. günün ardından LA(-) ileri farklılaşma vasatında 5 gün daha kültürü sürdürülen hücrelerin PPAR γ , leptin, adiponektin ve adipsin ifadenmeleri 11. günün sonunda normal yerçekimi ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler, mikroyerçekimi koşullarında kültürü sürdürülen hücrelerde tüm bu adipojenik belirteç genlerin ifadenmelerinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Normal yerçekimine göre PPAR γ 2 ifadesi 1,30 kat, leptin ifadesi 35,25 kat, adiponektin ifadesi 2,53 kat ve adipsin ifadesi 20,25 kat artış göstermiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. LA(-) Vasatta 11. Gün Sonunda Yerçekimi Kültürüne Göre Mikroyerçekimindeki Ekspresyon Artışları. Referans gen olarak β -aktin kullanılmıştır. ($p < 0.05$)

Linoleik asitin mikroyerçekimi koşullarında adipojenik farklılaşmaya etkisi de incelenmiştir. LA(+) vasatın konulduğu DDK biyoreaktöründe 6. günden sonra PPAR γ 2 ekspresyonu 3,10 kat artmıştır. Buna zıt olarak diğer tüm belirteçlerin (leptin, adiponektin ve adipsin) ekspresyonları azalma göstermiştir. Leptin ekspresyonu 4,17 kat, adiponektin ekspresyonu 8,69 kat azalırken, 11. gün sonunda adipsin ekspresyonu tamamen durmuştur (Şekil 3.9).

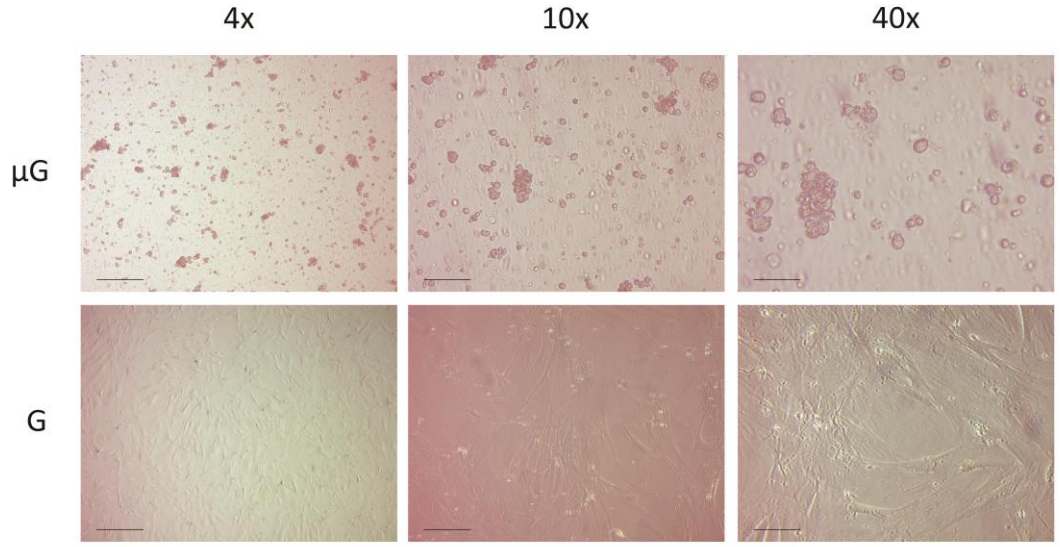


Şekil 3.9. Linoleik Asitin Mikroyerçekimi Kültüründeki Etkisi. Referans gen olarak β -aktin kullanılmıştır. ($p < 0.05$)

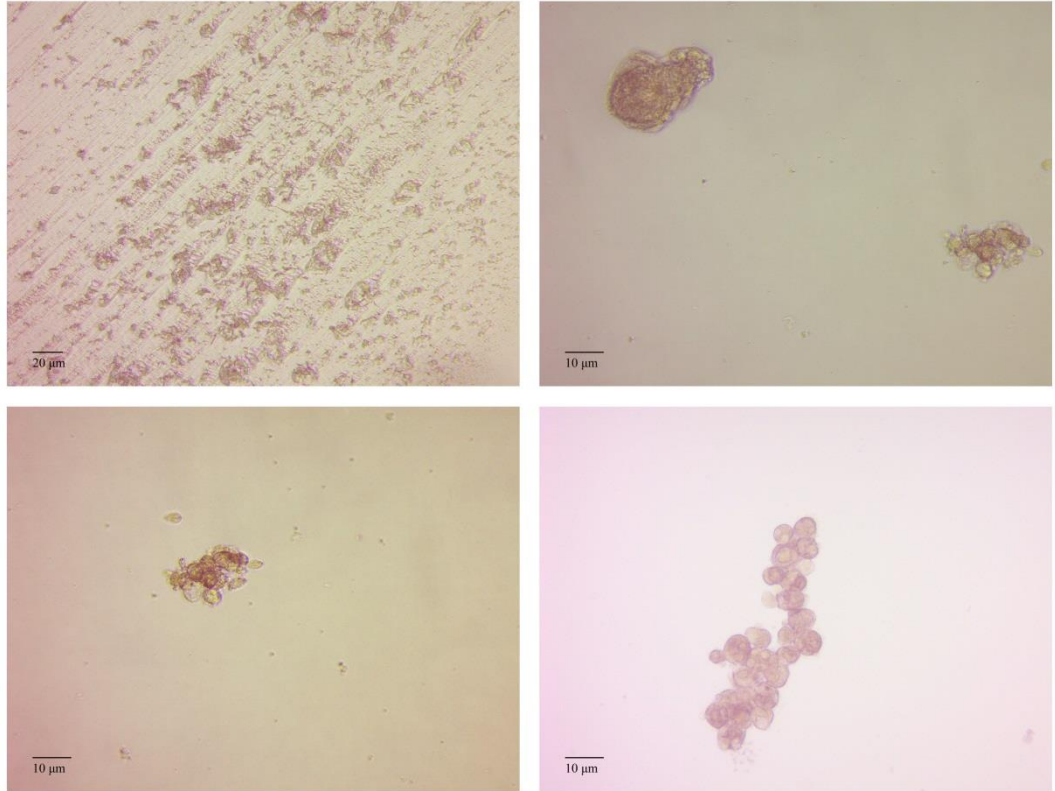
3.4. Üç Boyutlu Kümelenme

Mikroyerçekimi ve normal yerçekimi koşullarında kültürü yapılan hücreler invert mikroskop ile görüntülenmiştir. 3. günün sonunda elde edilen görüntülerde, standart kültür kaplarında ve yerçekimi koşullarında kültürü sürdürülen hücrelerde AMKH'lerin iç benzeri morfoloji gösterirken, DDK biyoreaktöründe kültüre yapılan hücrelerin yuvarlak şekil aldığı belirlenmiştir (Şekil 3.10).

Elde edilen görüntülere göre, normal yerçekiminde standart kültür kaplarında kültürü yapılan hücrelerin 3. günün sonunda tek tabakalı şekilde çoğalırken, mikroyerçekiminde hücrelerin birbirlerine tutunarak üç boyutlu kümeler oluşturmaya başladığı görülmüştür. 11. gün sonunda çekilen fotoğraflarda ise hücre kümelerinin daha büyük boyutlara ulaştığı kaydedilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.10. Mikroyerçekimde (μ G) ve yerçekiminde (G) 3. Gün Sonunda Hücrelerin İnvrt Mikroskobu Görüntüleri (4x, 10x ve 40x Büyütme)



Şekil 3.11. Mikroyerçekimde 11. Gün Sonunda Hücre Kümelerinin İnvrt Mikroskobu Görüntüleri

4. TARTIŞMA

Preadipositlerin olgun adipositlere farklılaşmaları boyunca PPAR γ 2 ifadenin yükseldiği birçok çalışmada gösterilmiştir (Elbrecht ve ark., 1996; Fajas ve ark., 1997; Lin ve ark., 2008; Wagner ve ark., 2010; Wang ve ark., 2012). Çalışmamızda da buna paralel olarak indüksiyonun ardından PPAR γ 2 ifadesi sürekli bir şekilde yükselmiştir. 1x insülin içeren farklılaşma vasatında 3 gün tutulan hücrelerde PPAR γ 2 ifadesi indüksiyonun başlatıldığı güne göre 1,32 kat yükselirken, 2x insülin kullanılan ileri farklılaşma vasatında 11 gün sonundaki PPAR γ 2 ekspresyonu daha fazla yükselmiştir.

