



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN FONKSİYONEL
NÖRONLARA FARKLILAŞTIRILMASI**

NURŞAH ÖZTUNÇ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi NİHAL KARAKAŞ

İkinci Tez Danışmanı

Prof. Dr. ÜLKAN KILIÇ

İSTANBUL - 2021

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Tez Sahibi : Nurşah ÖZTUNÇ
Tez Başlığı : İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerinin Fonksiyonel Nöronlara Farklılaştırılması
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 11.01.2021

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Dr.Öğr.Üyesi Nihal KARAKAŞ

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza

Sınav Jüri Üyeleri

Doç.Dr. Kürşat ÖZDİLLİ

İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr.Öğr.Üyesi Neşe AYŞİT

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof.Dr. Ülkan KILIÇ

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Dr.Öğr.Üyesi Merve BEKER

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

NURŞAH ÖZTUNÇ



“Bu tez,
değerli aileme ithaf edilmiştir...”

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerini aktararak yetişmemi ve akademik kimliğimin oluşmasını sağlayan, sunduğu fırsatlar için minnet duyduğum, tecrübeleriyle bundan sonraki yaşamım için ışık tutan, azmi ve çalışkanlığı ile örnek aldığım, sayın hocam ve tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Nihal KARAKAŞ'a,

Bana akademik hayatın kapılarını açan ve fırsat tanıyan, duruşu, disiplini, çalışkanlığı ile örnek aldığım ve her zaman örnek alacağım, bilgi, deneyim ve birikimlerini her daim aktararak ufkumu açan, sayın hocam ve eş danışmanım Prof. Dr. Ülkan KILIÇ'a,

Bilgisi, tecrübesi, teşvik edici tavırları ve yardımlarıyla yetişmemde büyük emeği geçen, tezimin her aşamasında desteğini sunan M.Sc. Sadık BAY'a,

Tez çalışmamın akım sitometri deneylerini yapan, akademik desteğinin yanında manevi desteğini de hissettiren M.Sc. Emre VATANDAŞLAR'a,

Tez çalışmam boyunca üzerinde çalıştığım donörlere ait kemik iliklerinin temini konusunda yardımları ve ilgisi için Dr. Öğr. Üyesi Hülya BİLGİN'e,

Eğitim sürem boyunca kendileri ile çalışmaktan mutluluk duyduğum, birlikte güzel vakit geçirdiğim, yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Şerif AYDIN, Arş. Gör. M.Sc. Olgu Enis TOK ve Dr. Öğr. Üyesi Neşe AYŞİT'e,

Öğr. Gör. Nagihan MANTAR, M.Sc. Zeynep BALÇIKANLI, Uzm. Dyt. Merve TAYLAN ve M.Sc. Oğuzhan KÖSE başta olmak üzere bütün meslektaşlarıma, çalışma arkadaşlarıma, ekip arkadaşlarıma ve tüm SABİTA ailesine,

Tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen ve her zaman yardımcı olan, birlikte güzel ve başarılı çalışmalar yaptığımız, Dr. Nezaket TÜRKEL SESLİ'ye

Bugünlere gelmemde desteklerini esirgemeyen, hayallerimin peşinden koşmayı öğreten, sonsuz sevgileriyle her daim ayakta kalmamı sağlayan, varlıkları ve dualarıyla en büyük destekçilerim, tüm eğitim hayatım ve bu tez çalışması süresince her zaman yanımda olan annem Nevin ÖZTUNÇ'a, babam Kadir ÖZTUNÇ'a ve ablam Gülşah ÖZTUNÇ TULUM'a,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa No. |
|---|---------------|
| TEZ ONAYI | i |
| BEYAN | ii |
| TEŞEKKÜR/İTHAF | iii/iv |
| KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ | vii |
| TABLolar LİSTESİ | ix |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | x |
| RESİMLER LİSTESİ | xii |
| 1. ÖZET | 1 |
| 2. ABSTRACT | 2 |
| 3. GİRİŞ VE AMAÇ | 3 |
| 4. GENEL BİLGİLER | 6 |
| 4.1. Mezenkimal Kök Hücreler..... | 6 |
| 4.1.1. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri | 8 |
| 4.1.1.1. İzolasyonu ve kültürü..... | 9 |
| 4.1.1.2. İmmünofenotipleme..... | 11 |
| 4.1.1.3. Mezodermal farklılaşması..... | 13 |
| 4.1.2. Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin nöronlara farklılaşması..... | 14 |
| 4.2. Nörodejeneratif Hastalıklara Yönelik Çalışmalarda Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Nöronların Kullanılması..... | 15 |
| 4.2.1. <i>İn vitro</i> hastalık modelleme çalışmaları..... | 17 |
| 4.2.2. Kültürde elde edilen nöronlar ile <i>in vivo</i> çalışmalar..... | 21 |
| 5. MATERYAL VE METOT | 26 |
| 5.1. Kemik İliğinden İnsan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve İmmünofenotipleme..... | 28 |
| 5.2. İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerin Nöronlara Farklılaştırılması..... | 31 |
| 5.3. Nöronlara İndüklenen İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerde Hücre Canlılığının Analiz Edilmesi..... | 32 |

| | |
|--|------------|
| 5.4. İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerden Elde Edilen Nöronların Fenotipik Doğrulaması..... | 33 |
| 5.5. Fonksiyona Özgü Nöronların İncelenmesi | 46 |
| 5.5.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)..... | 46 |
| 5.5.2. Akım sitometrisi..... | 48 |
| 5.5.3. İmmünfloresan boyama..... | 49 |
| 5.5.4. Western blot..... | 51 |
| 5.6. İstatistik..... | 53 |
| 6. BULGULAR..... | 54 |
| 6.1. Sağlıklı kemik iliği donörlerinden izole edilmiş hücreler ve insan mezenkimal kök hücre hattı mezenkimal kök hücre fenotipi gösterir..... | 54 |
| 6.2. İnsan mezenkimal kök hücreleri <i>in vitro</i> olarak nöronlara farklılaşabilir..... | 56 |
| 6.3 Nöronal indüksiyon ortamı insan mezenkimal kök hücrelerin canlılığını sürdürerek nöronlara farklılaşmasını sağlar..... | 59 |
| 6.4. İnsan mezenkimal kök hücrelerden <i>in vitro</i> ortamda yüksek oranda fonksiyonel nöronlar elde edilebilir..... | 60 |
| 6.5. iMKH-Nöron'lar fonksiyona özgü mRNA'ları ifade eder..... | 62 |
| 6.6. iMKH-Nöron'lar dopaminerjik ve kolinerjik nöronlara farklılaşabilmektedir..... | 65 |
| 7. TARTIŞMA ve SONUÇ..... | 79 |
| 8. KAYNAKLAR..... | 82 |
| 9. EKLER | 102 |
| 10. ETİK KURUL ONAYI | 103 |
| 11. ÖZGEÇMİŞ | 107 |

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

| | |
|------------|---|
| AD | Alzheimer Hastalığı |
| AD-MKH | Adipoz Dokusu-Mezenkimal Kök Hücresi |
| ALS | Amyotrofik Lateral Skleroz |
| BDNF | Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör |
| bFGF | bazik Fibroblast Büyüme Faktörü |
| BHA | Bütil Hidroksi Anisol |
| BME | Beta Merkaptotanol/2- Merkaptotanol |
| BRDU | Bromodeoksiüridin |
| ChAT | Kolin Asetiltransferaz |
| DAT | Dopamin Aktif Taşıyıcı |
| DEPC | Dietilpirokarbonat |
| DMEM-LG | Dulbecco's Modified Eagle's Medyum-Düşük Glukoz |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| DRG | Arka Kök Ganglion |
| ECM | Ekstraselüler Matriks |
| EDTA | Etilendiamin Tetraasetik Asit |
| EGF | Epidermal Büyüme Faktörü |
| FACS | Floresan Aktive Hücre Ayırma |
| FBS | Fetal Sığır Serum |
| FCM | Akım Sitometrisi |
| FGF-8 | Fibroblast Büyüme Faktörü-8 |
| G-g | Gün-gün |
| GAD 67 | Glutamik Asit Dekarboksilaz 67 |
| GAPDH | Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz |
| GFAP | Glial Fibriler Asidik Protein |
| HCl | Hidroklorik Asit |
| HD | Huntington Hastalığı |
| hEGF | insan Epidermal Büyüme Faktörü |
| IBMX | 3-İzobütil-1-Metilksantin |
| ISCT | Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği |
| iGK | insan Göbek Kordonu |
| GKK | Göbek Kordon Kanı |
| iGK-MKH | insan Göbek Kordonu-Mezenkimal Kök Hücresi |
| iMKH | insan Mezenkimal Kök Hücre |
| iMKH-Nöron | iMKH'lerin indüklenmesiyle elde edilen nöronlar |
| KCl | Potasyum Klorür |
| Kİ | Kemik İliği |
| Kİ-iMKH | Kemik iliği-insan Mezenkimal Kök Hücreleri |
| Kİ-MKH | Kemik iliği-Mezenkimal Kök Hücreleri |
| MACS | Manyetik Aktive Hücre Ayırma |
| MKH | Mezenkimal Kök Hücre |
| MS | Multipl Skleroz |
| NaCl | Sodyum Klorür |

| | |
|----------------|---|
| NaOH | Sodyum Hidroksit |
| NeuN | Nöronal Çekirdekler |
| NGF | Sinir Büyüme Faktörü |
| NI | Nöronal İndüksiyon |
| NSE | Nöron Spesifik Enolaz |
| P-p | Pasaj-pasaj |
| PBS | Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi |
| PCR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| PD | Parkinson Hastalığı |
| PFA | Paraformaldehit |
| PIC | Proteaz İnhibitör Kokteyl |
| PPAR- γ | Peroksizom Proliferatör-Aktive Reseptör gama |
| P/S | Penisilin/Streptomisin |
| PVDF | Poliviniliden Diflorür |
| qRT-PCR | Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| RA | Retinoik Asit |
| RT-PCR | Tersine Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| SDS | Sodyum Dodesil Sülfat |
| TAE | Tris Asetat EDTA |
| Tau | Tau proteini |
| TBST | Tris Buffered Saline with Tween 20 |
| TH | Tirozin Hidroksilaz |
| TrkA | Tropomiyozin reseptör kinaz A |
| WB | Western Blot |
| VGLUT 1 | Veziküler Glutamat Taşıyıcısı 1 |

TABLULAR LİSTESİ

Sayfa No.

| | |
|---|----|
| Tablo 4.1.1.1. Kemik iliği mezenkimal kök hücreler tarafından salgılanan endokrin faktörler..... | 9 |
| Tablo 4.1.1.2.1. Yaygın farklı doku kaynaklı MKH'lerin özellikleri ve farklılaşma potansiyeli..... | 12 |
| Tablo 5.1. Tez kapsamında kullanılan materyallere ait bilgiler..... | 26 |



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No.

| | |
|--|----|
| Şekil 4.1.1. MKH'ler çeşitli fetal, neonatal ve yetişkin dokulardan izole edilebilir ve farklı hücre tiplerine dönüşebilir..... | 7 |
| Şekil 4.1.1.1.1. Kemik iliği aspirasyonu cerrahi tekniği..... | 10 |
| Şekil 4.2.2.1. Mezenkimal kök hücrelerin (MKH'ler) <i>in vitro</i> farklılaşmasının şematik süreci..... | 25 |
| Şekil 5.2.1. Mezenkimal kök hücrelerin büyüme faktörleri ile nöronlara farklılaştırılması..... | 32 |
| Şekil 5.4.1. cDNA reaksiyonu..... | 36 |
| Şekil 5.4.2. β III Tübülün PCR reaksiyonu..... | 38 |
| Şekil 5.4.3. NSE PCR reaksiyonu..... | 38 |
| Şekil 5.4.4. GAPDH PCR reaksiyonu..... | 39 |
| Şekil 5.4.5. NF PCR reaksiyonu..... | 39 |
| Şekil 5.4.6. Nestin PCR reaksiyonu..... | 40 |
| Şekil 6.1.1. Sağlıklı donörün kemik iliği stromasından (donör-1, yaş=4) izole edilmiş hücreler, tipik iMKH fenotipi gösterir..... | 54 |
| Şekil 6.1.2. iMKH hücre hattı iMKH fenotipi gösterir..... | 56 |
| Şekil 6.2.1. iMKH hücre hattının nöronal indüksiyonunun şematik gösterimi..... | 57 |
| Şekil 6.2.2. Sağlıklı donörlerin kemik iliğinden izole edilmiş iMKH'lerin nöronal indüksiyonunun şematik gösterimi..... | 57 |
| Şekil 6.3.1. Uzun vadeli iMKH-Nöronların canlılığı, Cell Titer Glo (Promega) testi kullanılarak kültürde daha fazla olgunlaşma için değerlendirildi..... | 60 |
| Şekil 6.5.1. Grafikler, donör kaynaklı ve hücre hattından türetilen iMKH-Nöron'larda nöronal indüksiyondan sonra, nöronal alt tiplendirme bakımından; sırasıyla A) iMKH donör ChAT, B) iMKH hücre hattı ChAT, C) iMKH donör TH, D) iMKH hücre hattı TH, E) iMKH donör GAD67, F) iMKH hücre hattı GAD67, G) iMKH donör DAT, H) iMKH hücre hattı DAT, I) iMKH donör VGLUT1, İ) iMKH hücre hattı VGLUT1, kontrol ve indüklenmiş, referans gen GAPDH'e göre normalize edilmiş mRNA ifadeleri için qRT-PCR sonuçlarını temsil eder..... | 63 |
| Şekil 6.6.1. iMKH hücre hatlarının nöral indüksiyondan sonra g6'da, nöronal alt tiplendirme bakımından ChAT ve TH varlığını gösteren akım sitometrisi analizi..... | 65 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No.

- Şekil 6.6.2.** iMKH hücre hattının nöronlara farklılaştırılmasını takiben g6'da, A) ChAT ve B) TH ekspresyonlarının immünsitokimya analizleri.....76
- Şekil 6.6.3.** iMKH hücre hattının nöronlara farklılaştırılmasını takiben, A) ChAT ve B) TH ekspresyonlarının zamana bağlı olarak (g0-g12) kontrol grubu ile karşılaştırılmış western blot analizleri.....78



RESİMLER LİSTESİ

Sayfa No.

| | |
|--|----|
| Resim 6.2.1. Nörit uzantıları olan nöral hücre morfolojisi, iMKH nöral indüksiyonunun 1. gününde ortaya çıkar..... | 58 |
| Resim 6.2.2. Sağlıklı donörlerden kemik iliği iMKH'si fenotipik özelliklerle iMKH-Nöron'a farklılaşmıştır..... | 59 |
| Resim 6.4.1. 12 gün boyunca nöral indüklenmiş iMKH hücre hattında β III Tübülün ve NSE RT-PCR sonuçları..... | 60 |
| Resim 6.4.2. 12 gün boyunca nöral indüklenmiş iMKH hücre hattında (A) β III Tübülün ve (B) NSE western blot sonuçları..... | 61 |
| Resim 6.4.3. Nöronal farklılaşma (g2-g12) sırasında β III Tübülün, Nestin, NSE, NF transkriptlerinin varlığına karşı indüklenmemiş iMKH'lerde (g0) yokluğu gösteren RT-PCR..... | 61 |
| Resim 6.6.1. İkincil antikor kontrolü için yapılan negatif kontrol boyaması..... | 67 |
| Resim 6.6.2. İkincil antikor kontrolü için yapılan negatif kontrol boyaması..... | 67 |
| Resim 6.6.3. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler..... | 68 |
| Resim 6.6.4. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler..... | 68 |
| Resim 6.6.5. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler..... | 69 |
| Resim 6.6.6. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler..... | 69 |
| Resim 6.6.7. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler..... | 70 |
| Resim 6.6.8. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler..... | 70 |
| Resim 6.6.9. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler..... | 71 |
| Resim 6.6.10. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler..... | 71 |

RESİMLER LİSTESİ

Sayfa No.

| | |
|---|----|
| Resim 6.6.11. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler..... | 72 |
| Resim 6.6.12. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler..... | 72 |
| Resim 6.6.13. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler..... | 73 |
| Resim 6.6.14. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler..... | 73 |
| Resim 6.6.15. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler..... | 74 |
| Resim 6.6.16. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler..... | 74 |
| Resim 6.6.17. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler..... | 75 |
| Resim 6.6.18. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler..... | 75 |
| Resim 6.6.19. iMKH hücre hattı kaynaklı iMKH-Nöron'lara ait ChAT ve TH protein ifadelerini zamana bağlı olarak (g0-g12) gösteren western blot sonuçları..... | 77 |

1. ÖZET

İNSAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN FONKSİYONEL NÖRONLARA FARKLILAŞTIRILMASI

Nöronlara farklılaşma kapasitesi ve klinik uygulanabilirliği ile mezenkimal kök hücreler, doku rejenerasyonu ve nörogelişimsel süreçleri anlamak için yürütülen çalışmalarda en önemli yetişkin kök hücre kaynağını oluşturmaktadır. İnsan mezenkimal kök hücre (iMKH) kaynaklı nöronlar üzerine yapılan çalışmalarda, nöronal aktivite büyük oranda sadece nörogelişimsel protein ekspresyonları ile gösterilmektedir. Nöropatolojik süreçlerin modellenmesi ve nöronal farklılaşma mekanizmasının incelenmesi gibi çalışmalar açısından insan nöron kültürlerinin oluşturulması önem kazanmaktadır. Dolayısıyla kültürde görülen yerleşik nöronal ağlar, aktivite yönüyle sinaptik sinyal iletim yeteneği ve fonksiyon spesifik olgunlaşma açısından da araştırılmalıdır. Buna göre, bu çalışmada, hEGF, bFGF, NGF, FGF-8, BDNF, IBMX ve B27 içeren tek adımlı bir sitokin bazlı indüksiyon protokolü ile nöronlara farklılaşan kemik iliği iMKH'lerin işlevselliği analiz edilmiştir. Hem iMKH hücre hatları hem de sağlıklı donörlerden elde edilen iMKH'lerden farklılaştırılan nöronlar, yapısal ve fonksiyonel nöronal mRNA ve proteinleri (β III Tübülin, NSE, NF ve Nestin) ifade etmiştir. Ayrıca iMKH kaynaklı nöronların (iMKH-Nöron), TH, ChAT, VGLUT1, DAT ve GAD67 gibi fonksiyona özgü proteinleri farklı düzeylerde ifade ettiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma, uygun nöronal indükleyicilerin varlığında, kemik iliği iMKH'lerinin fonksiyonel nöronlara farklılaşabildiğini ve dopaminerjik-kolinerjik nöron popülasyonları oluşturabildiğini ortaya koymuştur. Böylece, bu fonksiyonel iMKH-Nöron'larının, nöronal farklılaşma ve nöropatoloji çalışmalarında bir *in vitro* model olarak kullanılabilir nitelikte olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: fonksiyonel nöron, mezenkimal kök hücre, nöronal farklılaşma, ChAT, DAT, GAD67, TH, VGLUT1.