Linoleik asitin izomerleri ile yapılan bazı araştırmalarda konjüge linoleik asitlerin PPAR γ 2 ekspresyonunu baskıladığı ifade edilmiştir (Brown ve ark., 2004; Brown, Boysen, ve ark., 2003; Granlund ve ark., 2003; Kang ve ark., 2003; Kennedy ve ark., 2008). Yaptığımız çalışmada konjüge formlarına zıt olarak linoleik asitin PPAR γ 2 ekspresyonunu yükselttiği, linoleik asit içeren vasatta geliştirilen hücrelerin 1,34 kat daha fazla PPAR γ 2 ifade ettikleri belirlenmiştir (Şekil 3.2).

Adiposit farklılaşması sırasında adipsin ekspresyonunun arttığı ve bir adipojenik transkripsiyon faktörü olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir (Ahmed ve ark., 2016; Boucher ve ark., 2015; Lee ve ark., 2015; Wilkinson ve ark., 1990; Zayzafoon ve ark., 2004). Çalışmamızın sonucu da bu araştırmalara paralel olup, adipsin ifadesi indüksiyondan sonra sürekli yükselmiştir. İleri farklılaşma vasatı ile beraber adipsin ekspresyonu daha fazla artmıştır.

Yangeth ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya paralel bir sonuç olarak, bizim çalışmamızda da linoleik asidin adipsin ekspresyonunu azalttığı anlaşılmıştır (Yeganeh ve ark., 2016). 11. gün sonunda linoleik asit içermeyen ileri farklılaşma vasatındaki artış 1,67 kat iken, linoleik asit içeren ileri farklılaşma vasatında bu oran 1,34'e düşmüştür (Şekil 3.3).

Adipoz dokudan salgılanan bir hormon olan leptin de önemli bir adipojenik belirteç olarak birçok çalışmada kullanılmıştır (Choi ve ark., 2016; Conde ve ark., 2011; Ronti ve ark., 2006; Sackmann-Sala ve ark., 2014; Trayhurn ve ark., 2008; Wang ve ark., 2005). Bizim çalışmamızda da indüksiyonla beraber leptin ifadesi belirgin bir şekilde artış göstermiştir. Farklılaştırma vasatında 3 gün tutulan hücrelerde leptin ekspresyonu 2,55 kat artmış, ileri farklılaştırma vasatında ise bu artış 4,94 kata ulaşmıştır.

Yapılan bazı çalışmalarda konjüge linoleik asitlerin leptin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Brown ve McIntosh, 2003; Kang ve ark., 2003; Perez-Matute ve ark., 2007; Rahman ve ark., 2001). Çalışmamızda da buna paralel olarak linoleik asidin leptin ekspresyonunu baskıladığı görülmüştür. 6. günde linoleik asitsiz ileri farklılaşma vasatına alınan hücrelerde leptin ekspresyonu artarken, linoleik asit eklenen ileri farklılaştırma vasatında leptin ekspresyonu 6. gündeki leptin miktarının da altına düşmüştür.

Adiponektin, olgun adipositlerde sentezlendiği bilinen bir polipeptittir (Jones ve ark., 2005; Wang ve ark., 2013; Wei, Li, ve ark., 2013). Çalışmamızda bu veri ile paralel olarak, 3. gün henüz indüksiyon başlatılmadan yapılan IHC boyaması ve RT-PCR analizi sonucunda adiponektin ifadesinin olmadığı görülmüştür. İndüksiyon 3. gün başlatılmış ve 6. günün sonunda yapılan analizde adiponektin ekspresyonunun başladığı görülmüştür. 6. günden sonra insülinin iki katına çıkarıldığı ileri farklılaşma vasatına geçilmiş ve bu vasat adiponektin ekspresyonunu 6,21 kat yükseltmiştir.

Perez-Matute ve ark. linoleik asitin adiponektin ekspresyonunu azalttığını ifade etmiştir (Perez-Matute ve ark., 2007). Buna zıt olarak bazı çalışmalarda da konjüge linoleik asitin plazma adiponektin seviyesini yükselttiği gösterilmiştir (DeClercq ve ark., 2012; Nagao ve ark., 2003). Bizim çalışmamızda da Perez-Matute ve arkadaşlarının çalışmasına paralel olarak linoleik asitin esas formu, adiponektin ekspresyonunu azaltmıştır. Linoleik asitin eklenmediği vasatta yüksek oranda adiponektin ekspresyonu görülürken, linoleik asitin eklendiği vasatta tam tersine adiponektin ekspresyonunda azalma olduğu görülmüştür (Şekil 3.5).

Araştırmacılar tarafından daha önce yapılmış çalışmalarda, cis-9,trans-11 ve trans-10,cis-12 konjüge linoleik asitlerin adipogenez üzerinde negatif etkileri gösterilmiş fakat linoleik asitin esas formu olan cis-9,cis-12 linoleik asitin etkileri üzerinde fazla durulmamıştır (Brown ve McIntosh, 2003; Kim ve ark., 2013; McNeel ve ark., 2003; Platt ve ark., 2009). Yapılan bazı araştırmalar bu iki konjüge linoleik asitin bir preadiposit belirteci olan PPAR γ 2 ekspresyonunu azalttığını göstermiştir (Kennedy ve ark., 2008; McNeel ve ark., 2003; Platt ve ark., 2009). Bizim çalışmamızın sonucunda bu verilere zıt olarak, cis-9,cis-12 linoleik asitin PPAR γ 2 ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. Ancak daha olgun adipositlerde sentezlenen leptin, adipsin ve adiponektin ekspresyonunu azaltmıştır (Şekil 3.6). Elde ettiğimiz bu verilerin ışığında cis-9,cis-12 linoleik asitin olgun adiposit oluşumunu baskıladığı ifade edilebilir.

Zayzafoon ve ark. osteojenik uyarıcıların bulunduğu vasatlarda yaptıkları çalışmalarda mikroyerçekimi koşullarının kemik oluşumunu azaltırken, adipogenez arttırdığını ifade etmişlerdir (Zayzafoon ve ark., 2004). Buna paralel olarak LeBlanc ve ark., uzay ortamında 4-14,4 ay boyunca kalan astronotlarda yağ kütlesinin arttığını belirtmişlerdir (LeBlanc, Schneider, ve ark., 2000). Bizim bulgularımız, mikroyerçekimi koşullarının adipogenez arttırdığını göstermekte olup, bu araştırma sonuçlarını desteklemektedir. Mikroyerçekimi koşullarında, adipojenik uyarıcıların bulunduğu vasat kullanılmış ve indüksiyon sonrasında tüm adipojenik belirteçlerin normal yerçekimine göre mikroyerçekimi koşullarında daha fazla ifade edildiği gösterilmiştir (Şekil 3.8).

Daha önceki bazı çalışmalarda araştırmacılar mikroyerçekimi koşullarının osteojenik farklılaşma vasatında PPAR γ 2, leptin ve adipsin ekspresyonunu yükselttiğini göstermişlerdir (Zayzafoon ve ark., 2004; Zheng ve ark., 2007). Bizim çalışmamızda bu çalışmalardan farklı olarak adipojenik uyarıcı vasat kullanılmış ve PPAR γ 2, leptin ve adipsin ifadenmesinin mikroyerçekimi koşullarında normal yerçekimine göre daha fazla olduğu bulunmuştur (Şekil 3.8).

Daha önce Wang ve ark., klinostat içerisinde adipojenik uyarıcıların sıçan mezenkimal kök hücrelerinde PPAR γ 2 ifadenmesini yükselttiğini göstermişlerdir (Wang ve ark., 2014). Çalışmamızda mikroyerçekimi koşullarını oluşturan DDK

biyoreaktöründe adipojenik indüksiyonun AMKH'lerde PPAR γ 2, leptin, adipsin ve adiponektin ifadenmesini artırdığı ilk kez gösterilmiştir.