Bu çalışma, İstanbul Medipol Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2019-14.

2. ABSTRACT

DIFFERENTIATION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS TO FUNCTIONAL NEURONS

Mesenchymal stem cells constitute the most important source of adult stem cells in studies conducted to understand tissue regeneration and neurodevelopmental processes due to its transdifferentiation capacity and clinical applicability to neurons. In studies on human mesenchymal stem cell (hMSC) derived neurons, neuronal activity is largely demonstrated only by neurodevelopmental protein expressions. Creation of human neuron cultures gains importance in terms of studies such as modeling neuropathological processes and examining neuronal differentiation mechanisms. Therefore, established neuronal networks seen in culture should be investigated for their function-specific maturation. Accordingly, in this study, the functionality of bone marrow hMSC differentiating into neurons with a single-step cytokine-based induction protocol including hEGF, bFGF, NGF, FGF-8, BDNF, IBMX and B27 was analyzed. Neurons differentiated from iMKHs obtained from both iMKH cell lines and healthy donors expressed structural and functional neuronal mRNA and proteins (β III Tubulin, NSE, NF and Nestin). In addition, hMSC-derived neurons (hMd-Neuron) were found to express function-specific proteins such as TH, ChAT, VGLUT1, DAT and GAD67 at different levels. As a result, this study revealed that bone marrow hMSCs can differentiate into functional neurons and give rise to populations of dopaminergic-cholinergic neurons in the presence of appropriate neuronal inducers. Taken together, it has been shown that these functional hMd-Neurons can be used as an *in vitro* model in neuronal differentiation and neuropathology studies.

Keywords: functional neuron, mesenchymal stem cell, neuronal differentiation, ChAT, DAT, GAD67, TH, VGLUT1.

This work was supported by İstanbul Medipol University Scientific Research Projects Commission. Project No: 2019-14.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), osteoblastlar, kondrositler, adipositler, kas hücreleri, perisitler, retiküler fibroblastlar ve nöronlar dahil olmak üzere farklı embriyonik kökenlerden olgun hücrelere farklılaşabilen yetişkin kök hücreleridir (1–5). MKH'ler kemik iliği, yağ dokusu, amniyotik sıvı, diş pulpası, endometriyum, kas, periost, plasenta, sinoviyal sıvı ve wharton jeli içinde bulunur (6).

MKH'ler, diğer kök hücre türlerine kıyasla bazı avantajlı özelliklere sahiptir. Yetişkin dokularından kolayca izole edilebilir ve kültür ortamında çoğaltılabilir. Ayrıca, yüksek farklılaşma kapasitesi, düşük immünolojik yanıt, zayıf tümör oluşturma riski gibi özellikleri ile klinik uygulanabilirliği yüksektir (7,8).

MKH'ler, miyokardiyal enfarktüs, felç, Crohn hastalığı ve diyabet gibi çeşitli hastalıkların tedavisine odaklanan klinik çalışmalarda kullanılmaktadır (7). Ayrıca MKH'ler, merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi onarımları için incelenmiştir (9,10). Örneğin, MKH'lerden farklılaştırılmış fonksiyonel nöronlar, nörodejeneratif hastalıkları hedefleyen çalışmalarda kullanılmıştır (11,12). MKH'leri nöronlara dönüştürmek için yıllar içinde çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Bu stratejilerde kullanılan indükleyiciler genellikle dört gruba ayrılır: küçük moleküller, epigenetik modifikasyonlar, psikotropik ilaçlar ve zenginleştirilmiş ortam (kimyasal indükleyicileri olan orta kokteyller) (13–17). Alternatif olarak, nöronların MKH'lerden farklılaşması, ortak kültür koşulları, eksozomlar ve grafen substratları kullanmak gibi farklı yollar bildirilmiştir (18–24).

Kimyasal uyaranlar içeren ortamlarda MKH'lerin nöronal farklılaşma girişimleri, diğer yöntemlere kıyasla daha hızlı bir farklılaşma oranı sağlamıştır (25). Nöronal farklılaşmanın tanımlanmasında sıklıkla, morfoloji dönüşümleri ve nöronal gen ekspresyon değişimleri incelenmektedir. Ancak her nöronal indükleme metodu bire bir benzer nöronal olgunlaşma göstermediğinden kendisine özgüdür. Dolayısıyla, farklılaşmış nöronların işlevselliğinin, her yeni tanımlanan protokol için incelenmesi gereklidir (26). İnsan mezenkimal kök hücrelerden nöronların işlevselliğini değerlendirmek için, elektrofizyolojik kayıtlar ve kalsiyum görüntüleme uygulanabilir ve daha sonra gerçek nöronlarla karşılaştırılarak iMKH'ler farklılaştırılarak elde edilen

nöronların aktivite özellikleri için analiz edilebilir (14,27). Nöronal aktivite değerlendirme yöntemleri arasında, yama kelepçesi ve kalsiyum iyon taşınmasının floresan görüntülemesi, sinaptik akımları kaydetmek ve görselleştirmek için oldukça hassas tekniklerdir (14,28,29). Çoğu olgun nöron herhangi bir dış uyaran olmadan doğası gereği sinyal üretebilmektedir. Bu genellikle spontan aktivite olarak adlandırılır ve nöronlarda nöronal ağın gelişmekte olduğunu ve bunun yanı sıra hücrel özgünlük için önemli olduğunu gösterir (29). İnsan MKH'leri, birkaç yolu izleyerek nöronlara farklılaşabildiğinden (transdiferansiyasyon), iMKH'den türetilmiş nöronların klinik açıdan kullanımı için işlevsellik, nöronal farklılaşma çalışmalarında önemli hale gelmiştir (14,30–32). Sadece birkaç çalışma, insan mezenkimal kök hücresi (iMKH) kaynaklı nöronların kimyasal veya elektriksel uyarılara cevap verdiğini ve fonksiyonel olarak aktif olduğunu göstermiştir (14,33). Literatürde, iMKH nöronlarının aktivitesi ile ilgili oldukça az sayıda çalışma bulunmaktadır. Buna göre, iMKH'den türetilmiş nöronlar ile ilgili klinik değeri olabilecek çalışmalarda, bu nöronların aktivasyonu ve fonksiyonel sinaps oluşumları tanımlanmalıdır (14,34–36).

iMKH'ler transdiferansiyasyon özellikleri ile rejenerasyon tıbbi alanında, çeşitli hastalıklar için terapötik stratejiler bakımından kullanılmaktadır. iMKH'lerin multipotent farklılaşma ve plastisite kabiliyetlerinden dolayı, farklı dokulara ait çeşitli proteinleri ifade etmeleri beklenir. Dolayısıyla, iMKH-Nöron'lar, spesifik nöronal proteinleri ifade etmeleri ve nörodejeneratif hastalıklara yönelik belirli tipte nöron eldesi için potansiyel bir kök hücre kaynağı olmaları bakımından umut vaat etmektedir (14,22,37–40).

Bu çalışmada, sağlıklı donörlerden izole edilen iMKH'ler ve iMKH hücre hatları, belirli nöronal farklılaşma indükleyicilerinin bir kombinasyonunu içeren (hEGF, bFGF, NGF, FGF-8, BDNF, IBMX ve B27) besiyeri kullanılarak nöronlara farklılaştırılmıştır. Farklılaşmış iMKH'lerin β III Tübülin, NSE, NF ve Nestin nöronal belirteçleri ifade ettiği gösterilmiştir. Buna ek olarak, iMKH-Nöron'larının TH, ChAT, VGLUT1, DAT ve GAD67 gibi fonksiyona özgü proteinleri farklı seviyelerde ifade ettiği saptanmıştır. Böylece, bu çalışma ile kemik iliği iMKH'lerinin nöronlara farklılaşabildiği ve uygun nöronal indükleyiciler varlığında dopaminerjik-kolinerjik nöron popülasyonları oluşturabildiği görülmüştür. Sonuç olarak, *in vitro* yöntemle

iMKH'ler farklılaştırılarak fonksiyona özgü olarak olgunlaşabilen nöronlar elde edilmiştir. Böylece bu çalışmanın sonuçları, nöronal farklılaşma ve *in vitro* hastalık modelleme çalışmalarına kaynaklık edebilecek niteliktedir.



4. GENEL BİLGİLER

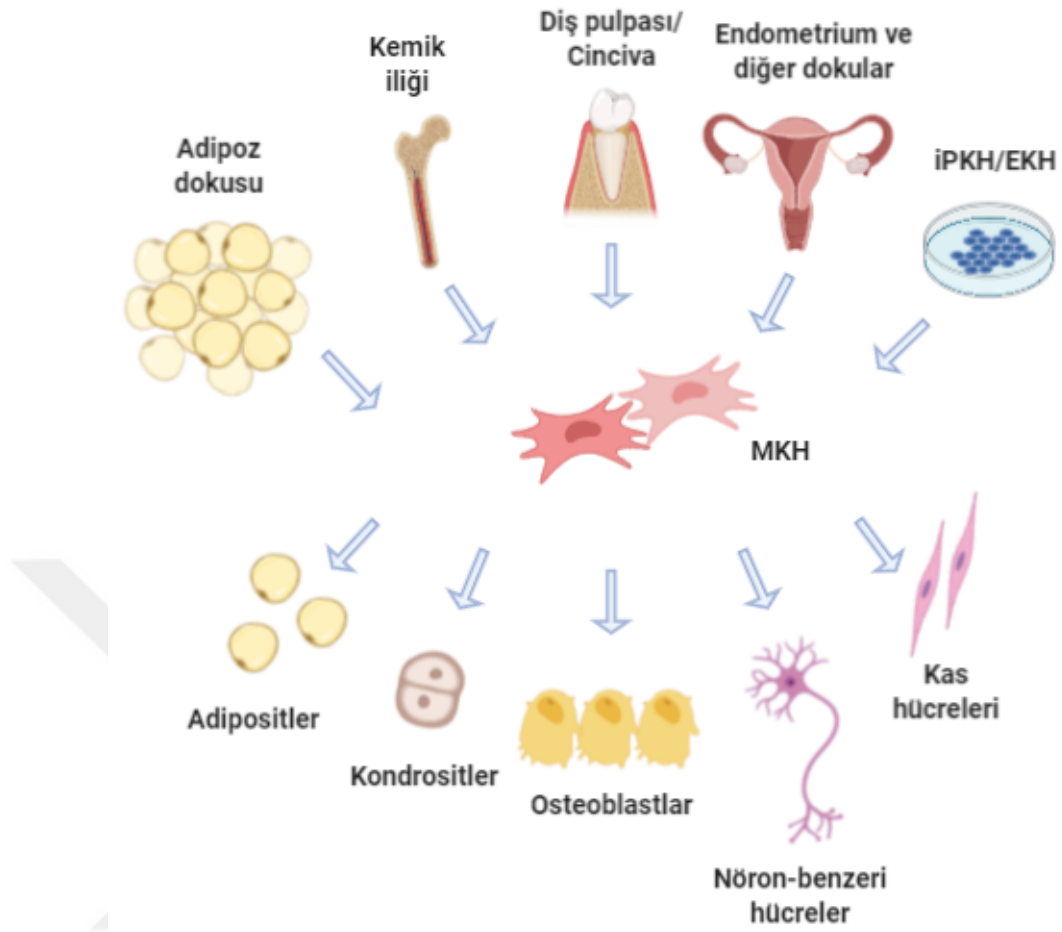
4.1. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Kök hücre biyolojisi alanı, deneysel ve klinik uygulamalara yönelik doğal potansiyelleri ile birden fazla kök hücre türünün devam eden karakterizasyonu ile gelişmeye devam etmektedir. Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), varlıkları ve *in vitro* çoğalma ve genetik manipülasyon için nispeten basit gereksinimleri nedeniyle en umut verici kök hücre türlerinden biridir (1).

MKH'ler, hücelere farklılaşma yeteneklerinden dolayı kabaca "mezenkimal" olarak veya kemik iliğinde bulunan destekleyici yapıların karmaşık dizisinden ortaya çıktıkları için "ilik stromal hücreleri" olarak tanımlanırlar.

MKH'ler ilk olarak 1966 yılında Friedenstein ve meslektaşları tarafından tanımlanmıştır. Araştırmacılar, farelerin böbrek kapsüllerine yapılan kemik iliği nakillerinin, kemik iliği hücrelerinin proliferasyonuna ek olarak kemik yapısı oluşumuna neden olduğunu bildirmiştir. Bu gözlemler, kemik iliğinin kemik yapıları oluşturabilen bir hücre popülasyonu içerdiğini göstermiştir (41). Yıllar sonra 1991'de, "mezenkimal kök hücre" terimi, bu hücrelerin kemik, kıkırdak, tendon, ligament, adipositler, dermis, kas, bağ dokusu ve kemik iliği stromasına farklılaşabildiğini gözlemleyen Caplan tarafından bulunmuştur (42). Pittenger ise insan kemik iliğinin stromal hücrelerin bir alt popülasyonu olan multipotent kök hücreler içerdiğini göstererek MKH araştırmalarını farklı bir aşamaya taşımıştır (2).

MKH'ler, genel çok potansiyelleri ve çok sayıda dokudan görece izolasyon kolaylığı nedeniyle doku mühendisliği ve terapötik uygulamalar için büyük bir çekiciliğe sahiptir (3,43). MKH'lerin potansiyel plastisitesi, kendini yenileme kapasitesi ve immünmodülasyona katılma yetenekleri, klinik doku rejenerasyonu ve tedavi stratejileri için büyük bir potansiyel sunmaktadır (7,44).



Şekil 4.1.1. MKH'ler çeşitli fetal, neonatal ve yetişkin dokulardan izole edilebilir ve farklı hücre tiplerine dönüşebilir. EKH'ler embriyonik kök hücreler, İPKH'ler indüklenen pluripotent kök hücreler, MKH'ler mezenkimal kök hücreler (45–55).