Normal yerçekimi şartlarında MKH'lerin kültür kaplarının tabanına tutunarak iğ benzeri şekil aldıkları Friedenstein tarafından 1970'li yıllarda gösterilmiştir (Friedenstein ve ark., 1974; Friedenstein ve ark., 1976). Mikroyerçekimi koşullarının MKH'lerin iğ benzeri bu yapısını 72 saat sonunda küresel kümelenmeler şeklindeki yapılanmaya dönüştürdüğü araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Chen ve ark., 2011; Wang ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2013). Bizim çalışmamızda da AMKH'lerin 72 saat sonunda küresel kümelenmeler geliştiği inversiyon mikroskobu ile gösterilmiştir (Şekil 3.10). Bununla beraber, AMKH'lerin standart kültür kaplarında iki boyutlu yüzeyde çoğalmalarından farklı olarak, DDK biyoreaktöründe 72 saat sonunda birbirlerine tutundukları ve kümelendikleri görülmüştür.

Mikroyerçekimi koşullarında cis-9,cis-12 linoleik asitin adipojenik farklılaşmaya etkisi de bu çalışmada incelenmiştir. Linoleik asit hem normal yerçekiminde hem de mikroyerçekimi koşullarında PPAR γ 2 ifadenmesini yükseltmiştir. Yine normal yerçekimi ile paralel bir sonuç olarak leptin ve adiponektin ekspresyonları azalma göstermiştir (Şekil 3.9). Mikroyerçekimi koşullarında LA(+) vasat içerisinde kültürü gerçekleştirilen hücrelerde 11. günün sonunda adipsin ifadenmesi tamamen baskılanmıştır. Elde edilen bu veriler sonucunda cis-9,cis-12 linoleik asitin mikroyerçekimi koşullarında da olgun adiposit oluşumunu baskıladığını göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yerçekiminin değişmesi yağ dokusunun oluşumunu etkilemektedir. Yaptığımız çalışmanın sonucunda mikroyerçekimi koşullarının yağ dokusu gelişimini arttırdığı gösterilmiştir. Yağ dokusunun artması vücutta birçok dengenin ve metabolik aktivitelerin değişmesine neden olabilir. Tokluk duygusunu arttırdığı ve iştahı düzenlediği bilinen leptin hormonunun mikroyerçekimi koşullarında yükselmesi, astronotların kendilerini yanılarak tok hissetmelerine neden olabilir. Bu yanılığın astronotlarda daha az besin alımına ve beraberinde mineral kaybına neden olabilir. Bununla beraber insan vücudundaki yağ stoklarını düzenleyen leptin hormonu fazla salgılandığında bu depolanmalarda değişikliklere ve beraberinde yağ dengesinde bozulmalarına neden olabilir.

Yağ dokusu farklılaşmasında doğrudan etkisi olduğu bilinen PPAR γ 2 aynı zamanda yağ asidi depolanması ve glukoz metabolizmasında da görevlidir. PPAR γ 2 ifadenmesinin mikroyerçekimi koşullarında daha fazla yükselmesi, astronotların toplam yağ kütlelerinin uzayda artmasının temelinde yatan neden olabilir. PPAR γ 2 ifadesinin artması ile beraber adipsin, leptin ve adiponektin ifadelerinin de yükselmesi yağ kütlesinin artmasına neden olmaktadır.

Astronotlarda yağ kütlesinin artmasında adipsinin de rolü olduğu düşünülebilir. Yağ yıkımını, diğer bir adıyla lipolizizi azalttığı bilinen adipsin aynı zamanda trigliseritlerin esterleşmesini uyarır. Adipsin ifadenmesinin mikroyerçekimi koşullarında yükselmesi ile beraber yağ yıkımı azalmakta ve yağ asitlerinin esterleşme seviyesi artmaktadır. Bunun sonucunda da yağ kütlesinin arttığı söylenebilir.

Yerçekimsiz uzay koşullarında yağ kütlesinin arttığının bilinmesi, astronotlarda yağ kütlesini normale indirecek çeşitli ilaç veya tedavi yöntemlerinin gelişmesine olanak sağlayabilir. Bu amaca uygun tedavilerin geliştirilmesi, astronotların yağ dokusunun artmasının getirdiği problemlerin azaltılarak daha uzun süre ve daha sağlıklı şekilde araştırma yapabilmelerine olanak sağlayacaktır.

Yağ kütlesinin, yerçekiminin azalmasıyla beraber artması, artan yerçekimi ile beraber de tam tersi olarak azalacağını akla getirmektedir. Yağ kütlesinin artması obezite hastalığının en önemli belirtecidir ve dünyada obezite hastalarının sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Ülkeler obezite ile savaşmak üzere çok büyük miktarlarda bütçeler harcamaktadır. Yerçekiminin arttırılması, hiperyerçekimli odaların veya sistemlerin oluşturulması ile beraber hastalarda yağ kütlesinin azaltılmasına yönelik tedaviler geliştirilmesi de obezite ile savaş için faydalı bir yöntem olabilir.

Araştırmacılar tarafından son dönemlerde kullanılmaya başlanan mikroyerçekimi biyoreaktörleri, standart kültür sistemlerinin dışına çıkarak farklı bir yöntem ortaya koymuştur. Esas amacı mikroyerçekimini simüle etmek olarak tasarlanan bu biyoreaktörler, bu amacın dışında üç boyutlu hücre kültürlerinin oluşturulmasına olanak sağlamıştır. Standart kültür koşullarında ancak çeşitli biyoiskeleler kullanılarak yapılabilen hücre kümeleri, mikroyerçekimi biyoreaktörlerinde kendiliğinden gerçekleşmektedir. Hücreler bu biyoreaktörlerde birbirlerine tutunarak gerçek canlı vücudundakine benzer üç boyutlu yapılar oluşturmaktadır. Bununla beraber hareketli kültür sistemlerinin, hücrelerin vasat ile temas alanını artırarak daha iyi beslenmelerini sağladığı ifade edilebilir.

DDK biyoreaktörü, bu çalışmada kullanılan deney sistemi ilerleyen zamanlarda daha da geliştirilerek rejeneratif cerrahilerde vd. nakil işlemlerinde kullanılabilecek daha iyi ve bol hücreli adipoz dokusu üretiminde kullanılabilir. Bununla beraber mikroyerçekimi biyoreaktörlerinin etkisi, daha farklı hücrelerin kültürlerinde de kullanılarak görülüp geliştirilebilir. Şimdiden, mikroyerçekimi biyoreaktörlerinin gelecek yıllarda daha sık olarak kullanılacak bir kültür sistemi haline geleceği öngörülmektedir.

ÖZET

İnsan Adipoz-Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Mikroyerçekimi Ve Yerçekimi Şartlarında Adipojenik Farklılaşmasının Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi

Uzay araştırmaları teknolojilerinin gelişmesi ile beraber astronotların uzayda kalma süreleri artmıştır. Yörünge süresindeki artış ile beraber astronotlarda çeşitli sağlık problemleri görülmeye başlanmıştır. Uzun süre mikroyerçekimi koşullarında yaşayan astronotlarda kemik kütlelerinde kayıp görülürken, yağ kütlelerinde artış olduğu da gösterilmiştir. Bu bulgulara ek olarak, mikroyerçekimi biyoreaktörlerinde yapılan osteojenik kültür ortamında osteogenez azalırken, adipogenezin yükseldiği de belirlenmiştir.

Bu çalışmada adipoz-kökenli mezenkimal kök hücrelerin, NASA tarafından geliştirilen ve mikroyerçekimi koşullarını sağlayan döner duvarlı kap (DDK) biyoreaktöründe adipojenik farklılaştırma vasatı içerisinde kültürü yapılmıştır. Ek olarak bu çalışmada, cis-9,cis-12 linoleik asitin adipojenik indükleyici vasata eklendiği ve eklenmediği vasat şartlarının adipogenez üzerine olan etkileri incelenmiştir. Standart kültür koşullarında ve DDK biyoreaktöründe 11 gün süresince kültürü sürdürülen AMKH'lerde adipojenik belirteçler olan PPAR γ 2, leptin, adipsin ve adiponektinin ifade edilme düzeyleri, immünohistokimyasal analizler ve eş-zamanlı PCR yöntemleri ile incelenmiştir.