MKH'lerin en çok çalışılan ve erişilebilir kaynağı kemik iliğidir (Kİ), ancak MKH'ler karaciğer, fetal kan, kordon kanı ve amniyotik sıvı dahil olmak üzere bir dizi dokudan izole edilmiştir (5,56–61). Kemik iliğinden türetilen insan mezenkimal kök hücreleri (iMKH'ler), hücre tedavisi ve doku mühendisliği için çekici bir yetişkin kök hücre kaynağını temsil eder, çünkü iMKH'ler farklı hücre soylarına farklılaşma potansiyellerini korurken kolayca elde edilebilir ve çoğaltılabilir (62). MKH'ler kemik iliğinden izole edilebilir ve *ex vivo* olarak fenotipte herhangi bir belirgin değişiklik veya fonksiyon kaybı olmaksızın çoğaltılabilir (4).

Hematopoyetik olmayan MKH'ler ilk önce kemik iliğinden osteoblastlar, adipositler ve kondrositler gibi üç germ tabakasının üyelerine farklılaşabilen klonal, plastik yapışkan hücreler olarak tanımlanmıştır. iMKH'ler birden fazla mezenkimal kökene dönüşebilir. Soy olarak farklılaşırlar ve olgun farklılaşmış bir hücre tipine dönüşmeden önce birkaç katman ve gen ifadesinde değişiklikler içeren farklılaşma aşamalarından geçerler.

Mezenkimal kök hücre progenitörleri, insan kemik iliğinde, koloni oluşturan birim fibroblastlar (CFU-F'ler) olarak adlandırılan oluşturabilen fibroblast benzeri hücre kolonileri oluşturma yetenekleriyle tanımlanmış hücrelerdir. Bu öncüler, çok soylu farklılaşma kapasitesine sahiptir ve "stromal kök hücre hipotezini" destekler (4,63,64).

4.1.1. Kemik iliği MKH'leri

MKH'ler birçok farklı dokudan izole edilebilir. Bununla birlikte, kemik iliği, insan transplantasyonu açısından en çok kullanılan MKH kaynağını temsil eder ve basit bir prosedürle kolayca elde edilebilmektedir (65–67).

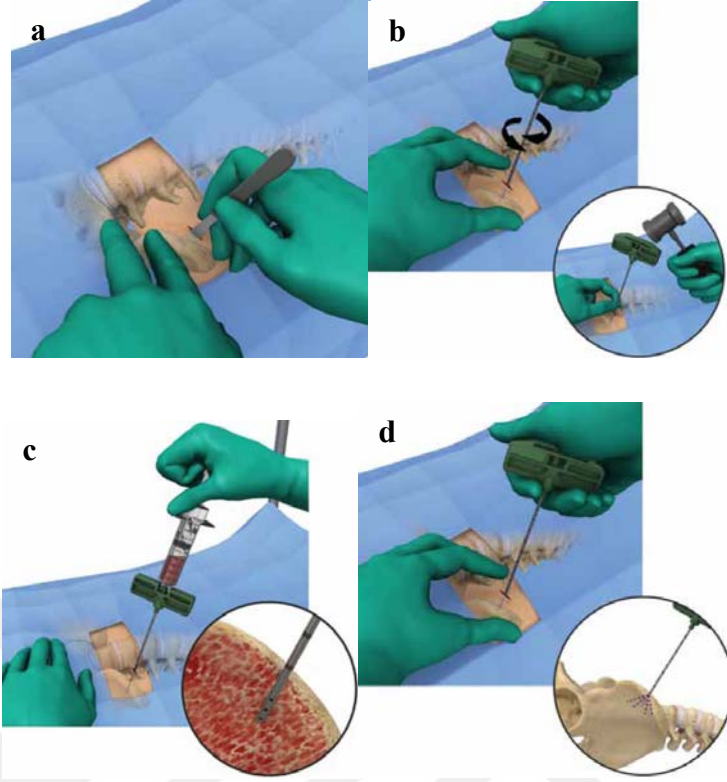
Kİ-MKH'ler önemli bir parakrin fonksiyonu ile karakterize edilir ve sekretomlarında bulunan anjiyojenik faktörler, büyüme faktörleri ve sitokinler nedeniyle terapötik anjiyojenez için klinik uygulamalarda tercih edilebilir (67–69). Kİ-MKH'ler, hasarlı dokularda fibroz, proliferasyon, apoptoz, kemotaksis, immünmodülatör ve anjiyogenez süreçleriyle ilgili çeşitli endokrin faktörleri salgılar. Bu etkilerle, Kİ-MKH'ler hasarlı bölgenin iyileşmesini, bağışıklık sisteminin yanıtını uyarabilir ve diğer hücreleri apoptozdan koruyabilir (70). Tablo 4.1.1.1 endokrin faktörlerin listesini özetlemektedir.

Tablo 4.1.1.1. Kemik iliği mezenkimal kök hücreler tarafından salgılanan endokrin faktörler.

| Salgılanan Faktörler | İşlevi |
|--|---|
| Temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) (71,72) | Hücre hayatta kalması, çoğalması ve farklılaşması |
| İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) (73) | |
| Kıvrımlı salgılanan protein-1 (SFRP1) (74) | |
| Kıvrımlı salgılanan protein-2 (SFRP2) (75) | |
| Stanniokalsin-1 (STC-1) (76) | |
| Dönüşen büyüme faktörü β (TGF- β) (72) | |
| miR-10b-5p, miR-22-3p, miR-191, miR-222, miR-21, let-7a (77) | |
| Metaloproteinaz-1 (MMP1) (72) | Hücre dışı matrisin yeniden modellenmesi |
| Metaloproteinaz 9 (MMP9) (78) | |
| Plazminojen aktivatör (PA) (72) | |
| Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) (72) | |
| Anjiyopöietinler (ANG'ler) (79) | Damarlanma |
| Fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) (71) | |
| Dönüşen büyüme faktörü β (TGF- β) (72) | |
| Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) (80) | |
| miR-132 (81) | |
| miR-222, miR-21, let-7f (77) | |
| Hepatosit büyüme faktörü (HGF) (82) | İmmünmodülatör |
| İnsan lökosit antijeni G5 (HLA-G5) (83) | |
| İndolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) (84,85) | |
| Uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) (86) | |
| İnterlökin-6 (IL-6) (87) | |
| İnterlökin-10 (IL-10) (88) | |
| Lösemi inhibe edici faktör (LIF) (89) | |
| Prostaglandin E2 (PGE2) (90) | |
| Dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β) (72,82) | |
| miR-143-3p (77) | |

4.1.1.1. İzolasyonu ve kültürü

Kİ-iMKH'ler genellikle insanlarda pelvisin üstünde iliak krestinden alınan bir kemik iliği aspiratından izole edilir (91). Teknik olarak çocuk donörlerden 5-10 ml kemik iliği aspiratı başına 176-178 milyon hücre elde etmek mümkündür (92). Yetişkin donörlerden ise, 50-375 milyon arası hücre elde edilebilmektedir (93).



Şekil 4.1.1.1.1. Kemik iliği aspirasyonu cerrahi tekniği (91)

Buna ek olarak, iMKH'ler kemik iliğinde toplam çekirdekli hücre popülasyonunun çok küçük bir kısmını (% 0.0001) temsil eder, ancak standart hücre kültürü teknikleri kullanılarak ekilebilir ve çoğaltılabilir (92).

MKH'leri kemik iliği aspiratı, kordon kanı veya periferik kandan izole etmek için numuneler, Percoll veya Ficoll gibi bir yoğunluk gradyan solüsyonunda parçalanmaya tabi tutulur, ardından hücreler 1×10^4 ile 0.4×10^6 arasında değişen yoğunluklarda kaplanır. Mononükleer izolasyon için $8/\text{cm}^2$ hücre, seçilen fetal sığır serumu içeren uygun kültür ortamında yeniden süspanse edilir ve yaklaşık 2-6 gün boyunca plastik kaplara yapışmasına izin verilir (93,94).

Kültürdeki MKH'ler fibroblastik bir morfolojiye sahiptir ve plastik kültür kaplarının yüzeyine yapışır. İzolasyon işleminden sonraki süre içinde saflaştırılmış MHK'ler elde etmek için, yapışkan olmayan hematopoietik hücrelerin karışımının kültür kaplarından çıkarılması gerekir. Birincil kültürler genellikle 12-16 gün süreyle muhafaza edilir, bu

süre zarfında hematopoietik hücre popülasyonları elenirken MKH'ler doku kültürü tabanına yapışır; bu nedenle kalan hücrelerin 2-3 hafta büyümesine izin verilir.

4.1.1.2. İmmünofenotipleme

Hücre popülasyonlarının karışımı içinde ortak bir hücre tipinin sınıflandırılması, genellikle hücre yüzey işaretlerinin araştırılmasını gerektiren FACS (Floresan Aktive Hücre Ayırma) veya MACS (Manyetik Aktive Hücre Ayırma) yöntemleriyle gerçekleştirilir. Bu yüzey molekülleri, hücre türleri arasındaki hetero ve homo-tipik etkileşimlerden çeşitli şekillerde sorumludur ve ayrıca büyüme faktörleri, sitokinler veya hücre dışı matrisler için reseptörler olarak hizmet eder.

Tipik MKH fenotipi, temel yüzey antijenlerinin ekspresyonunun geliştirilmesi ve kültür özelliklerinin belirlenmesi yoluyla dikkate alınmıştır.

Buna paralel olarak, Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT), MKH'leri tanımlamak için üç kriter bildirmiştir (95):

1. MKH'ler kültürde muhafaza edildiklerinde plastik yüzeye yapışmalıdır.
2. MKH'ler, CD73, CD90 ve CD105 gibi farklılaşma yüzey belirteçlerini ifade etmelidir. Ancak MKH'ler, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 ve insan lökosit antijeni (HLA)-DR gibi hematopoietik antijenlerin ifadesinden ve monositler, makrofajlar ve B hücreleri için belirteçlerden yoksun olmalıdır (57,95,96).
3. MKH'ler kondroblastlar, osteoblastlar ve adipositler şeklinde farklılaşabilmelidir ve bu nedenle bu hücrelerin fizyolojik koşullarda oluşturduğu tüm dokuları oluşturma potansiyeline sahip olmalıdır (95).

Farklı kökenlerden türetilen MKH'ler farklı özelliklere ve farklılaşma potansiyeline sahiptir (43,97). Dahası, farklı kaynaklardan gelen MKH'ler, çeşitli parakrin faktörlerin seviyelerinde önemli ölçüde farklılık gösterir (43).

Günümüzde, klinik çalışmalarda kullanılan en yaygın olarak bildirilen MKH kaynakları kemik iliği, yağ dokusu ve göbek kordonudur. Bu kısmen erişilebilirlik, izolasyon kolaylığı ve MKH tabanlı onarım verimliliğinden kaynaklanmaktadır.

Farklı dokulardan türetilen en yaygın araştırılan MKH'lerin özellikleri ve farklılaşma potansiyelleri Tablo 4.1.1.2.1' de özetlenmiştir.

Tablo 4.1.1.2.1. Yaygın farklı doku kaynaklı MKH'lerin özellikleri ve farklılaşma potansiyeli (43)

| Doku kaynağı | Karakter özellikleri | Farklılaşmanın potansiyeli | Referanslar |
|---------------------|--|---|--------------------|
| Adipoz dokusu | CD73, CD90, CD29, CD44, CD71, CD105, CD13, CD166, STRO-1 | Adiposit, kondrosit, osteoblast | (33,98,99) |
| Amniyotik sıvı | CD44, CD90, CD105, CD13, CD29, CD71, CD120a | Adiposit, kardiyomiyosit benzeri hücre, kondrosit, osteoblast | (100,101) |
| Kemik iliği | CD73, CD90, CD105, STRO-1 | Adiposit, tenosit, vasküler düz kas hücresi | (102–105) |
| Diş pulpası | CD29, CD44, CD90, CD105 | Adiposit, nöron benzeri hücre, odontoblast, miyojenik soylar | (106–109) |
| Endometrium | CD29, CD90, CD73, CD105 | Adiposit, kondrosit, osteoblast | (110,111) |
| Periferel kan | CD44, CD90, CD105, HLA-ABC | Adiposit, osteoblast, fibroblast | (112) |
| Plasenta | CD29, CD73, CD90, CD105 | Adiposit, kondrosit, osteoblast, miyotübüler hücre pankreas progenitör hücresi, nöron benzeri hücre, retina hücresi | (113,114) |
| Sinovyum | CD44, CD90, CD105, CD147, STRO-1 | Adiposit, kondrosit, osteoblast, iskelet kası hücresi | (98,115,116) |
| Deri | CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, SSEA-4, Vimentin | Adiposit, kondrosit, osteoblast, nöron benzeri hücre, pankreas hücresi, endotelial hücre | (117–119) |
| Göbek kordonu | CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 | Adiposit, kondrosit, osteoblast, iskelet kası hücresi, endotel hücresi, kardiyomiyosit benzeri hücre, nöron benzeri hücre | (120,121) |

4.1.1.3. Mezodermal farklılaşması

Kemik iliği MKH'lerinin mezodermal farklılaşma göstermesi iMKH karakteristiğini ortaya koymaktadır. Ancak, sadece immünofenotipleme yapılması yeterli değildir. Fibroblastlar da benzer fenotip göstermektedir.

MKH'ler, osteoblastlar, kondrositler, adipositler, tendon hücreleri gibi embriyonik mezodermden türetilen hücrelerin yanı sıra ektodermal özelliklere sahip hücrelerin özelliklerini de edinebilirler (94).

Osteojenik Farklılaşma

MKH'lerin osteogeneze indüksiyonu, en iyi *in vitro* olarak gösterilen, oldukça programlanmış bir süreçtir. Sentetik glukokortikoid deksametazon ile muamele, MKH proliferasyonunu uyarır ve osteojenik soy farklılaşmasını destekler (122,123).

Osteojenik farklılaşma, β -gliserofosfat, askorbik asit-2-fosfat, deksametazon ve FBS varlığıyla indüklenir. Bu kültür koşulları altında, hücreler alkalik fosfat, osteokalsin ve osteopontin aktivitesini ve ayrıca ECM içinde kalsiyum birikimini artırır (124).

MKH'lerin osteojenik hücre tipine farklılaşması, alkalik fosfat ekspresyonunun belirlenmesi ile değerlendirilir.

Kondrojenik Farklılaşma

Kondrojenez MKH'ler belirli koşullarda kültürlendiğinde gerçekleştirilir. Hücre kültüründe, insülin, transferrin, selenyum, linoleik asit, selenyum asit, piruvat, askorbik fosfat, deksametazon, ve TGF- β III (125) ile ayrıca ilave IGF-1 ve kemik morfogenetik proteinleri ile birlikte (BMP)-2 (126) desteklenen DMEM ile gerçekleştirilir.

MKH'lerin kondrojenik hücre tipine farklılaşması, proteoglikanların ve tip II kollajen sentezinin veya kalsiyum birikintilerinin mineralizasyonu belirlenmesi ile değerlendirilir.

Adipojenik Farklılaşma

İn vitro adipojenik indüksiyon, deksametazon, indometasin, insülin ve 3-izobütil-1-metilksantin (IBMX) dahil olmak üzere spesifik ortam takviyeleri gerektirir (127). Adipogenezin moleküler regülasyonu, adipogenik süreç (128) ve sinyal verme için çok önemli olan peroksizom proliferatör-aktive reseptör gama (PPAR- γ) dahil olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilir.

MKH'lerin adipojenik hücre tipine farklılaşması, yağ damlacıklarının belirlenmesi ile değerlendirilir.

4.1.2. Kemik iliği MKH'lerin nöronlara farklılaşması

Kemik iliği MKH'ler diğer hücre tiplerine farklılaşabilir ve hücre dışı sinyallere yanıt olarak farklılaşmamış duruma geri dönebilir (129). Kİ-MKH'ler nöronlara farklılaşabilir ve nöronlardan da geri farklılaşabilir (130). Lui vd. Kİ-MKH'lerin nörositlere indüklenmesinde ve nörositlerin, dış faktörleri ortadan kaldırarak in vitro olarak Kİ-MKH'lere dönüştürülmesinde başarılı olmuştur (130). Geri farklılaşmış olan Kİ-MKH'ler artan hücre sağ kalımı ve farklılaşma potansiyeli göstermiş, böylece indüklenmemiş Kİ-MKH'lere kıyasla sıçanlarda beyin hasarının bilmiş işlevini geliştirmiştir.

MKH'lerin *in vitro* nöral farklılaşması ile ilgili yeni çalışmalar, Sanchez-Ramos vd. (15) ve Woodbury vd. (1) tarafından 2000 yılında yapılan iki eşzamanlı çalışmadan ortaya çıkmıştır. Sıçan, fare ve insan MKH'lerinin, farklı kimyasalların veya büyüme faktörlerinin kombinasyonları ile muamesinden sonra nöral belirteçleri ifade eden nöronal morfolojiye sahip hücrelere farklılaşabileceğini bildirmişlerdir. Bu iki çalışma, MKH'lerin nöral hücrelere farklılaşma potansiyelini belirleyen ilk çalışmalardır.