Yapılan incelemeler sonucunda PPAR γ 2, leptin, adipsin ve adiponektinin ifade edilme düzeylerinin mikroyerçekimi koşullarında arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, DDK biyoreaktöründeki 72 saatlik kültürün sonunda adipoz-kökenli mezenkimal kök hücrelerin küresel formda öbekler oluşturarak üç boyutlu mikrodokusal yapılara dönüştüğü gözlemlenmiştir. Adipojenik vasata cis-9,cis-12 linoleik asit ilavesinin PPAR γ 2 ifade düzeyinin azalmasına yol açtığı; diğer yandan leptin, adipsin ve adiponektin ifade düzeylerini anlamlı derecede arttırdığı da belirlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmada, mikroyerçekimi koşullarının adipogenezini teşvik ettiği, ilgili gen ifadelerindeki değişimlere dayalı olarak belirlenmiştir. Mikroyerçekimi koşullarının hücre kümelenmelerini ve üç boyutlu yapıların oluşumunu desteklediği görülmüştür. Bir diğer sonuç olarak, cis-9,cis-12 linoleik asit katkısının olgun adiposit farklılaşmasını baskıladığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Adipogenez, Adipoz, cis-9,cis-12 Linoleik Asit, Mezenkimal Kök Hücre, Mikroyerçekim, Uzayda Yaşam.

SUMMARY

Comparative Evaluation of the Adipogenic Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Under Microgravity and Gravity Conditions

The duration of astronauts in space has increased with the development of space exploration technologies. With increased orbit time, astronauts experience various health problems. Experiencing long durations of microgravity causes loss of bone mass and increase in fat mass in astronauts. Similarly, culture studies performed in osteogenic culture medium and simulated microgravity report decreased osteogenesis with increased adipogenesis.

In this study, we used Rotating Wall Vessel to simulate microgravity effect developed by NASA. We cultured adipose-derived mesenchymal stem cells with adipogenic medium in microgravity and normal conditions. We also investigated the effects of adipogenic medium with and without cis-9,cis-12 linoleic acid on adipogenesis. After 11 days of culture, we evaluated the expression of PPAR γ 2, leptin, adipsin and adiponectin by immunohistochemical stainings and by real-time PCR techniques.

IHC and real-time PCR studies showed increase in expression of PPAR γ 2, leptin, adipsin and adiponectin in simulated microgravity. Furthermore, adipose-derived mesenchymal stem cells cultured in the Rotating Wall Vessel displayed spherical shape and formed three-dimensional structures upon 72 hours of culture under microgravity conditions. In addition to these results, cis-9,cis-12 linoleic acid increased the expression of PPAR γ 2, and decreased the expression of leptin, adipsin and adiponectin.

As a result, the microgravity conditions increases adipogenesis. Microgravity conditions alter cell shape and forms three-dimensional spherical cell clusters. Further, cis-9,cis-12 linoleic acid was found to suppress the mature adipocyte differentiation.

Keywords: Adipogenesis, Adipose, cis-9,cis-12 Linoleic Acid, Life in Space, Mesenchymal Stem Cell, Microgravity.

KAYNAKLAR

- AHMED, S., VE E. ATLAS. (2016). 'Bisphenol S- and bisphenol A-induced adipogenesis of murine preadipocytes occurs through direct peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation', *Int J Obes (Lond)*.
- ARFAT, Y., W. Z. XIAO, S. IFTIKHAR, F. ZHAO, D. J. LI, Y. L. SUN, G. ZHANG, P. SHANG, VE A. R. QIAN. (2014). 'Physiological effects of microgravity on bone cells', *Calcif Tissue Int*, **94**: 569-579.
- BARBATELLI, G., I. MURANO, L. MADSEN, Q. HAO, M. JIMENEZ, K. KRISTIANSEN, J. P. GIACOBINO, R. DE MATTEIS, VE S. CINTI. (2010). 'The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **298**: E1244-1253.
- BECKER, J. L., VE G. R. SOUZA. (2013). 'Using space-based investigations to inform cancer research on Earth', *Nat Rev Cancer*, **13**: 315-327.
- BEYER NARDI, N., VE L. DA SILVA MEIRELLES. (2006). 'Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization', *Handb Exp Pharmacol*: 249-282.
- BIRBRAIR, A., Z. M. WANG, M. L. MESSI, G. N. ENIKOLOPOV, VE O. DELBONO. (2011). 'Nestin-GFP transgene reveals neural precursor cells in adult skeletal muscle', *PLoS One*, **6**: e16816.
- BLABER, E. A., N. DVOROCHKIN, C. LEE, J. S. ALWOOD, R. YOUSUF, P. PIANETTA, R. K. GLOBUS, B. P. BURNS, VE E. A. ALMEIDA. (2013). 'Microgravity induces pelvic bone loss through osteoclastic activity, osteocytic osteolysis, and osteoblastic cell cycle inhibition by CDKN1a/p21', *PLoS One*, **8**: e61372.
- BLACKWOOD, O.H., VE W. KELLY. (1955). *GENERAL PHYSICS* (Wiley).
- BONGSO, A., VE M. RICHARDS. (2004). 'History and perspective of stem cell research', *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **18**: 827-842.
- BONGSO, ARIFF, VE ENG HIN LEE. (2005). *STEM CELLS : FROM BENCH TO BEDSIDE* (World Scientific Publishing Company: Singapore).
- BOTTA, G. P., P. MANLEY, S. MILLER, VE P. I. LELKES. (2006). 'Real-time assessment of three-dimensional cell aggregation in rotating wall vessel bioreactors in vitro', *Nat Protoc*, **1**: 2116-2127.
- BOUCHER, J. G., A. BOUDREAU, S. AHMED, VE E. ATLAS. (2015). 'In Vitro Effects of Bisphenol A beta-D-Glucuronide (BPA-G) on Adipogenesis in Human and Murine Preadipocytes', *Environ Health Perspect*, **123**: 1287-1293.
- BRIGHTON, C. T., VE R. M. HUNT. (1997). 'Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus', *J Orthop Trauma*, **11**: 244-253.
- BROWN, J. M., M. S. BOYSEN, S. CHUNG, O. FABIYI, R. F. MORRISON, S. MANDRUP, VE M. K. MCINTOSH. (2004). 'Conjugated linoleic acid induces human adipocyte

delipidation: autocrine/paracrine regulation of MEK/ERK signaling by adipocytokines', *J Biol Chem*, **279**: 26735-26747.

BROWN, J. M., M. S. BOYSEN, S. S. JENSEN, R. F. MORRISON, J. STORKSON, R. LEA-CURRIE, M. PARIZA, S. MANDRUP, VE M. K. MCINTOSH. (2003). 'Isomer-specific regulation of metabolism and PPARgamma signaling by CLA in human preadipocytes', *J Lipid Res*, **44**: 1287-1300.

BROWN, J. M., VE M. K. MCINTOSH. (2003). 'Conjugated linoleic acid in humans: regulation of adiposity and insulin sensitivity', *J Nutr*, **133**: 3041-3046.

BUCKEY, JAY C. (2006). *SPACE PHYSIOLOGY* (Oxford University Press, USA: Oxford).

BURR, GEORGE O., VE MILDRED M. BURR. (1930). 'ON THE NATURE AND RÔLE OF THE FATTY ACIDS ESSENTIAL IN NUTRITION', *Journal of Biological Chemistry*, **86**: 587-621.

CAI, XIAOXIAO, VE YUNFENG LIN. (2013). *ADIPOGENESIS : SIGNALING PATHWAYS, MOLECULAR REGULATION AND IMPACT ON HUMAN DISEASE* (Nova Science Publishers, Inc: New York).

CHARTOUMPEKIS, D. V., I. G. HABEOS, P. G. ZIROS, A. I. PSYROGIANNIS, V. E. KYRIAZOPOULOU, VE A. G. PAPAVALASSIOU. (2011). 'Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21', *Mol Med*, **17**: 736-740.

CHEN, J., R. LIU, Y. YANG, J. LI, X. ZHANG, J. LI, Z. WANG, VE J. MA. (2011). 'The simulated microgravity enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into neurons', *Neurosci Lett*, **505**: 171-175.

CHEN, LI, XI YANG, XIANG CUI, MINMIN JIANG, YU GUI, YANNI ZHANG, VE XIANGDONG LUO. (2015). 'Adrenomedullin is a key Protein Mediating Rotary Cell Culture System that Induces the Effects of Simulated Microgravity on Human Breast Cancer Cells', *Microgravity Science and Technology*.

CHOI, B. K., S. B. PARK, D. R. LEE, H. J. LEE, Y. Y. JIN, S. H. YANG, VE J. W. SUH. (2016). 'Green coffee bean extract improves obesity by decreasing body fat in high-fat diet-induced obese mice', *Asian Pac J Trop Med*, **9**: 635-643.

CHONG, P. P., L. SELVARATNAM, A. A. ABBAS, VE T. KAMARUL. (2012). 'Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells', *J Orthop Res*, **30**: 634-642.

CINTI, S. (2005). 'The adipose organ', *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **73**: 9-15.

COLLET, P., D. UEBELHART, L. VICO, L. MORO, D. HARTMANN, M. ROTH, VE C. ALEXANDRE. (1997). 'Effects of 1- and 6-month spaceflight on bone mass and biochemistry in two humans', *Bone*, **20**: 547-551.

CONDE, J., M. SCOTECE, R. GOMEZ, V. LOPEZ, J. J. GOMEZ-REINO, F. LAGO, VE O. GUALILLO. (2011). 'Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity', *Biofactors*, **37**: 413-420.

COWHERD, R. M., R. E. LYLE, VE R. E. MCGEHEE, JR. (1999). 'Molecular regulation of adipocyte differentiation', *Semin Cell Dev Biol*, **10**: 3-10.

- D'AMOUR, K. A., A. G. BANG, S. ELIAZER, O. G. KELLY, A. D. AGULNICK, N. G. SMART, M. A. MOORMAN, E. KROON, M. K. CARPENTER, VE E. E. BAETGE. (2006). 'Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells', *Nat Biotechnol*, **24**: 1392-1401.
- DAVILA, J. C., G. G. CEZAR, M. THIEDE, S. STROM, T. MIKI, VE J. TROSKO. (2004). 'Use and application of stem cells in toxicology', *Toxicol Sci*, **79**: 214-223.
- DECLERCQ, V., C. G. TAYLOR, J. WIGLE, B. WRIGHT, L. TWOREK, VE P. ZAHRADKA. (2012). 'Conjugated linoleic acid improves blood pressure by increasing adiponectin and endothelial nitric oxide synthase activity', *J Nutr Biochem*, **23**: 487-493.
- DIEZ, J. J., VE P. IGLESIAS. (2003). 'The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease', *Eur J Endocrinol*, **148**: 293-300.
- EL OMAR, R., J. BEROUD, J. F. STOLTZ, P. MENU, E. VELOT, VE V. DECOT. (2014). 'Umbilical cord mesenchymal stem cells: The new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies?', *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, **20**: 523-544.
- ELBRECHT, A., Y. CHEN, C. A. CULLINAN, N. HAYES, MD LEIBOWITZ, D. E. MOLLER, VE J. BERGER. (1996). 'Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2', *Biochem Biophys Res Commun*, **224**: 431-437.
- ELCIN, Y. M. (2003). *TISSUE ENGINEERING, STEM CELLS, AND GENE THERAPIES* (Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York).
- ELCIN, Y. M. (2016a). Kök hücre ve rejeneratif tıp alanında dünya ve Türkiye'deki gelişmeler, *T.C. Bilim Anahtar Dergisi, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı*, **328**: ISSN: 1300-2414.
- ELCIN, Y. M. (2016b). Kök hücrelere bakış: Tanımlar, kavramlar ve sınıflandırmalar, *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları - Kök Hücre Araştırmaları ve Biyoetik*, **20**: 19-33, ISBN: 978-9944-252-76-8.
- ELCIN, Y. M. (2016c). TÜBA - KÖK HÜCRE ARAŞTIRMALARI VE BİYOETİK RAPORU, *Türkiye Bilimler Akademisi Yayınları*, **20**: 80, ISBN 978-9944-252-76-8.
- EMIN, N., A. KOC, S. DURKUT, A. E. ELCIN, VE Y. M. ELCIN. (2008). 'Engineering of rat articular cartilage on porous sponges: effects of tgf-beta 1 and microgravity bioreactor culture', *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, **36**: 123-137.
- FAJAS, L., D. AUBOEUF, E. RASPE, K. SCHOONJANS, A. M. LEFEBVRE, R. SALADIN, J. NAJIB, M. LAVILLE, J. C. FRUCHART, S. DEEB, A. VIDAL-PUIG, J. FLIER, M. R. BRIGGS, B. STAELS, H. VIDAL, VE J. AUWERX. (1997). 'The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARGgamma gene', *J Biol Chem*, **272**: 18779-18789.
- FERRARINI, M., N. STEIMBERG, M. PONZONI, D. BELLONI, A. BERENZI, S. GIRLANDA, F. CALIGARIS-CAPPIO, G. MAZZOLENI, VE E. FERRERO. (2013). 'Ex-vivo dynamic 3-D culture of human tissues in the RCCS bioreactor allows the study of Multiple Myeloma biology and response to therapy', *PLoS One*, **8**: e71613.
- FEVE, B. (2005). 'Adipogenesis: cellular and molecular aspects', *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **19**: 483-499.

- FINK, T., VE V. ZACHAR. (2011). 'Adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells', *Methods Mol Biol*, **698**: 243-251.
- FOSTER, J. S., C. L. KHODADAD, S. R. AHRENDT, VE M. L. PARRISH. (2013). 'Impact of simulated microgravity on the normal developmental time line of an animal-bacteria symbiosis', *Sci Rep*, **3**: 1340.
- FRIEDENSTEIN, A. J., U. F. DERIGLASOVA, N. N. KULAGINA, A. F. PANASUK, S. F. RUDAKOWA, E. A. LURIA, VE I. A. RUADKOW. (1974). 'Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method', *Exp Hematol*, **2**: 83-92.
- FRIEDENSTEIN, A. J., J. F. GORSKAJA, VE N. N. KULAGINA. (1976). 'Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs', *Exp Hematol*, **4**: 267-274.
- GARDNER, R. L. (2002). 'Stem cells: potency, plasticity and public perception', *J Anat*, **200**: 277-282.
- GIMBLE, J. M., F. GUILAK, M. E. NUTTALL, S. SATHISHKUMAR, M. VIDAL, VE B. A. BUNNELL. (2008). 'In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells', *Transfus Med Hemother*, **35**: 228-238.
- GOPALAKRISHNAN, R., K. O. GENC, A. J. RICE, S. M. LEE, H. J. EVANS, C. C. MAENDER, H. ILASLAN, VE P. R. CAVANAGH. (2010). 'Muscle volume, strength, endurance, and exercise loads during 6-month missions in space', *Aviat Space Environ Med*, **81**: 91-102.
- GRANLUND, L., L. K. JUVET, J. I. PEDERSEN, VE H. I. NEBB. (2003). 'Trans10, cis12-conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPARgamma modulator', *J Lipid Res*, **44**: 1441-1452.
- GRIMM, D., M. WEHLAND, J. PIETSCH, G. ALESHCHEVA, P. WISE, J. VAN LOON, C. ULBRICH, N. E. MAGNUSSON, M. INFANGER, VE J. BAUER. (2014). 'Growing tissues in real and simulated microgravity: new methods for tissue engineering', *Tissue Eng Part B Rev*, **20**: 555-566.
- HE, S., D. NAKADA, VE S. J. MORRISON. (2009). 'Mechanisms of stem cell self-renewal', *Annu Rev Cell Dev Biol*, **25**: 377-406.
- HONDARES, E., M. ROSELL, F. J. GONZALEZ, M. GIRALT, R. IGLESIAS, VE F. VILLARROYA. (2010). 'Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat', *Cell Metab*, **11**: 206-212.
- HUANG, Y., Z. Q. DAI, S. K. LING, H. Y. ZHANG, Y. M. WAN, VE Y. H. LI. (2009). 'Gravity, a regulation factor in the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells', *J Biomed Sci*, **16**: 87.
- HUGHES-FULFORD, M., T. T. CHANG, E. M. MARTINEZ, VE C. F. LI. (2015). 'Spaceflight alters expression of microRNA during T-cell activation', *FASEB J*.
- HWANG, Y. S., J. CHO, F. TAY, J. Y. HENG, R. HO, S. G. KAZARIAN, D. R. WILLIAMS, A. R. BOCCACCINI, J. M. POLAK, VE A. MANTALARIS. (2009). 'The use of murine embryonic stem cells, alginate encapsulation, and rotary microgravity bioreactor in bone tissue engineering', *Biomaterials*, **30**: 499-507.