Woodbury, MKH'lere DMEM içerisinde BME, DMSO ve BHA ile muamele etmiş ve hücrelerin yaklaşık % 80'inin morfolojisini değiştirdiğini gözlemlemiştir. Muamele edilen MKH'lerin, olgunlaşmamış nöral belirteç olan Nestin için 5 saat sonra pozitif

olduğu, 6 gün sonra ise negatif olduğu görülmüştür. Muameleden sonra nöral belirteçler TrkA, Tau ve NSE için çok az hücre pozitif boyanırken hiçbirinin GFAP için pozitif olmadığı görülmüştür. Sanchez-Ramos ise, MKH'lere EGF ve RA veya BDNF ile RA ile muamele etmiş ve NeuN, Nestin ve GFAP ekspresyonunu gözlemlemiştir.

4.2. Nörodejeneratif Hastalıklara Yönelik alışmalarda MKH Kaynaklı Nöronların Kullanılması

Merkezi sinir sistemi, insan vücudundaki en karmaşık ve daha az anlaşılan sistem olarak kabul edilir. Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Multipl Skleroz (MS), Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) ve Huntington hastalığı (HD) gibi merkezi sinir sistemi bozuklukları veya hastalıkları, genellikle sinir dokusunun yapılarının ve işlevlerinin bozulmasına ve geri döndürülemez şekilde bozulmasına yol açar. Hastalar genellikle bu ciddi bilişsel veya fiziksel kayıptan etkilenir (11).

Birçok nörodejeneratif hastalık, nörodejeneratif süreçlerin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Bu tür hastalıklar nöronlarda ilerleyici dejenerasyona yani nörodejenerasyona neden olur. Nörodejenerasyon, nöronların ölümleri de dahil olmak üzere aşamalı yapı veya işlev kaybıdır. Dolayısıyla, sağlıklı nöron dokusu eldesi ve buna yönelik moleküler belirteçlerin belirlenmesi, nropatolojinin modellenmesi ve anlaşılması nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde temel çalışmaları oluşturmuştur.

Bunlar arasında Alzheimer hastalığı (AD), dünya çapında yaklaşık 47 milyon insanı etkileyen en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. Yaşlanmanın, AD gelişimi için en önemli risk faktörü olduğu varsayılmaktadır. Yavaş bilişsel bozulma ve bunama ile sonuçlanan sürekli sinaptik hasar ve nöronal kayıp, hastalığın özellikleridir. AD'nin ana mikroskobik ve patolojik işaretleri, beyinde toplanan Amiloid Beta ve Tau proteini'dir (131–133). Bu plakların ve yumakların koruyucu mu yoksa nedensel mi olduğu kesin olarak bilinmemektedir. Hipokampus ve neokortekste azalan asetilkolin, asetilkolinesteraz (AChE) ve asetiltransferaz seviyeleri ve bazal n beyin kolinerjik

çekirdeklerinde (BFChN) azalmış nöron seviyeleri, hastalığın kolinerjik oluşum hipotezinin nedenleridir (16).

İkinci en yaygın nörodejeneratif hastalık olan Parkinson hastalığı (PD), şiddetli hareket bozukluğu, titreme, sertlik ve postural instabiliteye neden olmaktadır (134,135). Beyin içinde anormal alfa-sinüklein protein kümelerinin varlığı, hastalığın en önemli nöropatolojik özelliğidir. Özellikle, alfa-sinüklein kümelerinin, etkilenen nöronlar içindeki Lewy cisimciklerinde biriktiği gözlenir (136). PD'deki yürüme zorlukları, substantia nigra'daki nöronların kademeli dejenerasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu nöronların temel sorumluluğu motor aktivitelerde dengeyi sağlamak için dopamin üretmektir (137).

Genç erişkinlerde merkezi sinir sisteminin (MSS) en yaygın nörolojik bozukluklarından birisi ise Multipl Skleroz (MS)'dur (138,139). MS, aksonal kayba ve kalıcı nörolojik sakatlığa yol açan, merkezi sinir sisteminin (MSS) kronik, otoimmün, inflamatuvar, demiyelinizan bir hastalığıdır (140). Multipl Skleroz'un patolojik özelliği, merkezi sinir sistemi içinde plaklar veya lezyonlar olarak adlandırılan, değişken glioz ve enflamasyon ve göreceli aksonal koruma ile birlikte multipl fokal miyelin kaybı alanlarıdır (141). MS için mevcut tedaviler, büyük ölçüde immünomodülatör veya immünosupresif ilaçlardan oluşur ve relapsların sıklığını ve yoğunluğunu azaltmayı amaçlamaktadır (140).

Bir diğer nörodejeneratif hastalık ise Huntington hastalığı (HD) olup, otozomal dominant bir modelde miras kalan ve dördüncü kromozomun kısa kolunda bulunan Huntingtin geninin ilk eksonunda poliglütamin (CAG) tekrarları bulunduğu ortaya çıkan en yaygın monojenik nörodejeneratif hastalıktır. Bu genin içindeki mutasyon kötü protein üretimine yol açar ve sonuçta koreik hareket gibi hastalık belirtilerine ve bilişsel ve duygusal duygularda sıkıntılara neden olur. HD, hastaların çoğunda ölüme yol açar (16,142). Uygun bir geleneksel tedavinin olmaması, HD gibi nörodejeneratif hastalıkların çoğu arasında paylaşılan bir özelliktir.

Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) hastalığı ise, motor korteks, beyin sapı ve omurilikten üst ve alt motor nöronları tutan, kas denervasyonuna, kaybına ve ölüme yol açan, yetişkinlerde başlayan bir nörodejeneratif hastalıktır (143). ALS için etkili bir tedavi yoktur, ancak benzotiyazol riluzol progresyon oranını yavaşlatır ve sağkalımı üç ay uzatır (144). ALS vakalarının yaklaşık % 10'u aileseldir (fALS) ve en az 32 genetik lokustaki mutasyonlardan kaynaklanır (145–148). Sporadik ALS (sALS) vakaların % 90'ını oluşturur ve genetik etiyoloji büyük ölçüde bilinmemektedir (149). Son zamanlarda, hastadan türetilen kök hücreleri kullanan ALS hastalık modelleri, ALS'nin patogenezi ve test ilaç stratejilerini araştırmak için geliştirilmiştir (150–152).

İnsan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri, özellikle rejenerasyon tıbbi alanında, çeşitli insan hastalıkları için terapötik stratejiler açısından araştırılmıştır. Kİ-MKH'ler, klinik uygulamalarda terapötik etkileri ile birlikte kendi kendini yenileme, farklılaşma, göç etme, anti-inflamatuar ve immünmodülasyon yeteneğine sahiptir (153). Ayrıca MKH'lerin yaralanmaya yanıt olarak, apoptoz ve stres yanıtını sınırlandırarak ve yara onarımını artıran immün hücreleri toplayarak doku onarımına aracılık edebilen büyük miktarlarda biyoaktif molekül salgıladığı gösterilmiştir (76,154,155).

Bu özellikleri ile mezenkimal kök hücre uygulamaları, nörodejeneratif hastalıklara yönelik umut verici niteliktedir. MKH'ler ile nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik hem *in vitro* hem de *in vivo* tedavi yaklaşımları bulunmaktadır.

4.2.1. *In vitro* hastalık modelleme çalışmaları

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), kırkıdak, kemik, yağ hücreleri ve nöron gibi çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen multipotent hücrelerdir. Son çalışmalar, MKH'lerin epidermal büyüme faktörü (EGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF2) dahil olmak üzere büyüme faktörleri tarafından *in vitro* indüksiyonunun, bunların nöral benzeri hücrelere farklılaşmasına neden olduğunu göstermiştir. Bu kültürler ayrıca bir kolinerjik nöron belirteci olan ChAT'ı da ifade eder; ve TH, nöral hücreler için bir dopaminerjik nöron belirtecidir. Maksimum farklılaşma potansiyeline sahip

bir protokol oluşturmak için, MKH'ler FGF2, EGF, BMP-9, retinoik asit ve heparin içeren nöral indüksiyon ortamını kullanarak üç deneysel kültür koşulu altında incelenmiştir. Yağdan türetilen MKH'ler, toplam 9 günlük bir süre için >% 80 birleşikliğe ulaştıktan sonra 3 pasaj için *in vitro* olarak ekstrakte edilmiş ve çoğaltılmıştır. Hücreler daha sonra CD belirteçleri için CD44 pozitif ve CD45 negatif olarak akış sitometrisi ile karakterize edilmiştir. MKH'ler daha sonra nöral indüksiyon ortamı ile muamele edilmiş ve morfolojik değişiklikler Q-PCR ile karakterize edilmiştir. Farklılaştırılmış MKH'ler olgunlaşmamış ve olgun nöronlar için belirteçleri ifade etmiştir; β III Tübülün (TUBB3) ve MAP2, bu hücrelerin fonksiyonel nöronlara farklılaşma potansiyelini göstermektedir. MKH'lerin indüksiyonu için geliştirilmiş protokoller, nörodejeneratif hastalıklarda terapötik uygulamalar için MKH'lerin tekrar üretilebilirliğini ve standart üretimini kolaylaştırabilmekte ve sağlayabilmektedir (37).

Mezenkimal kök hücreler, nöronlara farklılaşma yeteneğine sahiptir ve bu nedenle, nöronal doku rejenerasyonu uygulamaları ve nörogelişimsel süreçleri anlamak için potansiyel yetişkin kök hücre kaynaklarından biridir. Buna göre, yapılmış olan bir çalışmada; tek adımlı sitokin bazlı indüksiyon protokolü (EGF, bFGF, NGF, FGF-8, BDNF, IBMX ve B27) ile nöronlara farklılaştırılmış Kİ-iMKH'lerin işlevselliği analiz edilmiştir. Hem iMKH hücre hatlarından hem de sağlıklı donörlerden elde edilen iMKH'lerden farklılaşan nöronlar (>% 74), spontan aktivite göstermiş ve tipik bir olgunlaşan nöron olarak elektriksel uyarıya milisaniyeler içinde yanıt göstermiştir. Yapılan immünboyamalarda yapısal ve fonksiyonel nöronal proteinlerin (Nestin, NeuN, NF, Sinaptofizin, PSD 95, PGP 9.5) pozitif ifadeleriyle nöronal farklılaşmaya ilerleyebildiği görülmüştür. Ayrıca, 12 gün nöronal farklılaşma boyunca Nestin ekspresyonları tespit edilmiş, buna karşılık çoğalan hücre işaretleyicilerinden Ki-67 ekspresyonu farklılaşma ile birlikte anlamlı derecede azalmıştır. Buna göre, nöronal indüklenmiş iMKH'ler için hücre fraksiyonlama analizi, Nestin pozitif hücrelerin neredeyse %90'ının Ki-67 ve Sox-2 için de negatif olduğunu göstermiştir, bu da mezankimal kök hücrelerin kendini yenileme ve çoğalma özelliklerini yitirmeye ancak nöronal belirteçlerin ifadesini sürdürmeye devam ettiğini dolayısıyla nöronal olgunlaşma sürecinde olduklarını göstermiştir. Bu sonuçlar, hem hücre hattı hem de kemik iliği donörlerinden indüklenen iMKH'lerin nöronal özelliklerini dikkat çekici bir şekilde ortaya koymuştur. Sonuçlar, nöronal indükleyicilerin bir

kombinasyonunun, Kİ-iMKH'lerinin spontan aktiviteye sahip yüksek verimli fonksiyonel nöronlara farklılaşma kapasitesini arttırdığını ve elektrofizyolojik olarak aktif duruma olgunlaştığını ortaya koymaktadır. Kavramsal olarak, bu işlevsel iMKH-Nöronların, nöropatolojilerin ve nöronal farklılaşma çalışmalarının hastalık modellemesi için bir araç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (14).

Parkinson hastalığı (PD) üzerine yapılan araştırmalar, α -sinükleinin hücrelerden salındığını ve hücreden hücreye aktarım yoluyla beynin bir bölgesinden diğerlerine yayıldığını göstermektedir. Prion benzeri davranışları açısından, α -sinüklein gelişimi, α -sinükleinopatilerin patogenezinde ve ilerlemesinde anahtar rol oynar. α -sinüklein ile zenginleştirilmiş modeller kullanarak, MKH'lerin, N-metil-D-aspartat reseptörleri ile etkileşimin modülasyonu yoluyla hücre dışı α -sinükleinin klatrin aracılı endositozunu bloke ederek α -sinüklein iletimini inhibe ettiğini gösterilmiştir. Bu, kortikal ve dopaminerjik nöronlar üzerinde, α -sinükleinle zenginleştirilmiş modellerde motor açıkların fonksiyonel iyileşmesiyle birlikte, sağkalım etkisine yol açmıştır. Ayrıca, MKH'lerden türetilen çözünen bir faktör olan galektin-1'in, bu modellerde kümelenmiş α -sinükleinin iletim kontrolünde önemli bir rol oynadığını belirlenmiştir. Mevcut veriler, MKH'lerin, hücre dışı α -sinüklein iletiminin inhibisyonu yoluyla nöroprotektif özellikler sergilediğini göstermiştir; bu da, MKH'lerin özelliğinin, α -sinükleinopatili deneklerde bir hastalık modifiye edici tedavi olarak hareket edebileceğini düşündürmektedir (38).

PD üzerine yapılan diğer bir çalışmada ise; bir Parkinson hücre modeli olan 1-metil-4-fenilpiridinyumiyon (MPP+) ile indüklenen PC12 hücreleri üzerinde kurkumin (CUR) ile aktive edilen insan göbek kordonu türevi mezenkimal kök hücrelerin (iGK-MKH) terapötik etkileri değerlendirilmiştir. Kurkumin uygulanan PC12 hücrelerinde, hücre çoğalması ve dopaminerjik nöronal hücrelere farklılaşma potansiyeli ve antioksidasyon gözlenmiştir. Mikrotübülle ilişkili protein-2 (MAP-2) ve dopamin sentezinde hız sınırlayıcı bir enzim olan tirozin hidroksilazın (TH) proliferasyonu artmış ve yüksek ekspresyon göstermiştir. Ayrıca sitokin tespiti, IL-6, IL-10 ve NGF ekspresyonunun, iGK-MKH-CUR ile tedavi edilen grupta diğer gruptakilerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek olduğuna dair bir ipucu vermiştir. Bu etkiler, tek başına iGK-MKH'lerin süpernatantları kullanıldığında bu kapsamda

görülmemiştir. Bu ön koştullaama, Kurkumin uygulanan MKH'lerin PD'deki terapötik uygulamalarını geliştirebilir. Bu nedenle iGK-MKH-CUR, PD hücre modelinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını teşvik etmek için potansiyel bir strateji olabilir, bu nedenle PD'de yeni bir terapötik yaklaşıma yeni bakış açıları sağlar (156) .

Başka bir çalışma ise; MKH'leri olgun dopamin salgılayan hücelere indüklemeyi ve indüksiyonu değerlendirmek için bir biyoanaliz oluşturmayı amaçlamıştır. Bu amaçla, bir TH promotörü, dopamin sentezinde hız sınırlayıcı enzim ve kırmızı floresan protein DsRed2'yi içeren bir raportör vektör oluşturulmuştur. İnsan nöroblastomunun transfeksiyonu, dopamin sentezi, SH-SY5Y hüceleri, yapılandırılmış raportör plazmidin güvenilirliğini doğrulamıştır. Transfekte iMKH'lerinin dopaminerjik farklılaşmasının ardından, akım sitometrisi kullanılarak TH eksprese eden hücelere tanımlanmıştır. Daha ileri çalışmalar, farklılaşmış hücelerin sadece TH promotörünü aktive etmekle kalmayıp, aynı zamanda TH proteinini ifade ettiğini ve dopamin salgıladığını ortaya çıkarmıştır. Bildirilen sonuçlara göre, MKH'ler, PD dahil olmak üzere şu anda tedavi edilemeyen hastalıklar için yenilikçi tedavi vaadi sunmakta ve MKH'lerin dopaminerjik bir kadere doğru *in vitro* olarak programlanabileceğini göstermektedir (39).