- JIANG, Y., B. N. JAHAGIRDAR, R. L. REINHARDT, R. E. SCHWARTZ, C. D. KEENE, X. R. ORTIZ-GONZALEZ, M. REYES, T. LENVIK, T. LUND, M. BLACKSTAD, J. DU, S. ALDRICH, A. LISBERG, W. C. LOW, D. A. LARGAESPADA, VE C. M. VERFAILLIE. (2002). 'Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow', *Nature*, **418**: 41-49.
- JONES, J. R., C. BARRICK, K. A. KIM, J. LINDNER, B. BLONDEAU, Y. FUJIMOTO, M. SHIOTA, R. A. KESTERSON, B. B. KAHN, VE M. A. MAGNUSON. (2005). 'Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: 6207-6212.
- KANG, C. Y., L. ZOU, M. YUAN, Y. WANG, T. Z. LI, Y. ZHANG, J. F. WANG, Y. LI, X. W. DENG, VE C. T. LIU. (2011). 'Impact of simulated microgravity on microvascular endothelial cell apoptosis', *Eur J Appl Physiol*, **111**: 2131-2138.
- KANG, K., W. LIU, K. J. ALBRIGHT, Y. PARK, VE M. W. PARIZA. (2003). 'trans-10,cis-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression', *Biochem Biophys Res Commun*, **303**: 795-799.
- KENNEDY, A., S. CHUNG, K. LAPOINT, O. FABIYI, VE M. K. MCINTOSH. (2008). 'Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid antagonizes ligand-dependent PPARgamma activity in primary cultures of human adipocytes', *J Nutr*, **138**: 455-461.
- KERN, SUSANNE, HERMANN EICHLER, JOHANNES STOEVE, HARALD KLÜTER, VE KAREN BIEBACK. (2006). 'Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue', *STEM CELLS*, **24**: 1294-1301.
- KEUNE, JESSICA A., KENNETH A. PHILBRICK, ADAM J. BRANSCUM, URSZULA T. IWANIEC, VE RUSSELL T. TURNER. (2016). 'Spaceflight-induced vertebral bone loss in ovariectomized rats is associated with increased bone marrow adiposity and no change in bone formation', *Npj Microgravity*, **2**: 16016.
- KIM, J., Y. PARK, S. H. LEE, VE Y. PARK. (2013). 'trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid promotes bone formation by inhibiting adipogenesis by peroxisome proliferator activated receptor-gamma-dependent mechanisms and by directly enhancing osteoblastogenesis from bone marrow mesenchymal stem cells', *J Nutr Biochem*, **24**: 672-679.
- KOC, A., N. EMIN, A. E. ELCIN, VE Y. M. ELCIN. (2008). 'In Vitro Osteogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells in a Microgravity Bioreactor', *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **23**: 244-261.
- LAMBERTZ, D., C. PEROT, R. KASPRANSKI, VE F. GOUBEL. (2001). 'Effects of long-term spaceflight on mechanical properties of muscles in humans', *J Appl Physiol (1985)*, **90**: 179-188.
- LANG, T., A. LEBLANC, H. EVANS, Y. LU, H. GENANT, VE A. YU. (2004). 'Cortical and trabecular bone mineral loss from the spine and hip in long-duration spaceflight', *J Bone Miner Res*, **19**: 1006-1012.
- LEBLANC, A., C. LIN, L. SHACKELFORD, V. SINITSYN, H. EVANS, O. BELICHENKO, B. SCHENKMAN, I. KOZLOVSKAYA, V. OGANOV, A. BAKULIN, T. HEDRICK, VE D. FEEBACK. (2000). 'Muscle volume, MRI relaxation times (T2), and body composition after spaceflight', *J Appl Physiol (1985)*, **89**: 2158-2164.

- LEBLANC, A., V. SCHNEIDER, L. SHACKELFORD, S. WEST, V. OGANOV, A. BAKULIN, VE L. VORONIN. (2000). 'Bone mineral and lean tissue loss after long duration space flight', *J Musculoskelet Neuronal Interact*, **1**: 157-160.
- LEE, N., I. KIM, S. PARK, D. HAN, S. HA, M. KWON, J. KIM, S. H. BYUN, W. OH, H. B. JEON, D. H. KWEON, J. Y. CHO, VE K. YOON. (2015). 'Creatine inhibits adipogenesis by downregulating insulin-induced activation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway', *Stem Cells Dev*, **24**: 983-994.
- LEI, X. H., L. N. NING, Y. J. CAO, S. LIU, S. B. ZHANG, Z. F. QIU, H. M. HU, H. S. ZHANG, S. LIU, VE E. K. DUAN. (2011). 'NASA-approved rotary bioreactor enhances proliferation of human epidermal stem cells and supports formation of 3D epidermis-like structure', *PLoS One*, **6**: e26603.
- LEVENBERG, S., J. S. GOLUB, M. AMIT, J. ITSKOVITZ-ELDOR, VE R. LANGER. (2002). 'Endothelial cells derived from human embryonic stem cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 4391-4396.
- LIN, Y. F., W. JING, L. WU, X. Y. LI, Y. WU, L. LIU, W. TANG, J. LONG, W. D. TIAN, VE X. M. MO. (2008). 'Identification of osteo-adipo progenitor cells in fat tissue', *Cell Prolif*, **41**: 803-812.
- LIU, Y., T. LIU, X. FAN, X. MA, VE Z. CUI. (2006). 'Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood in rotating wall vessel', *J Biotechnol*, **124**: 592-601.
- LUO, W., W. XIONG, M. QIU, Y. LV, Y. LI, VE F. LI. (2011). 'Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype utilizing simulated microgravity In vitro', *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, **31**: 199-203.
- MCNEEL, R. L., VE H. J. MERSMANN. (2003). 'Effects of isomers of conjugated linoleic acid on porcine adipocyte growth and differentiation', *J Nutr Biochem*, **14**: 266-274.
- MEYERS, V. E., M. ZAYZAFON, S. R. GONDA, W. E. GATHINGS, VE J. M. McDONALD. (2004). 'Modeled microgravity disrupts collagen I/integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells', *J Cell Biochem*, **93**: 697-707.
- MICHALIK, L., J. AUWERX, J. P. BERGER, V. K. CHATTERJEE, C. K. GLASS, F. J. GONZALEZ, P. A. GRIMALDI, T. KADOWAKI, M. A. LAZAR, S. O'RAHILLY, C. N. PALMER, J. PLUTZKY, J. K. REDDY, B. M. SPIEGELMAN, B. STAELS, VE W. WAHLI. (2006). 'International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors', *Pharmacol Rev*, **58**: 726-741.
- MORABITO, CATERINA, NATHALIE STEIMBERG, GIOVANNA MAZZOLENI, SIMONE GUARNIERI, FAN, #XF2, GIORGIO -ILIC, MARIGGI, #XF2, VE MARIA A. . (2015). 'RCCS Bioreactor-Based Modelled Microgravity Induces Significant Changes on In Vitro 3D Neuroglial Cell Cultures', *BioMed Research International*, **2015**: 14.
- MORENO-NAVARRETE, JOSÉ MARÍA, VE JOSÉ MANUEL FERNÁNDEZ-REAL. (2012). 'Adipocyte Differentiation': 17-38.
- NABAVI, N., A. KHANDANI, A. CAMIRAND, VE R. E. HARRISON. (2011). 'Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion', *Bone*, **49**: 965-974.