Mezenkimal kök hücelere (MKH'ler), kemik iliği (Kİ), yağ dokusu (AD) ve göbek kordonu kanı (GKK) dahil olmak üzere farklı kaynaklardan elde edilir. İnsan MKH'lerinin, beyinden türetilmiş nörotrofik faktöre (BDNF) yanıt olarak γ -aminobutirik asit ((GABA)erjik nöronları) üreten nöronlara farklılaşabildiği araştırılmıştır. GABAerjik nöronal farklılaşma için bu potansiyel, farklı Kİ, AD ve GKK kaynaklarından türetilen MKH'lerde de değerlendirilmiştir. Bu amaçla Kİ-, AD- ve GKK-MKH'ler poli-D-lizin / laminin üzerinde BDNF ile kaplanmış ve BDNF'siz kültürlenen kontrol MKH'ler ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, BDNF uygulanan Kİ- ve GKK-MKH grupları, GAD67'yi kontrol MKH'lerinden daha yüksek seviyelerde ifade ederken, GAD67, BDNF ile tedavi edilen AD-MKH grubunda artış göstermemiştir. İmmünohistokimya, BDNF'ye maruz kalma, Kİ-, AD- ve GKK-MKH'lerin kontrol kültürlerine kıyasla GABA+/GABA⁺/4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)⁺ hücelerinin yüzdelerinin artmasıyla gösterildiği gibi, GABAerjik nöronal farklılaşmayı teşvik etmiştir. Özellikle, BDNF ile indüklenen GABAerjik nöronal

farklılaşmadan sonra, GABA⁺/DAPI⁺ hücreleri (%), diğer gruplara kıyasla Kİ-MKH'lerde önemli ölçüde artmıştır. Sonuç olarak, Kİ-MKH, insan MKH'lerinin GABAerjik nöronal farklılaşması için en ideal hücre kaynağı olduğu belirlenmiştir (40).

4.2.2. Kültürde elde edilen nöronlar ile *in vivo* çalışmalar

K-İMKH'ler, klinik uygulamalarda terapötik etkileri birlikte destekleyebilen kendi kendini yenileme, çok soylu farklılaşma, göç, anti-enflamatuar ve immünomodülasyon yeteneğine sahiptir. Hem otolog hem de allojenik K-İMKH'ler kök hücre tedavisinde kullanılabilir. Kİ-MKH'ler, Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Multipl Skleroz (MS) ve Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS)'dan oluşan çeşitli nörodejeneratif hastalıklara yaygın olarak uygulanmıştır.

Alzheimer hastalığı için onaylanmış ilaçlar sadece hastalığın ilerlemesini engeller ve neredeyse tüm vakalarda sakinleştirici etkilere sahiptir (16,157). AD'de kök hücre temelli tedavilerin prelinik çalışmaları değişken etkiler sergilemesine rağmen, bunlar çoğunlukla A β yükünde azalma ve A β indirgeyici enzimlerde artış ile ilişkilidir. AD'de kök hücre tedavisinden elde edilen sonuçlar tipik olarak MKH'lerin türlerine ve kaynaklarına bağlıdır.

Mezenkimal kök hücreler, terapötik etkilerini dört ana mekanizma aracılığıyla gösterirler:

- 1) dejenere nöronları restore etmek;
- 2) salgılanan faktörler yoluyla nöroproteksiyon;
- 3) hastalık gelişiminden sorumlu hücreler üzerinde immünmodülatör etkiler uygulamak; ve
- 4) endojen hücrelerin proliferasyonu (158).

İnsan Kİ-MKH'leri, serumda ve oksidatif strese IL-1, IL-2, TNF- α ve IFN- γ 'yı azaltmıştır, bu da anti-inflamasyon potansiyeli ve amiloid β 1-42 genlerinin ekspresyonunun düzenlenmesini göstermiştir ve böylece Alzheimer hastalığındaki

semptomları iyileştirmiştir (159). İyileşme etkileri, anti-inflamasyon ve nörogenez özellikleri indüklemek için Kİ-MKH'lerin uygulanmasından sonra sıçan intraserebral kanamasında görülmüştür (160). Bununla birlikte, Kİ-MKH'lerin terapötik etkileri hala araştırılmaktadır ve gelecekteki sonuçlar, Kİ-MKH'leri klinikte yaygın olarak uygulamak için daha iyi kanıtlar sağlayabilir.

Parkinson hastalığına yönelik tedavilerin çoğu beyindeki dopaminin restorasyonu ile ilgilidir, ancak bu tedavilerin çok fazla yan etkisi araştırmacıları alternatif terapötik ajanlar aramaya itmiştir. Ümit verici bir hedef, hastalığın iyileştirilmesi ve tedavisinde rejeneratif tıbbın, özellikle kök hücrelerin kullanılmasıdır (134,137).

MKH'lerin farklı koşullar ve maddelerle ön muamelesi, MKH'lerin terapötik etkilerini artırabilir. Bu yöntem PD tedavisinde de harika sonuçlar göstermiştir. Nöral farklılaşma sürecinde MKH'lerin hipoksik ön koşullandırılması (%3 O₂ tedavisi) HIF-1 α , P38 MAPK ve fosforile ERK ekspresyonunda bir artışa neden olmuştur. Genetik profilindeki bu değişiklikler, artan nörosfer üretimi, dopaminerjik nöronal farklılaşmanın yanı sıra nöronal hücrelerin artan farklılaşmasıyla sonuçlanmıştır. Hipoksik ön koşullandırma tarafından üretilen nöronlar, uzun süreli hayatta kalma sergiler ve sıradan nöronlardan daha terapötik olabilir (22).

Mezenkimal kök hücreler, α -sinüklein iletiminin engellenmesinde önemli bir rol oynar. MKH'ler bunu, N-metil-D-aspartat reseptörleri ile etkileşim ve α -sinüklein endositozunun inhibisyonu yoluyla yapar. Araştırmalar, salgılanan "galektin-1" faktörünün, α -sinükleinin iletiminin kontrolünde önemli bir rolü olduğunu göstermiştir (38,161).

Parkinson hastalığında, Kİ-MKH'ler hasarlı nöronları yeniden oluşturma yeteneğine sahiptir (162,163). Dahası, Kİ-MKH'ler dopamin taşıyıcı bağlanma aktivitesini geliştirebilir, bu da dopaminerjik nöronların iyileşmesi ve korunmasıyla sonuçlanır (164). PD hastalarında Kİ-MKH'ler kullanılırken birkaç klinik çalışma yapılmıştır (NCT02611167, NCT01446614, NCT00976430). Tamamlanan çalışmalar, PD

hastalarında 36 aylık Kİ-MKH transplantasyonundan sonra herhangi bir yan etki olmaksızın iyileşme göstermiştir (162).

Parkinson hastalığına yönelik başka bir çalışmada ise, ortalama hastalık süreleri $14,7 \pm 7,56$ yıl arasında değişen 22-62 yaş aralığındaki 7 hasta, otolog kemik iliğinden türetilen mezenkimal kök hücrelerin tek dozlu, tek taraflı transplantasyonunun prospektif, kontrolsüz, pilot çalışmasına katılmıştır. Kİ-MKH'ler, stereotaksik cerrahi ile sublater ventriküler bölgeye transplante edilmiştir. Hastalar 10 ile 36 ay arasında değişen bir süre takip edilmiştir. Birleşik Parkinson Hastalığı Derecelendirme Ölçeği'ne (UPDRS) göre, ortalama "kapalı" puanı $65 \pm 22,06$ ve ortalama "açık" puanı $50,6 \pm 15,85$ olarak belirlenmiştir. Çalışmada, yedi hastadan üçü, UPDRS'ne göre "kapalı" / "açık" durumlarında sürekli bir iyileşme göstermiştir. Son takiplerinde, ortalama "kapalı" skor 43,3 olarak belirlenmiştir ve başlangıca göre %22,9 artmıştır. Son takipte "açık" ortalama puan %38 iyileşme ile 31,7 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, yüz ifadesi, yürüme ve donma gibi semptomlarda öznel bir iyileşme bulunmuştur; uygulama iki hastanın ilaç dozajının önemli ölçüde düşmesini sağlamıştır (165).

Benzer bir çalışmada ise, PD tanısından 5 ila 15 yıl sonra 8 Parkinson hastasının ve 4 Parkinson hastalığı yanında bunama gibi ilave semptomları da olan hastanın, iki taraflı olarak subventriküler bölgesine (SVZ) Kİ-MKH nakli gerçekleştirilmiştir ve 12 ay süreyle takip edilmiştir. Tedavi sonrası PD hastaları, UPDRS puanlama sisteminde "açık" dönemde %17,92 ve "kapalı" dönemde %31,21'lik oranda iyileşme göstermiştir. Takip süresince hastaların ilaç dozlarında artış olmamıştır. Öznel olarak, hastalar konuşmada netlik, semptomlardan titreme, sertlik ve donma ataklarında azalma bildirmiştir. Sonuçlara göre; hastalığın erken evrelerinde (5 yıldan az) Kİ-MKH nakledilen hastalar, daha sonraki aşamalardan (11-15 yıl) daha fazla iyileşme göstermiş ve hastalık ilerlemesi olmamıştır. Bununla birlikte, Parkinson hastalığı yanında ilave semptomları da olan hastaların, kök hücre naklinden sonra klinik durumlarında herhangi bir değişiklik görülmemiştir (166).

Multipl Skleroz hastalığına yönelik bir çalışmada; büyütülmüş ve çoğaltılmış Kİ-MKH'lerin intratekal enjeksiyonu güvenlidir ve 3-6 aylık tedavi için çalışılan 10

hastada ilerlemiş MS'deki iyileşme parametrelerini arttırmıştır (167). Başka bir çalışma, intravenöz yolla verilen Kİ-MKH'lerin, dolaylı olarak bağışıklık sistemlerini düzenleyerek ve nöronları yeniden oluşturarak nöronal hasarı sınırlandırdığını kabul etmektedir (168). Araştırma grubu, insanlarda Kİ-MKH'leri incelemeye yönelik kılavuz olan MS için tek bir intravenöz Kİ-MKH dozunun güvenilirliğini ve etkinliğini değerlendirmek için yakın zamanda protokolü yayınlamıştır (169).

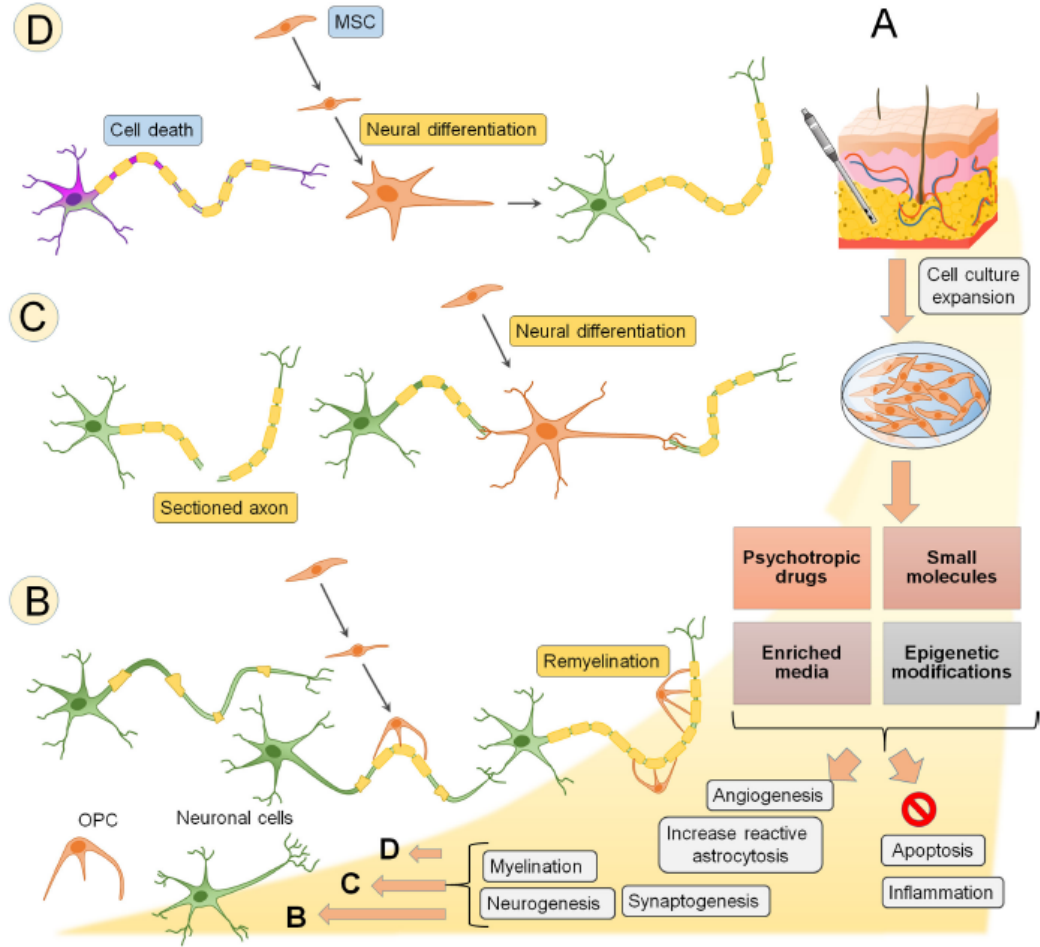
Kİ-MKH transplantasyonu, ALS hastalarında kendi kendini yenileyebilen ve nöral koruyucu özellikler göstermiştir. ALS hastalarında yapılan faz I / II klinik çalışmada Kİ-MKH'ler güvenlidir (170–172). Kİ-MKH'lerin intravenöz ve intratekal enjeksiyonu, tedavi edilen tüm hastalarda ALS Fonksiyonel “Derecelendirme Ölçeği”nde ve “Zorunlu Hayati Kapasite” yüzdesinde bir azalma göstermiştir (171).

İlaç temelli tedavilerden farklı olarak, canlı hücreleri kullanan tedaviler, tek bir hareket tarzına odaklanmak yerine, zamanla değişen bir ortama dinamik olarak yanıt verme avantajına sahiptir (173). Nörolojik yaralanmaları MKH'lerle tedavi etmek için, bu hücreler göbek kordonu (iGK-MKH'ler) (174), kemik iliği (Kİ-MKH'ler) (175), amniyotik sıvı (176) veya yağ dokusu (AD-MKH'ler) (23) gibi farklı kaynaklardan elde edilebilir.

Yaralı bölgeye implante edildikten sonra, MKH'ler aşağıdaki terapötik mekanizmaları uygulayabilir: nörotrofik faktörlerin salgılanması (177), nörogenezin indüksiyonu ve astroglial aktivasyon (178), akson büyümesi ve sinaptik bağlantıların güçlendirilmesi (179), anti-apoptotik, immünomodülatör (10,180) ve anti-inflamatuar etkiler (181), oksidatif stresin azaltılması (182,183), geniş bir biyoaktif molekül yelpazesi içeren ekzozomların salgılanması (184,185) ve nöronal süreçler ve transkripsiyon faktörleri ile ilgili çok sayıda genin ekspresyonu (186).

Genel olarak, nakledilen MKH'ler, sinir hücrelerinin hayatta kalmalarını sürelerini iyileştirmek ve farklılaşmalarını hızlandırmak amacıyla önceden in vitro olarak yeniden programlanmıştır (187,188). MKH'lerin nöronal kökene doğru in vitro yeniden programlanması dört farklı strateji ile gerçekleştirilebilir (Şekil 4.1.2.1): psikotropik ilaçlar, küçük moleküller, zenginleştirilmiş ortam ve epigenetik modifikasyonlar. Buna karşılık, diğer araştırma grupları daha önce yeniden

programlanmamış MKH'leri (189) ve hatta tedavi edilen bölgeye büyüme faktörlerinin enjeksiyonunu izlemiştir (190). Aksine, diğer araştırma grupları daha önce yeniden programlanmamış MKH'leri nakletmiştir ve hatta bunu, tedavi edilen bölgeye büyüme faktörlerinin enjeksiyonu izlemiştir.



Şekil 4.2.2.1. Mezenkimal kök hücrelerin (MKH'ler) *in vitro* farklılaşmasının şematik süreci. İlaçlar, küçük moleküller, kültür ortamının zenginleşmesi ve epigenetik değişiklikler (A) gibi farklılaşma faktörleri, MKH üzerinde reaktif astrositoz, sinaptogenez, nörogenez, miyelinasyon, apoptoz inhibisyonu ve anjiyogenez artışı gibi farklı etkiler yapar. Ek olarak, inhibisyon apoptozu ve enflamasyon da indüklenir. MKH, MKH'nin oligodendrosit progenitör hücresinin (OPC) kayıp miyelini onarmak için birleştirilmesi gereken yerleri işaretlediği remiyelinizasyonu (yani multipl skleroz) desteklemek için uygulanabilir (B). Ayrıca, MKH'ler, felçten sonra hasarlı alanların ve beyin hasarlı devrelerinin eski haline döndürülmesini sağlamak için kullanılabilir (C). Son olarak, MKH'lerin terapötik uygulaması, omurilik yaralanmasının (D) tedavisinde umut verici bir yaklaşımı temsil edebilir (13).

5. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışması süresince üzerinde çalışılan kemik iliği örnekleri İstanbul Medipol Üniversitesi, Kemik İliği Nakli Merkezi tarafından sağlanmıştır. Deneyler sırasında yaklaşık 10 hasta verici olarak kullanılmıştır. Vericiler, polikliniğe gelen ve teşhis ya da tedavi maksatlı kemik iliği veren 2-10 yaş aralığındaki sağlıklı bireylerdir. Vericiler sözlü ve yazılı olarak çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve hasta onam formu imzalatılmıştır.

Tez kapsamında kullanılan materyallere ait bilgiler Tablo 5.1’de verilmiştir.

Tablo 5.1. Tez kapsamında kullanılan materyallere ait bilgiler

| Materyal | Marka | Katalog Numarası |
|--|---------------------------|-------------------|
| Agaroz | Sigma | A9539 |
| Asetik asit | Sigma | A6283 |
| Anti-NSE | Abcam | ab53025 |
| Anti- β aktin | Cell Signaling Technology | 3700 |
| Anti- β III Tübülin | Abcam | ab18207 |
| Antikor seyreltme solüsyonu | Thermo Fisher Scientific | 003118 |
| B27 | Gibco | 17504-044 |
| BDNF | R&D | 248-BD/CF |
| Beta Merkaptotanol | Bio-Rad | 1610710 |
| bFGF | R&D | (157 aa): 234-FSE |
| BSA | BioShop | ALB001.R |
| Cam tabanlı 6 kuyucuklu plaka | NEST | 801004 |
| CD34 | Abcam | ab18227 |
| CD45 | Abcam | ab134202 |
| CD73 | Abcam | ab157335 |
| CD90 | Abcam | ab95700 |
| CD105 | Abcam | ab53321 |
| CellTiter-Glo Lüminesans Hücre Canlılığı Analiz kiti | Promega | G7573 |
| ChAT | Abcam | ab18736 |
| ChAT primer | Oligomer | |
| Clarity Western ECL Substrat | Bio-Rad | 1705061 |
| DAPI | Sigma | D9542 |
| DAT primer | Oligomer | |
| dbCAMP | Sigma | D0627 |
| DMEM-LG | Gibco | 31885023 |
| DMSO | Corning | 25-950-CQC |
| DNAz I | BioLabs | 50-814-118 |
| donkey anti-goat (DAG) IgG Alexa Fluor 568 | Abcam | ab175474 |
| EDTA disodyum tuzu | Sigma | 324503 |
| Etanol | Sigma | 8187602500 |

| | | |
|--|-----------------------------------|--------------|
| FBS | Gibco | 10082-147 |
| FGF-8 | Peptotech | 100-25 |
| Ficoll-Paque Premium | GE Healthcare | 17544202 |
| Fiksasyon tamponu | BD Biosciences | 554655 |
| FluoroDish 35 mm cam tabanlı petri | Thermo Fisher Scientific | FD35-100 |
| GAD67 primer | Oligomer | |
| GAPDH primer | Sentebio Lab | |
| GeneRuler 1 kb DNA cetveli | Thermo Scientific | SM0311 |
| Glisin | Fisher Bioreagents | BP381-500 |
| Goat anti-mouse IgG | Santa Cruz | sc2005 |
| Goat anti-rabbit IgG | Cell Signaling Technology | 7074 |
| goat anti-rabbit (GAR) IgG Alexa Fluor 555 | Thermo Fisher Scientific | A27039 |
| HCL | Sigma | 320331 |
| hEGF | Sigma | E9644 |
| High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit | Thermo Fisher Scientific | 4368814 |
| IBMX | Sigma | 15879 |
| iBlot 2 PVDF membran | Thermo Fisher Scientific | IB24001 |
| iBlot 2 %4-12 Bis-Tris jel | Thermo Fisher Scientific | NW04120BOX |
| iMKH hücre hattı (UE7T-13) | Riken BioResource Research Center | RBRC-RCB2161 |
| İzopropanol | Sigma | 1070222511 |
| Jel yükleme boyası (6X) | BioLabs | B7024S |
| Kimtech Science Precision Wipes Yumuşak Mendil | Kimberly-Clark Professional | 06-677-72 |
| L-Glutamin | Gibco | 25030-081 |
| MES SDS Yürütme Tamponu (20X) | Thermo Fisher Scientific | NP0002 |
| Metanol | Merck | 67-56-1 |
| MKH Bazal Medyum | MesenCult | 05413 |
| NaOH | Sigma | S8045 |
| Nestin primer | Sentebio Lab | |
| NF primer | Sentebio Lab | |
| NGF | Gibco | 13290-010 |
| NSE primer | Sentebio Lab | |
| Nörobazal medyum | Gibco | 21103-049 |
| Nükleaz free su | Fisher Bioreagents | BP2484-100 |
| PBS | Gibco | D1408-500ML |
| PBS tableti | Sigma | P4417-100TAB |
| Perm tamponu | BD Biosciences | 558050 |
| PFA | Sigma | 158127 |
| Precision Plus Dual Color Standarts | Bio-Rad | 1610374 |
| Protease inhibitör kokteyl tablet | Roche | 11836153001 |
| P/S | Gibco | 15140122 |
| QIAshredder (50) | Qiagen | 79654 |
| Red safe | İNtRON Biotechnology | 21141 |
| Ripa tampon | Thermo Scientific | 89900 |
| RNeasy mini kit (50) | Qiagen | 74104 |
| RNaz free su | Qiagen | 129112 |
| SensiFAST SYBR No-Rox kit | Bioline | BIO-98005 |
| Sodyum azit | Sigma | S2002 |
| TH | Abcam | ab137869 |

| | | |
|-------------------------------------|--------------------------|-----------|
| TH primer | Oligomer | |
| Trypsin/EDTA (%0.25) | Gibco | 25200056 |
| Tris-baz tozu | Sigma | T4661 |
| TrypLE ekspres enzim (1X) | Gibco | 12604013 |
| Tween 20 | Sigma | |
| Ultra Pure DEPC-treated su | Invitrogen | 10813-012 |
| VGLUT1 primer | Oligomer | |
| β III Tübülin primer | Sentebio Lab | |
| 4X Laemmli tampon | Bio-Rad | 1610747 |
| 6 kuyucuklu plaka | NEST | 703001 |
| 10 X bloklama solüsyonu | Thermo Fisher Scientific | 37520 |
| 96 kuyucuklu siyah polistiren plaka | Corning | 3603 |

5.1. Kemik İliğinden İnsan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve İmmünofenotiplenmesi

Kemik iliğinden insan mezenkimal kök hücresi (iMKH) izolasyonu için;

- 15 ml'lik santrifüj tüpüne 9 ml 1X PBS (Ca^{2+} , Mg^{2+}) fosfat tamponlu tuz çözeltisi (phosphate buffered saline) koyulup üzerine 1 ml kemik iliği numunesi eklenip hafifçe karıştırıldı.
- 10 ml'lik seyreltilmiş kemik iliği, başka bir 15 ml'lik santrifüj tüpündeki 5 ml Ficoll üzerine tüp duvarından yavaşça damla damla bırakıldı.
- Kemik iliği örneğinden iMKH'lerin izolasyonu için diferansiyel santrifüj yöntemi kullanıldı. Tüm tüpler, 4°C sıcaklığında 2500 rpm'de 25 dakika süreyle santrifüjlendi.
- Daha sonra numuneler 4 farklı katmana ayrıldı; en alttaki kırmızı tabaka kırmızı kan hücreleri içerir; bu tabakanın üstündeki renksiz sıvı Ficoll içerir; Ficoll'ün tepesinde bulunan beyaz, bulutlu tabaka, kemik iliğinde kök hücreler de dahil olmak üzere çeşitli hematopoietik hücrelerin bir bileşimi olan mononükleer hücreler içerir ve en üstteki sarı tabaka serum içerir.
- Serum kısmı atıldıktan sonra, pipet bulutlu tabaka üzerinde döndürülerek mononükleer hücre tabakası arayüzden çıkarıldı ve yeni 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Hacim DMEM-LG hücre besiyeri ile 10 ml'ye tamamlanıp, Ficoll kalıntılarını uzaklaştırmak için 4°C sıcaklığında 1800 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj yapıldı.

6. Süpernatant atılıp, hücre peleti 10 ml DMEM-LG ile süspansiyon edilip tekrar 1800 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj yapıldı. Bu kez, süpernatant atıldı ve pelet %20 FBS ve %1 P/S içeren 10 ml DMEM-LG ile süspansiyon edildi.
7. Hücre süspansiyonu, 25 cm²'lik bir hücre kültürü flaskına aktarıldı ve 37°C'lik, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.

İzolasyondan sonraki 4.-5. günün sonunda, yüzeye yapışmayan hücreler %20 FBS ve %1 P/S içeren DMEM-LG besiyeri değişimi ile atıldı ve yapışık hücreler pasaj 0 (P0) olarak isimlendirildi. İlk besiyeri değişiminden 2-3 gün sonra tekrar besiyeri değişimi yapıldı. Sağlıklı donör iMKH'leri izolasyon işleminden sonra çoğalmaya bırakıldıkları için koloniler oluşturdular. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında, daha geniş bir ortama aktarmak için pasajlama prosedürü uygulandı.

1. Besiyeri flasktan atıldı ve önceden ısıtılmış %0.25 Tripsin/EDTA solüsyonu ile hücreler 3 dakika 37°C de inkübe edildi.
2. 3 dakika sonunda hücrelerin flask yüzeyinden kalkmaya başladıkları görüldüğünde, tripsinin iki katı miktarda önceden ısıtılmış %10 FBS ve %1 P/S içeren besiyeri ile pipetaj yapılarak tripsin nötralizasyonu sağlandı.
3. Hücre süspansiyonu 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve 4°C sıcaklığında 1500 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüjlendi.
4. Süpernatant atılıp, hücre peleti %10 FBS ve %1 P/S içeren 20 ml DMEM-LG ile süspansiyon edilip, 75 cm²'lik bir hücre kültürü kabına aktarıldı ve 37°C'lik, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.

iMKH'lerin alt kültürü 6-7 günde bir hücrelerin çoğalma ortamı genişletilerek gerçekleştirildi. Hücrelerin alt kültür süreci en fazla 6. pasaja kadar devam ettirildi. Her donörden elde edilen iMKH'ler aynı sırayla işlendi ve tüm deneylerde kullanıldı.

Kültürde yetiştirilen izole edilmiş hücrelerin iMKH fenotipini doğrulamak için, pasaj 3'ten sonra hücreler akım sitometri analizine tabi tutuldu. Akım sitometrisi (FCM) FACS (Floresan Aktive Hücre Ayırma) (Bioprotect IV Güvenlik Kabini ile BD Influx Hücre Sınıflandırıcısı) sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler FlowJo (V10) yazılımı ile analiz edildi.

İzole edilmiş iMKH'lerinin immünofenotipleme, aşağıdaki insan antijenlerine karşı antikorlar ile gerçekleştirildi: CD34, CD44, CD45, CD73, CD90 ve CD105.

1. Kültür ortamında 1 adet 75 cm²'lik hücre kültürü kabında bulunan pasaj 3'teki iMKH'lere pasajlama prosedürü uygulandıktan sonra, hücre peleti kullanılacak antikor sayısına göre; CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105 ve boyanmamış olmak üzere 9 ml %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM-LG ile süspanse edildi.
2. Ardından her bir propilen akım sitometrisi tüpüne 1 ml olacak şekilde dağıtıldı. Tüpler 4°C sıcaklığında 2500 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüjlendi.
3. Süpernatant atılıp, her tüpteki hücre peleti 100 µl 1X PBS (Ca⁺, Mg⁺) ile süspanse edildi.
4. Karanlık ortamda, boyanmamış hariç diğer tüplere 5 µl antikor eklendi. Antikorlar eklendikten sonra tüpler folyolanıp 4°C sıcaklıkta 1 saat boyunca inkübe edildi.
5. 1 saat sonunda her tüpe 1 ml 1X PBS (Ca⁺, Mg⁺) eklendi ve pipetaj yapıldı.
6. Tüpler 4°C sıcaklığında 2500 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüjlendi.
7. Süpernatant atılıp, her tüpteki hücre peletine 500 µl 1X PBS (Ca⁺, Mg⁺) eklendi ve pelet süspanse edildi.
8. Hücre analizi yapılmadan önce her tüpe 5 µl DNaz eklendi.
9. Tüpler buz içerisinde analize götürüldü.

Tez çalışması süresince kullanılan iMKH hücre hatları (UE7T-13 hücreleri, no. RBRC-RCB2161; RIKEN, Japonya) da fenotipik doğrulama için ayrı prosedüre tabi tutuldu ve iMKH fenotipi gösterdikleri doğrulandı. iMKH hücre hatlarının immünofenotipleme, aşağıdaki insan antijenlerine karşı antikorlar ile gerçekleştirildi: CD34, CD44, CD45, CD73, CD90 ve CD105.

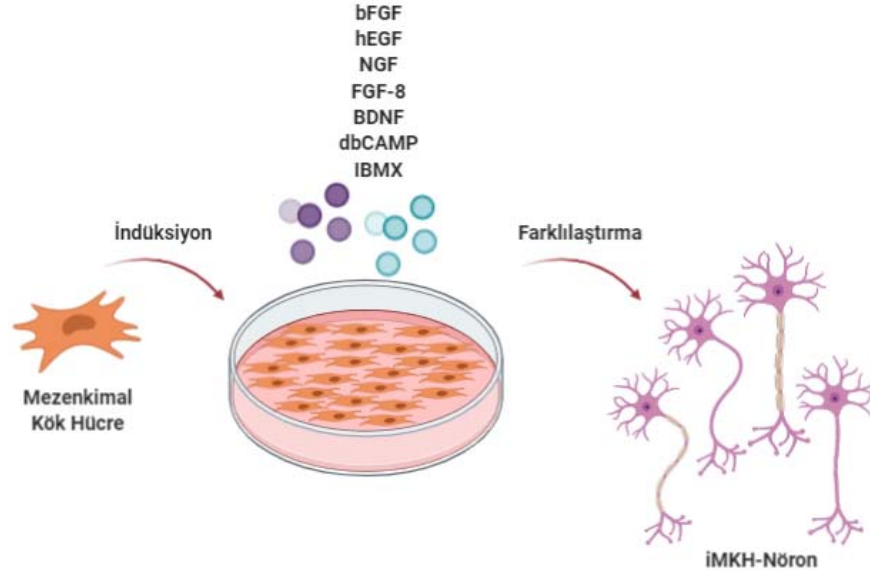
5.2. İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerin Nöronlara Farklılaştırılması

Nöronal farklılaşma deneyleri için iMKH hücre hatları ve 5 farklı sağlıklı donörden izole edilen iMKH'leri kullanıldı. İzolasyon sonrasında pasaj 3'e gelen iMKH'ler ve iMKH hücre hatları nöronal indüksiyondan önce cam tabanlı kültür petrilere ekildi. Hücre yoğunluğu $1-1.5 \times 10^3$ 'e optimize edildi. Hücrelerin kültürü %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM-LG ile yapıldı ve 24 saat boyunca 37°C 'lik, %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildiler.

Nöronal indüksiyon (Nİ) besiyeri;

- 20 ng / ml hEGF,
- 40 ng / ml bFGF,
- 10 ng / ml FGF-8,
- 40 ng / ml NGF,
- 10 ng / ml BDNF,
- 0.125 mM dbcAMP,
- 0.5 mM IBMX,
- 2 mM L-Glutamin,
- 1X B27
- %1 P/S

içeren serumsuz nörobazal medyum ile hazırlandı. 24 saatin sonunda Nİ besiyeri ile değişim yapıldı. Daha sonra hücrelerin besiyeri, farklılaşma işlemi boyunca her 48 saatte bir Nİ besiyeri ile değiştirildi. Buna uygun olarak iMKH'lerden farklılaştırılan nöronlar, farklı zaman aralıklarında (G0, G2, G6, G12, G18 ve G21) qRT-PCR, RT-PCR, immünfloresan boyama, akım sitometrisi, WB, hücre canlılığı ve kalsiyum boyama deneyleri için kullanıldı.



Şekil 5.2.1. Mezenkimal kök hücrelerin büyüme faktörleri ile nöronlara farklılaştırılması

5.3. Nöronlara İndüklenen İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerde Hücre Canlılığının Analiz Edilmesi

Nöronlara indüklenen iMKH'ler üzerinde hücre canlılığının analizi için CellTiter-Glo lüminesans hücre canlılık analiz kiti kullanıldı.