- NAGAO, K., N. INOUE, Y. M. WANG, VE T. YANAGITA. (2003). 'Conjugated linoleic acid enhances plasma adiponectin level and alleviates hyperinsulinemia and hypertension in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats', *Biochem Biophys Res Commun*, **310**: 562-566.
- NARICI, M., B. KAYSER, P. BARATTINI, VE P. CERRETELLI. (2003). 'Effects of 17-day spaceflight on electrically evoked torque and cross-sectional area of the human triceps surae', *Eur J Appl Physiol*, **90**: 275-282.
- ONI, O. O. (1992). 'Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus', *J Bone Joint Surg Am*, **74**: 633-634.
- PARISH, C. L., VE E. ARENAS. (2007). 'Stem-cell-based strategies for the treatment of Parkinson's disease', *Neurodegener Dis*, **4**: 339-347.
- PEREZ-MATUTE, P., J. A. MARTINEZ, A. MARTI, VE M. J. MORENO-ALIAGA. (2007). 'Linoleic acid decreases leptin and adiponectin secretion from primary rat adipocytes in the presence of insulin', *Lipids*, **42**: 913-920.
- PERRIER, A. L., V. TABAR, T. BARBERI, M. E. RUBIO, J. BRUSES, N. TOPF, N. L. HARRISON, VE L. STUDER. (2004). 'Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 12543-12548.
- PETROVIC, N., T. B. WALDEN, I. G. SHABALINA, J. A. TIMMONS, B. CANNON, VE J. NEDERGAARD. (2010). 'Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes', *J Biol Chem*, **285**: 7153-7164.
- PLATT, I. D., VE A. EL-SOHEMY. (2009). 'Regulation of osteoblast and adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells by conjugated linoleic acid', *J Nutr Biochem*, **20**: 956-964.
- RAHMAN, S. M., Y. WANG, H. YOTSUMOTO, J. CHA, S. HAN, S. INOUE, VE T. YANAGITA. (2001). 'Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and beta-oxidation of fatty acid in OLETF rats', *Nutrition*, **17**: 385-390.
- RAUH, J., F. MILAN, K. P. GUNTHER, VE M. STIEHLER. (2011). 'Bioreactor systems for bone tissue engineering', *Tissue Eng Part B Rev*, **17**: 263-280.
- RONTI, T., G. LUPATTELLI, VE E. MANNARINO. (2006). 'The endocrine function of adipose tissue: an update', *Clin Endocrinol (Oxf)*, **64**: 355-365.
- ROSEN, E. D., VE B. M. SPIEGELMAN. (2000). 'Molecular regulation of adipogenesis', *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**: 145-171.
- ROSEN, E. D., VE B. M. SPIEGELMAN. (2006). 'Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis', *Nature*, **444**: 847-853.
- RYAN, J. M., F. P. BARRY, J. M. MURPHY, VE B. P. MAHON. (2005). 'Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection', *J Inflamm (Lond)*, **2**: 8.
- SACKMANN-SALA, L., D. E. BERRYMAN, E. R. LUBBERS, H. ZHANG, C. B. VESEL, K. M. TROIKE, E. S. GOSNEY, E. O. LIST, VE J. J. KOPCHICK. (2014). 'Age-related and depot-specific changes in white adipose tissue of growth hormone receptor-null mice', *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **69**: 34-43.

- SAMBANDAM, Y., M. T. TOWNSEND, J. J. PIERCE, C. M. LIPMAN, A. HAQUE, T. A. BATEMAN, VE S. V. REDDY. (2014). 'Microgravity control of autophagy modulates osteoclastogenesis', *Bone*, **61**: 125-131.
- SANZ, A. R., F. S. CARRION, VE A. P. CHAPARRO. (2015). 'Mesenchymal stem cells from the oral cavity and their potential value in tissue engineering', *Periodontol 2000*, **67**: 251-267.
- SCHWARZ, RAY P., THOMAS J. GOODWIN, VE DAVID A. WOLF. (1992). 'Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: An application of simulated microgravity', *Journal of Tissue Culture Methods*, **14**: 51-57.
- SEALE, P., B. BJORK, W. YANG, S. KAJIMURA, S. CHIN, S. KUANG, A. SCIME, S. DEVARAKONDA, H. M. CONROE, H. ERDJUMENT-BROMAGE, P. TEMPST, M. A. RUDNICKI, D. R. BEIER, VE B. M. SPIEGELMAN. (2008). 'PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch', *Nature*, **454**: 961-967.
- SEYDOUX, G., VE R. E. BRAUN. (2006). 'Pathway to totipotency: lessons from germ cells', *Cell*, **127**: 891-904.
- SHEYN, D., G. PELLER, D. NETANELY, E. DOMANY, VE D. GAZIT. (2010). 'The effect of simulated microgravity on human mesenchymal stem cells cultured in an osteogenic differentiation system: a bioinformatics study', *Tissue Eng Part A*, **16**: 3403-3412.
- SMITH, S. M., J. L. NILLEN, A. LEBLANC, A. LIPTON, L. M. DEMERS, H. W. LANE, VE C. S. LEACH. (1998). 'Collagen cross-link excretion during space flight and bed rest', *J Clin Endocrinol Metab*, **83**: 3584-3591.
- SOKOLOVSKAYA, ALISA A., TATIANA I. IGNASHKOVA, ANNA V. BOCHENKOVA, ALEKSEY A. MOSKOVTSSEV, VICTOR M. BARANOV, VE ASLAN A. KUBATIEV. (2014). 'Effects of simulated microgravity on cell cycle in human endothelial cells', *Acta Astronautica*, **99**: 16-23.
- SPENCER, N. D., J. M. GIMBLE, VE M. J. LOPEZ. (2011). 'Mesenchymal stromal cells: past, present, and future', *Vet Surg*, **40**: 129-139.
- SPIEGELMAN, B. M., VE J. S. FLIER. (2001). 'Obesity and the regulation of energy balance', *Cell*, **104**: 531-543.
- SUBRAMANIAN, ARJUNAN, GAN SHU-UI, NGO KAE-SIANG, KALAMEGAM GAUTHAMAN, ARIJIT BISWAS, MAHESH CHOOLANI, ARIFF BONGSO, VE FONG CHUI-YEE. (2012). 'Human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells do not transform to tumor-associated fibroblasts in the presence of breast and ovarian cancer cells unlike bone marrow mesenchymal stem cells', *Journal Of Cellular Biochemistry*, **113**: 1886-1895.
- SUBRAMANIAN, R., J. AMALORPAVANATHAN, R. SHANKAR, M. RAJKUMAR, S. BASKAR, S. R. MANJUNATH, R. SENTHILKUMAR, P. MURUGAN, V. R. SRINIVASAN, VE S. ABRAHAM. (2011). 'Application of autologous bone marrow mononuclear cells in six patients with advanced chronic critical limb ischemia as a result of diabetes: our experience', *Cytotherapy*, **13**: 993-999.
- SUN, L., C. YANG, Y. GE, M. YU, G. CHEN, W. GUO, VE W. TIAN. (2014). 'In vitro three-dimensional development of mouse molar tooth germs in a rotary cell culture system', *Int J Paediatr Dent*, **24**: 175-183.

- TAMORI, Y., J. MASUGI, N. NISHINO, VE M. KASUGA. (2002). 'Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes', *Diabetes*, **51**: 2045-2055.
- TERADA, MASAHIRO, MASAYA SEKI, RIKA TAKAHASHI, SHIN YAMADA, AKIRA HIGASHIBATA, HIDEYUKI J. MAJIMA, MASAMICHI SUDOH, CHIAKI MUKAI, VE NORIAKI ISHIOKA. (2016). 'Effects of a Closed Space Environment on Gene Expression in Hair Follicles of Astronauts in the International Space Station', *PLoS ONE*, **11**: e0150801.
- TERAI, S., T. ISHIKAWA, K. OMORI, K. AOYAMA, Y. MARUMOTO, Y. URATA, Y. YOKOYAMA, K. UCHIDA, T. YAMASAKI, Y. FUJII, K. OKITA, VE I. SAKAIDA. (2006). 'Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy', *Stem Cells*, **24**: 2292-2298.
- TRAYHURN, P., B. WANG, VE I. S. WOOD. (2008). 'Hypoxia and the endocrine and signalling role of white adipose tissue', *Arch Physiol Biochem*, **114**: 267-276.
- TROYER, D. L., VE M. L. WEISS. (2008). 'Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population', *Stem Cells*, **26**: 591-599.
- UDDIN, S. M., VE Y. X. QIN. (2013). 'Enhancement of osteogenic differentiation and proliferation in human mesenchymal stem cells by a modified low intensity ultrasound stimulation under simulated microgravity', *PLoS One*, **8**: e73914.
- URAL, A. U. (2012). 'Hematopoietik Kök Hücreler', 7. *Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi*.
- WABITSCH, M., R. E. BRENNER, I. MELZNER, M. BRAUN, P. MOLLER, E. HEINZE, K. M. DEBATIN, VE H. HAUNER. (2001). 'Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation', *Int J Obes Relat Metab Disord*, **25**: 8-15.
- WAGNER, E. R., B. C. HE, L. CHEN, G. W. ZUO, W. ZHANG, Q. SHI, Q. LUO, X. LUO, B. LIU, J. LUO, F. RASTEGAR, C. J. HE, Y. HU, B. BOODY, H. H. LUU, T. C. HE, Z. L. DENG, VE R. C. HAYDON. (2010). 'Therapeutic Implications of PPARgamma in Human Osteosarcoma', *PPAR Res*, **2010**: 956427.
- WAGNER JR, JOHN E, CLAUDIO G BRUNSTEIN, ANTHONY E BOITANO, TODD E DEFOR, DAVID MCKENNA, DARIN SUMSTAD, BRUCE R BLAZAR, JAKUB TOLAR, CHAP LE, JULIE JONES, MICHAEL P COOKE, VE CONRAD C BLEUL. (2016). 'Phase I/II Trial of StemRegenin-1 Expanded Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Supports Testing as a Stand-Alone Graft', *Cell Stem Cell*, **18**: 144-155.
- WAKI, H., VE P. TONTONOZ. (2007). 'Endocrine functions of adipose tissue', *Annu Rev Pathol*, **2**: 31-56.
- WANG, BOHAN, JOHN R. JENKINS, VE PAUL TRAYHURN. (2005). 'Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF- α ', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, **288**: E731-E740.
- WANG, N., H. WANG, J. CHEN, X. ZHANG, J. XIE, Z. LI, J. MA, W. WANG, VE Z. WANG. (2014). 'The simulated microgravity enhances multipotential differentiation capacity of bone marrow mesenchymal stem cells', *Cytotechnology*, **66**: 119-131.