1. 3 farklı donöre ait iMKH'ler 96 kuyucuklu plakalara ekildi. Hücre yoğunluğu 6×10^3 'e optimize edildi.
2. G0, G2, G6, G12, G18 ve G21 için 6 ayrı plakaya, her donör hücrelerinden 3'er kuyucuk olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler, kuyucukta 100 μ l besiyeri içeriği olacak şekilde %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM-LG ile kuyucuklara ekildi ve 24 saat boyunca 37°C'lik, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildiler.
3. 24 saat inkübasyonun ardından, Nİ besiyeri ile değişim yapıldı. iMKH'ler belirlenen süreler (G0, G2, G6, G12, G18 ve G21) boyunca; Nİ besiyeri ile muamele edildi. Her 48 saatte bir besiyeri değişimi yapılarak, belirlenen zaman aralıkları sonunda deney sonlandırıldı.

4. CellTiter-Glo substratı ve CellTiter-Glo tamponu birbiri ile karıştırılıp CellTiter-Glo reaktifi hazırlandı.
5. Analiz için karanlık ortamda her kuyucuğa 4 µl CellTiter-Glo reaktifi eklendi ve plaka folyolandı.
6. Plaka 5 dakika boyunca 25 rpm' da çalkalayıcıda bekletildi.
7. Ardından SpectraMax i3 cihazında lüminesans okutma yapıldı.

5.4. İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerden Elde Edilen Nöronların Fenotipik Doğrulaması

Nöronların fenotipik doğrulaması için, nöronal proteinlere ait mRNA düzeyleri tersine transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile gösterildi.

RT-PCR deneyi için; iMKH hücre hatları ve donör kaynaklı iMKH'ler cam tabanlı 6 kuyucuklu plakalara, her kuyucukta $1-1.5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM-LG ile ekildi ve ertesine güne kadar 37°C'lik, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Ertesi gün; G0 hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı. G2, G6 ve G12 hücrelerinin besiyeri ise, N1 besiyeri ile değiştirildi. Farklılaşma işlemi boyunca her 48 saatte bir değişim yapıldı. Buna uygun olarak iMKH'lerden farklılaştırılan nöronlardan, farklı zaman aralıklarında (G2, G6 ve G12) RNA izolasyonu yapıldı.

RNA izolasyonu için;

1. İlk olarak 1:1 oranında RNase free dH₂O ile %70'lik etanol hazırlandı.
2. Qiagen RNeasy mini kiti ait RLT buffer ilk kez açıldığında, içine 10 µl BME eklendi.
3. Bir strafor kutusuna eğimli olacak şekilde buz dolduruldu.
4. 4°C sıcaklığındaki 1X PBS (Ca⁺, Mg⁺) buza koyuldu.
5. 1.5 ml'lik tüpler isimlendirildi ve buza alındı.
6. Hücrelerin bulunduğu plaka buz üzerine alındı.

7. Kuyucuklardaki besiyeri dikkatlice çekilip atıldı.
8. 2 kere 1 ml 1X PBS ile hafifçe yıkama yapıldı.
9. PBS dikkatlice çekilip atıldı.
10. Her kuyucuğa 300 µl RLT lizis tamponu eklendi.
11. Kazıyıcı ile weller kazındı.
12. Toplanan sıvı, steril 1.5 ml'lik tüpe aktarılır.
13. Sıvı berrak hale gelene kadar karıştırıcıda karıştırıldı.
14. Tüm sıvı 2 ml'lik QIAshredder mor toplama tüpüne aktarıldı.
15. 12000 G'de 4°C'de 2 dakika santrifüj yapıldı.
16. Santrifüj sonunda mor tüpün altında kalan tüm sıvı alındı ve steril 1.5 ml'lik bir tüpe aktarıldı.
17. Sıvının üstüne 300 µl %70'lik etanol eklendi ve karıştırıcı karıştırıldı.
18. Tüm sıvı 2 ml'lik RNase pembe toplama tüpüne aktarıldı.
19. 12000 G'de 4°C'de 15 saniye santrifüj yapıldı.
20. Tüpün altında toplanan sıvı atıldı.
21. Filtreye 350 µl RW1 tamponu koyuldu.
22. 12000 G'de 4°C'de 15 saniye santrifüj yapıldı.
23. Tüpün altındaki sıvı atıldı.
24. Steril bir tüpe 90 µl DNaz reaksiyon tamponu (1X) ve 10 µl DNaz koyuldu.
25. Bu 100 µl'lik karışım filtreye koyuldu.
26. Tüp 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
27. 15 dakika sonunda pembe tüpün altından toplanan sıvı döküldü.
28. Filtreye 350 µl RW1 tamponu koyuldu.
29. 12000 G'de 4°C'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
30. Tüpün altında toplanan sıvı atıldı.
31. 500 µl RPE tamponu koyuldu.
32. 12000 G'de 4°C'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
33. Tüpün altında toplanan sıvı atıldı.
34. Filtreye 350 µl RW1 tamponu koyuldu.
35. 12000 G'de 4°C'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
36. Tüpün altında toplanan sıvı atıldı.
37. 500 µl RPE tamponu koyuldu.

38. 12000 G'de 4°C'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
39. Tüpün altında toplanan sıvı atıldı.
40. 12000 G'de 4°C'de 2 dakika santrifüj yapıldı.
41. Tüpün altındaki sıvı atıldı.
42. 12000 G'de 4°C'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
43. Filtre yeni bir toplama tüpüne takıldı.
44. 30 µl RNase free dH₂O filtrenin merkezine damlatıldı.
45. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
46. 12000 G'de 4°C'de 2 dakika santrifüj yapıldı.
47. Santrifüj sonunda tüpün dibinde toplanan sıvı artık RNA içermektedir.
48. Konsantrasyon ölçümü için bir miktar RNA ayrıldı.
49. Ana stok -80°C'ye kaldırıldı.

Konsantrasyon ölçümü için;

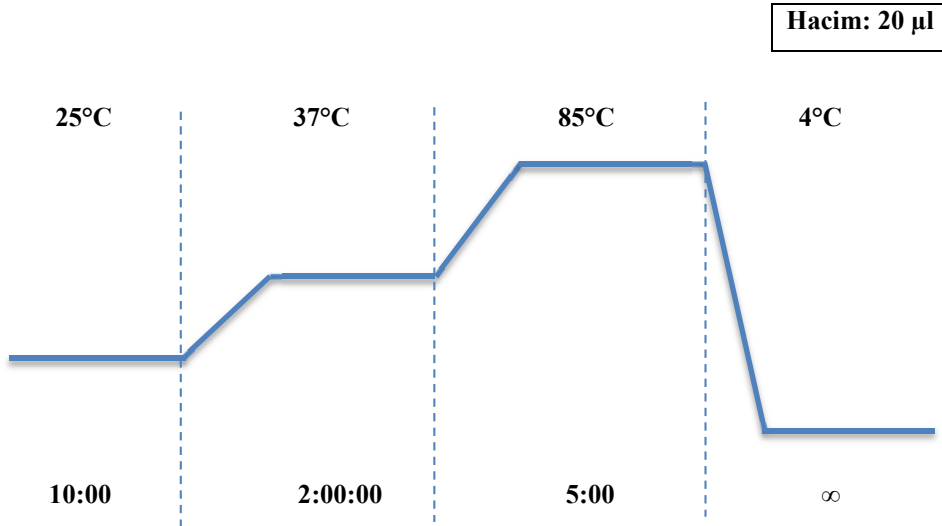
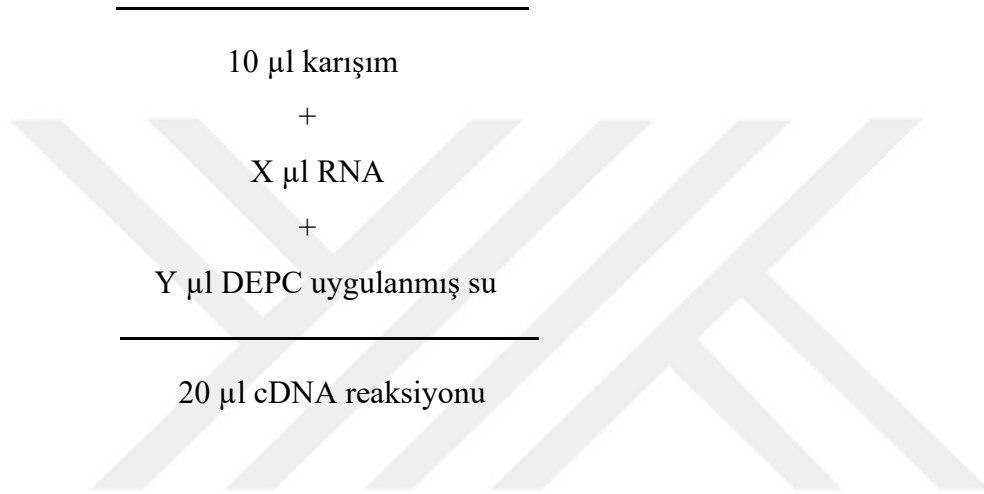
1. NanoDrop One spektrofotometre cihazından RNA (ng/µl) sekmesi seçildi.
2. Cihazın alt ölçüm kaidesi dH₂O ve yumuşak mendil ile temizlendi.
3. İlk olarak boş (blank) olarak 1 µl RNase free dH₂O tanıtıldı.
4. Alt ölçüm kaidesi yumuşak mendil ile temizlendi.
5. RNA çok yavaşça pipetlendikten sonra 1 µl alınıp alt ölçüm kaidesine koyuldu, ölçüm yapıldı.
6. Ard arda 3 kere aynı örnekle ölçüm yapıldı. Her ölçüm arasında kaide yumuşak mendil ile temizlendi.
7. 3 ölçüm değeri toplandı ve ortalamaları alınarak RNA konsantrasyon değeri belirlendi.

cDNA izolasyonu için;

1. 1000 ng konsantrasyondaki RNA'dan 1 µl alacak şekilde, konsantrasyonları ölçülen RNA'lardan kullanılacak miktarlar belirlendi.
2. Bir straför kutusuna buz dolduruldu.

3. Bir tüpte RNA örneği, RNA içermeyen kit karışımı ve DEPC uygulanmış su içeren cDNA reaksiyon örneği hazırlandı.

- 2 µl 10X RT Tampon
- 0.8 µl 25X dNTP karışımı
- 2 µl 10X RT Random Primerler
- 1 µl Tersine Transkriptaz
- 4.2 µl DEPC uygulanmış su



Şekil 5.4.1. cDNA reaksiyonu

PCR reaksiyonu için;

1. Bir strafor kutusuna buz dolduruldu.
2. Toz haldeki primerler, ürüne ait bilgilerde belirtilen miktarda nükleaz içermeyen dH₂O ile çözdürüldü ve 100 mM konsantrasyonda ana stok hazırlandı. Ardından nükleaz içermeyen dH₂O ile 1:10 dilüsyon yapılarak 10 mM konsantrasyonda PCR koşullarına uygun primerler hazırlandı.
3. iMKH hücre hatları için β III Tübülin, NSE ve GAPDH, donör kaynaklı iMKH'ler için β III Tübülin, NSE, NF, Nestin ve GAPDH primerleri kullanıldı.

➤ β III Tübülin 317 bp;

F: 5'-AGTGATGAGCATGGCATCGA-3'

R: 5'-AGGCAGTCGCAGTTTTTCACA-3'

➤ NSE 254 bp;

F: 5'-CCCACTGATCCTTCCCGATACAT-3'

R: 5'-CCGATCTGGTTGACCTTGAGCA-3'

➤ NF 284 bp;

F: 5'- TCCTACTACACCAGCCATGT-3'

R: 5'-TCCCCAGCACCTTCAACTTT-3'

➤ Nestin 148 bp;

F: 5'-TGGCTCAGAGGAAGAGTCTGA-3'

R: 5'-TCCCCATTTACATGCTGTGA-3'

➤ GAPDH 245 bp;

F: 5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3'

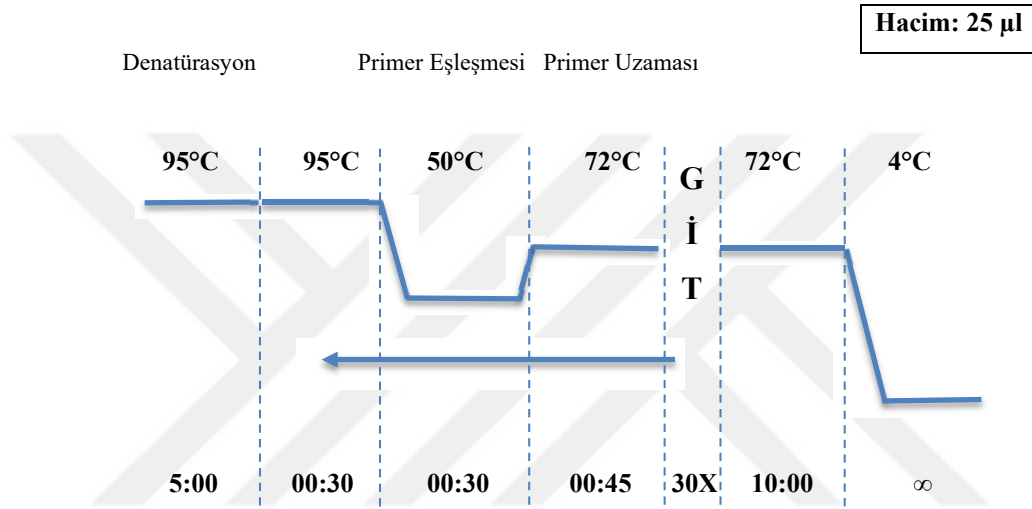
R: 5'-TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3'

4. 1000 ng konsantrasyondaki RNA'dan elde edilmiş olan cDNA'dan 1 μ l alındı.
5. Bir tüpte cDNA örneği, cDNA içermeyen kit karışımı ve DEPC uygulanmış su içeren PCR örneği hazırlandı:

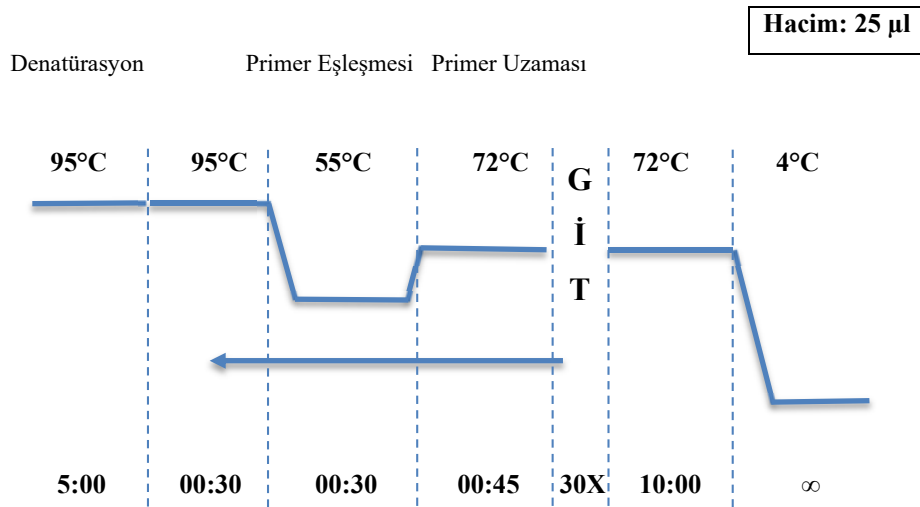
- 1 μ l cDNA
- 5 μ l 5X Q5 Reaksiyonu tamponu
- 5 μ l 5X Q5 Yüksek GC güçlendirici

- 0.25 µl Q5 Polimeraz
- 0.5 µl 10mM dNTP karışımı
- 1.25 µl 10µM F
- 1.25 µl 10µM 1R
- 10.75 µl DEPC uygulanmış su