- WANG, Y., R. GAO, P. P. WANG, J. JIAN, X. L. JIANG, C. YAN, X. LIN, L. WU, G. Q. CHEN, VE Q. WU. (2012). 'The differential effects of aligned electrospun PHBHHx fibers on adipogenic and osteogenic potential of MSCs through the regulation of PPARgamma signaling', *Biomaterials*, **33**: 485-493.
- WANG, Y., H. WANG, V. HEGDE, O. DUBUISSON, Z. GAO, N. V. DHURANDHAR, VE J. YE. (2013). 'Interplay of pro- and anti-inflammatory cytokines to determine lipid accretion in adipocytes', *Int J Obes (Lond)*, **37**: 1490-1498.
- WEI, L., Y. DIAO, J. QI, A. KHOKHLOV, H. FENG, X. YAN, VE Y. LI. (2013). 'Effect of change in spindle structure on proliferation inhibition of osteosarcoma cells and osteoblast under simulated microgravity during incubation in rotating bioreactor', *PLoS One*, **8**: e76710.
- WEI, L., C. LIU, L. KANG, Y. LIU, S. SHI, Q. WU, VE Y. LI. (2014). 'Experimental study on effect of simulated microgravity on structural chromosome instability of human peripheral blood lymphocytes', *PLoS One*, **9**: e100595.
- WEI, X., G. LI, X. YANG, K. BA, Y. FU, N. FU, X. CAI, G. LI, Q. CHEN, M. WANG, VE Y. LIN. (2013). 'Effects of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) on adipocyte differentiation from mouse adipose-derived stem cells', *Cell Prolif*, **46**: 416-424.
- WHEDON, G. D., L. LUTWAK, P. RAMBAUT, M. WHITTLE, C. LEACH, J. REID, VE M. SMITH. (1976). 'Mineral and nitrogen metabolic studies on Skylab flights and comparison with effects of earth long-term recumbency', *Life Sci Space Res*, **14**: 119-127.
- WHITE-WALKER, S. BEFORE WE ARE BORN: ESSENTIALS OF EMBRYOLOGY AND BIRTH DEFECTS, 5TH EDITION.
- WILKISON, W. O., H. Y. MIN, K. P. CLAFFEY, B. L. SATTERBERG, VE B. M. SPIEGELMAN. (1990). 'Control of the adipin gene in adipocyte differentiation. Identification of distinct nuclear factors binding to single- and double-stranded DNA', *J Biol Chem*, **265**: 477-482.
- WILLIAM, JUSTIN BENJAMIN, RAJAMANICKAM PRABAKARAN, VE SUBBU AYYAPPAN. (2011). 'Functional Recovery of Spinal Cord Injury Following Application of Intralesional Bone Marrow Mononuclear Cells Embedded in Polymer Scaffold – Two Year Follow-up in a Canine', *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, **01**.
- WU, X., S. H. LI, L. M. LOU, VE Z. R. CHEN. (2013). 'The effect of the microgravity rotating culture system on the chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells', *Mol Biotechnol*, **54**: 331-336.
- YEGANEH, A., C. G. TAYLOR, L. TWOREK, J. POOLE, VE P. ZAHRADKA. (2016). 'Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) interferes with lipid droplet accumulation during 3T3-L1 preadipocyte differentiation', *Int J Biochem Cell Biol*, **76**: 39-50.
- YU, B., D. YU, L. CAO, X. ZHAO, T. LONG, G. LIU, T. TANG, VE Z. ZHU. (2011). 'Simulated microgravity using a rotary cell culture system promotes chondrogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells via the p38 MAPK pathway', *Biochem Biophys Res Commun*, **414**: 412-418.
- ZAYZAFOON, M., W. E. GATHINGS, VE J. M. McDONALD. (2004). 'Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis', *Endocrinology*, **145**: 2421-2432.

- ZHANG, S., D. ZHENG, Y. WU, W. LIN, Z. CHEN, L. MENG, J. LIU, VE Y. ZHOU. (2016). 'Simulated Microgravity Using a Rotary Culture System Compromises the In Vitro Development of Mouse Preantral Follicles', *PLoS One*, **11**: e0151062.
- ZHANG, X., Y. NAN, H. WANG, J. CHEN, N. WANG, J. XIE, J. MA, VE Z. WANG. (2013). 'Model microgravity enhances endothelium differentiation of mesenchymal stem cells', *Naturwissenschaften*, **100**: 125-133.
- ZHENG, Q., G. HUANG, J. YANG, Y. XU, C. GUO, Y. XI, Z. PAN, VE J. WANG. (2007). 'Could the effect of modeled microgravity on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells be reversed by regulation of signaling pathways?', *Biol Chem*, **388**: 755-763.



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı ve Soyadı :Gülhan Erdem SUBAK

Doğum Tarihi : 02.04.1990

Tabiyeti : T.C.

Medeni Durumu : Bekar

Askerlik Durumu : Tecilli

Adresi : Yavuz Selim Mah., PTT Cad., Boşnak Sk., Dostlar St., B
Blok 13/8 Çubuk/ ANKARA Tel: 0 506 861 67 29

II- Eğitimi

Lisans : 2012 - Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Orta Öğrenim : 2008 - Çubuk Anadolu Lisesi (Ankara)

İlköğretim : 2004 - Bahçelievler Nebahat Keskin İlköğretim Okulu (Ankara)

III- Ünvanları: Biyolog

IV- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar:

- TÜBİTAK ARAŞTIRMA PROJESİ BURSİYER, Hamilelikte Emniyetli İlaç Kullanımının Sağlanmasına Yönelik Olarak İlaç Taşıyıcı Sistemlerin İncelenmesi, Yüksek Lisans Bursu (Proje No: 112S529)

V- Uluslararası Kongre Sunumu

- Elçin Y.M., **Subak E.**, Şeker Ş., Elçin A.E. “*In Vitro* Adipogenic Differentiation of Human Adipose Stem Cells Under Simulated Microgravity”, Poster Presentation, ISSCR 2016 - Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, 22-25 June 2016, San Francisco, California, U.S.A.

V- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve Katıldığı eğitim seminerleri:

- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası – ANKÜSEM (2014)
- Mikrobiyal Biyoteknoloji – Ankara Üniversitesi Biyoteknolojisi Enstitüsü (2011)
- Trüf Mantarı Güz Dikim Çalıştayı – Trüf Çiftlik Kurulum (2011)
- Dil Kursları Sertifikası İngilizce – TÖMER (2011)
- Hakem Eğitimi Sertifika Programı – Anadolu Üniversitesi (2014)