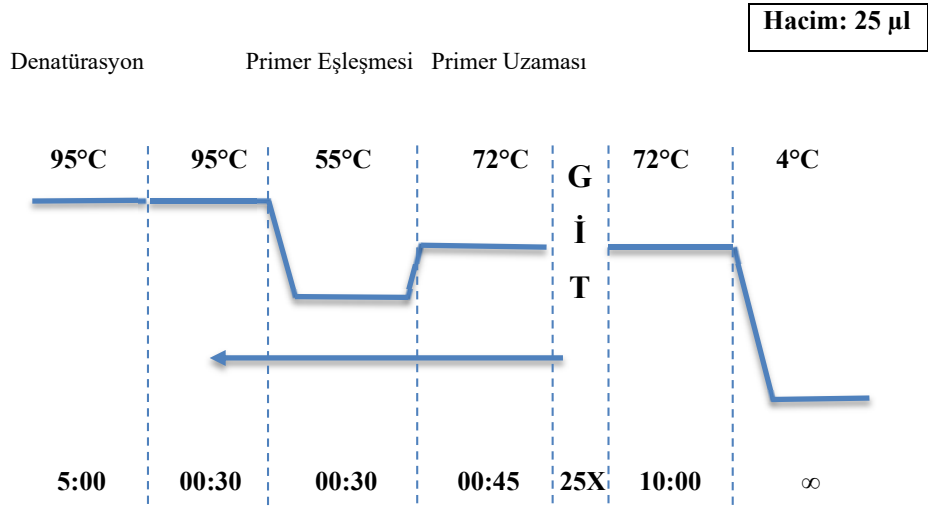
25 µl PCR reaksiyonu



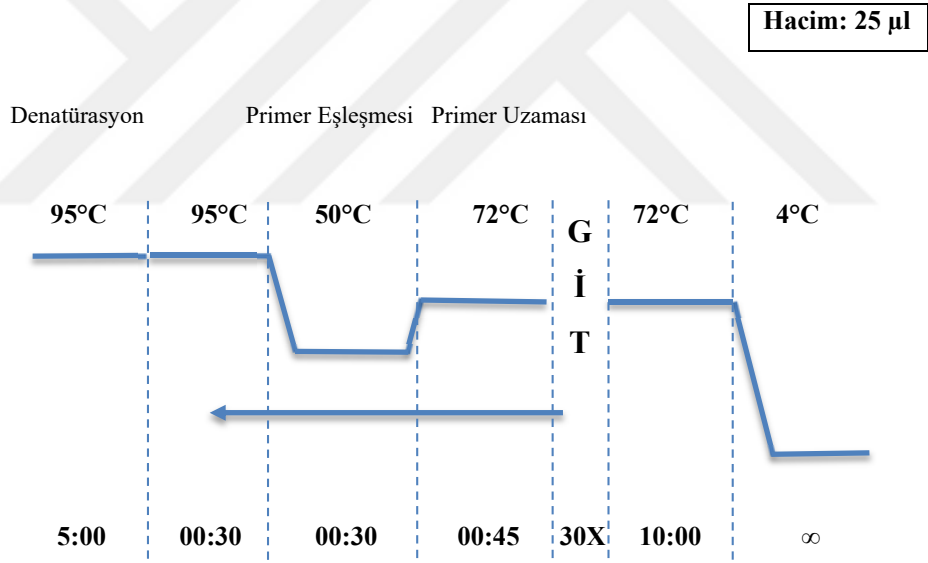
Şekil 5.4.2. βIII Tübülün PCR reaksiyonu



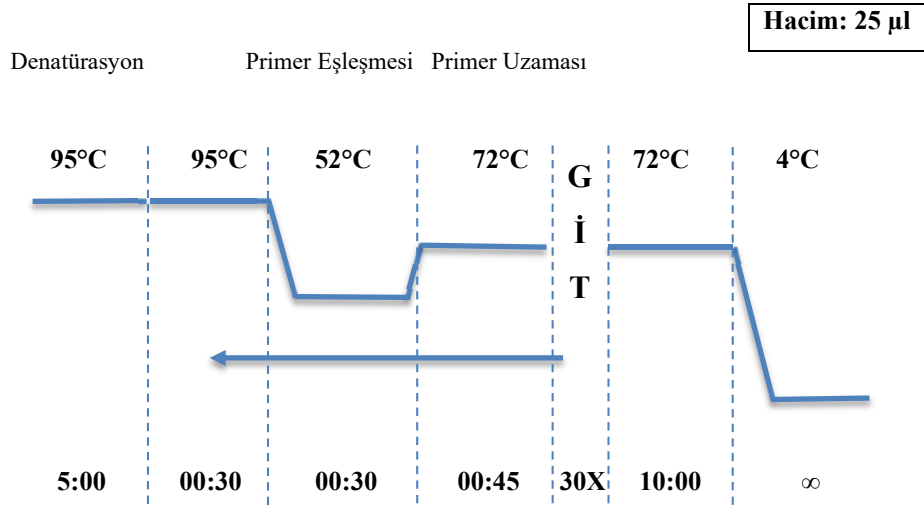
Şekil 5.4.3. NSE PCR reaksiyonu



Şekil 5.4.4. GAPDH PCR reaksiyonu



Şekil 5.4.5. NF PCR reaksiyonu



Şekil 5.4.6. Nestin PCR reaksiyonu

Reaksiyonlar tamamlandıktan sonra agaroz jelde yürütme kısmına geçildi. Öncelikle solüsyonlar hazırlandı.

500 ml için EDTA solüsyonu için;

- 93.05 g of EDTA disodyum tuzu tartıldı (MA=372.24 g/mol).
- 400 ml dH₂O içinde çözdürüldü.
- NaOH peletleri ile pH 8 olarak ayarlandı.
- dH₂O ile hacim 500 ml'ye tamamlandı.
- Solüsyon otoklavlandı.

1 litre 50X TAE için;

- 242 g Tris-baz tozu tartıldı (MA= 121.14 g/mol)
- 700 ml dH₂O içinde çözdürüldü.
- 57.1 ml saf asetik asit ve 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) yavaşça eklendi.
- Solüsyon hacmi dH₂O ile 1 litreye tamamlandı.
- pH 8.5 olarak ayarlandı.
- Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

1 litre 1X TAE için;

- 20 ml 50X TAE ölçüldü.
- 980 ml dH₂O eklenerek hacim 1 litreye tamamlandı.

%1'lik agaroz jel hazırlandı:

1. Örnek sayısına bağlı olarak küçük veya büyük jel hazırlandı;
Küçük jel için 0.5 g agaroz tartıldı ve 50 ml 1X TAE içine aktarıldı.
Büyük jel için 1 g agaroz tartıldı ve 100 ml 1X TAE içine aktarıldı.
2. Mikrodalga fırında 3-4 dakika süre ile kaynatılarak agarozun erimesi sağlandı.
3. Jel biraz soğuduktan sonra içerisine;
Küçük jel için 2.5 µl Red-Safe eklendi, hafifçe sallanarak karışması sağlandı.
Büyük jel için 5 µl Red-Safe eklendi, hafifçe sallanarak karışması sağlandı.
4. Jel yavaşça jel tepsisine döküldü, ardından tarak jele oturtuldu.
5. Jel oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Jele yüklenecek örnekler hazırlandı:

1. 25 µl PCR örneği içerisine 5 µl yükleme boyası eklendi.
2. Jele ilk olarak 6-7 µl marker yüklendi.
3. Ardından sırasıyla 30 µl örnekler yüklendi.
4. 100 voltta örnek büyüklüğüne bağlı olarak 45-60 dakika arası yürütme yapıldı.
5. cDNA ifadeleri kemilüminesan görüntüleme sistemi ile saptandı. Bu aşamada ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad) kullanıldı.

Nöronların fenotipik doğrulaması için, nöronlara ait protein ifadeleri western blot ile gösterildi.

Western blot deneyi için; iMKH hücre hatları cam tabanlı 6 kuyucuklu plakalara, her kuyucukta $1-1.5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM-LG ile ekildi ve ertesine güne kadar 37°C'lik, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.

Ertesi gün; G0 hücreleri protein lizati elde etmek için Ripa/PIC ile toplandı. G2, G6 ve G12 hücrelerinin besiyeri ise, Nİ besiyeri ile değiştirildi. Farklılaşma işlemi boyunca her 48 saatte bir değişim yapıldı. Buna uygun olarak iMKH'lerden farklılaştırılan nöronlar, farklı zaman aralıklarında (G2, G6 ve G12) protein lizati elde etmek için Ripa/PIC ile toplandı.

Protein izolasyonu için;

1. Bir strafor kutusuna eğimli olacak şekilde buz dolduruldu.
2. 4°C sıcaklığındaki 10 ml Ripa tamponu içine 1 adet PIC tableti eklendi ve vorteks yardımıyla çözdürüldü, buza koyuldu.
3. 4°C sıcaklığındaki 1X PBS (Ca⁺, Mg⁺) buza koyuldu.
4. 1.5 ml'lik tüpler isimlendirildi ve buza alındı.
5. Bir tüpe sırasıyla 1:9 oranında BME:4X Laemmlı tampon karışımı hazırlandı.
6. Hücrelerin bulunduğu plaka buz üzerine alındı.
7. Kuyucuklardaki besiyeri dikkatlice çekilip atıldı.
8. 1 ml 1X PBS ile hafifçe yıkama yapıldı.
9. PBS dikkatlice çekilip atıldı.
10. Her kuyucuğa 30-40 µl miktarında Ripa/PIC eklendi ve hücre kazıyıcısı ile kuyucuklar kazınıp elde edilen lizat tüpe aktarıldı.
11. Elde edilen lizat 25 rpm çalkalayıcıda 20 dakika 4°C'de inkübe edildi.
12. Ardından tüp 4°C sıcaklığında 10000 G'de 5 dakika süreyle santrifüjlendi.
13. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı dikkatlice alınıp yeni bir tüpe aktarıldı ve buza alındı, pelet kısmı atıldı.
14. Protein lizatının bir kısmı konsantrasyon ölçümü için ayrı bir tüpe alındı ve -80°C'ye koyuldu.
15. Protein lizatının kalan kısmı ise SDS muamelesi için hazırlandı.
16. Bir tüpe 1:3 oranında sırasıyla BME-4X Laemmlı tampon karışımı:protein lizati koyuldu ve yavaşça pipetaj yapılarak karıştırıldı, buza alındı.
17. Kuru ısı bloğu 100°C'ye ayarlandı ve tüp 5 dakika süreyle ısıtıldı.
18. 5 dakika sonunda tüp hızlıca buza alındı ve -20°C'ye koyuldu.

19. -80°C'ye kaldırılan protein lizatı buza alındı, eridikten sonra konsantrasyon ölçümü yapıldı.

Konsantrasyon ölçümü için;

1. NanoDrop One spektrofotometre cihazından Protein (A280) ve 1 Abs (1 mg/ml) sekmeleri seçildi.
2. Cihazın alt ölçüm kaidesi dH₂O ve yumuşak mendil ile temizlendi.
3. İlk olarak boş (blank) olarak 1 µl Ripa/PIC tanıtıldı.
4. Alt ölçüm kaidesi yumuşak mendil ile temizlendi.
5. Protein lizatı iyice pipetlendikten sonra 1 µl lizat alt ölçüm kaidesine koyuldu, ölçüm yapıldı.
6. Ard arda 3 kere aynı örnekle ölçüm yapıldı. Her ölçüm arasında kaide yumuşak mendil ile temizlendi.
7. 3 ölçüm değeri toplandı ve ortalamaları alınarak protein konsantrasyon değeri belirlendi.

Western blot için;

1. Öncelikle 500 ml 10X TBST hazırlandı:
 - 44 g NaCl ve 12 g Trizma baz tartıldı.
 - 450 ml dH₂O içinde çözdürüldü.
 - pH 7.6 olarak sabitlendi.
 - Hacim dH₂O ile 500 ml'ye tamamlandı.
2. Ardından 1 litre 1X TBST hazırlandı:
 - 100 ml 10X TBST ve 900 ml dH₂O karıştırıldı.
 - 500 µl Tween 20 eklendi.
 - pH kontrol edilerek 7.6 olması sağlandı.

3. 20X MES tamponu dH₂O ile 1X'e dilüe edildi.
4. %4-12 NuPAGE Bis-Tris protein jel iBlot 2 sistemi mini jel takına yerleştirildi.
5. MES tamponu tanka dolduruldu.
6. SDS muamelesi yapılmış olan -20°C'deki protein lizatları ve 4°C'deki belirteç çıkartılıp buza alındı.
7. %4-12 Bis-Tris protein jellere belirteç ve hacimleri eşitlenen farklı konsantrasyonlardaki protein örnekleri (G0,G2,G6,G12) yüklendi.
8. Tampon içerisine 1 ml NuPAGE antioksidan eklendi.
9. iBlot-2 sistemi mini jel tank ile 160 voltta yürütme işlemi gerçekleştirildi.
10. Yürütme işlemi sonunda jel kaseti dikkatlice açıldı ve jel dH₂O içine alındı. Fazlalık kısımlar bistüri yardımı ile kesildi.
11. Transfer işlemi için iBlot-2 sistemi jel transfer cihazı kullanıldı.
12. Cihaza öncelikle alttan üste doğru sırasıyla; bakır anot, anot alt kısım, PVDF membran sandviç sistemi yerleştirildi. Membran üzerine daha önce dH₂O içine alınan jel dikkatlice yerleştirildi. Jelin üstüne dH₂O ile ıslatılmış filtre kağıdı yerleştirildi. Silindir ile üstünden geçerek hava kabarcıkları yok edildi.Üstüne katot üst kısım yerleştirildi ve tekrar silindir ile üstünden geçildi. En üste emici destek yerleştirildi ve cihazın kapağı kapatıldı.
13. Transfer işlemi, 20V ve 1.3A koşullarında 7 dakika süre ile kuru blotlama yapılarak gerçekleştirildi.
14. Transfer sonrası PVDF membran %100 metanol ile aktifleştirilip, ardından dH₂O içine alındı.
15. Anti-βIII Tübülün ve Anti-NSE birincil antikörlerine bağlı olarak, bloklama solüsyonu için %5'lik BSA hazırlandı:
 - 0.5 g BSA hassas tartıda tartıldı. Ardından 10 ml 1X TBST içine koyulup tamamen çözünene kadar karıştırıcıda karıştırıldı.
- 16.1.5-2 saat süre ile çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında bloklama işlemi yapıldı.

17. Bloklama sonrasında birincil antikorlar, dilüsyon oranına göre bloklama solüsyonunun içine eklendi.
 - Anti- β III Tubulin antikoruna 1:1000 ve Anti-NSE antikoruna 1:750 oranında eklendi.
18. Membranlar birincil antikor solüsyonu ile gece boyunca 4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
19. İnkübasyon bitiminde birincil antikor solüsyonu uzaklaştırılıp -20°C'ye alındı. Ardından 1X TBST ile 3 kere 5'er dakika çalkalayıcı üzerinde yıkama yapıldı.
20. Sonrasında ikincil antikor olarak %5 BSA ile anti-rabbit IgG, HRP-bağlı antikoruna 1:2000 oranında hazırlandı.
21. Membranlar ikincil antikor solüsyonu ile 1.5-2 saat süre ile oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
22. İkincil antikor solüsyonu uzaklaştırılıp 1X TBST ile 3 kere 5'er dakika çalkalayıcı üzerinde yıkama yapıldı.
23. Sonrasında membranlara 1:1 oranında Clarity Western ECL Substrat kiti uygulandı. Membran karanlık ortamda 5 dakika inkübe edildi.
24. Protein bantları kemilüminesan görüntüleme sistemi ile saptandı. Bu aşamada ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad) kullanıldı.
25. β -aktin bantlarını görüntülemek için öncelikle stripping tamponu hazırlandı:
 - 500 ml için; 0.2 M oranında Glisin tartıldı ve şişeye aktarıldı. 450 ml dH₂O eklenerek, şişenin içine balık atıldı ve manyetik karıştırıcıda çözünene kadar karıştırıldı. HCl ve NaOH ile pH 2.7 olarak sabitlendi.
 - Hacim dH₂O ile 500 ml'ye tamamlandı. %0.1 oranında Tween 20 eklendi. pH tekrar kontrol edilerek 2.7 olması sağlandı. Tampon 4°C'ye kaldırıldı. Kullanılacağı zaman su banyosunda ısıtılarak 55-60°C'ye getirildi.
26. Membranlar 5 dakika süreyle stripping tamponu ile muamele edildiler.
27. Ardından 1X TBST ile 1 kere 5 dakika süreyle yıkama yapıldı.
28. Anti- β aktin birincil antikoruna bağlı olarak, bloklama solüsyonu için %5'lik BSA hazırlandı.

- 29.1.5-2 saat süre ile çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında bloklama işlemi yapıldı.
30. Bloklama sonrasında birincil antikolar, dilüsyon oranına göre bloklama solüsyonunun içine eklendi.
 - Anti- β aktin antikoruna 1:1000 oranında eklendi.
31. Membranlar birincil antikor solüsyonu ile gece boyunca 4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
32. İnkübasyon bitiminde birincil antikor solüsyonu uzaklaştırılıp -20°C'ye alındı. Ardından 1X TBST ile 3 kere 5'er dakika çalkalayıcı üzerinde yıkama yapıldı.
33. Sonrasında ikincil antikor olarak %5 BSA ile goat anti-mouse IgG, HRP-bağlı antikoruna 1:2000 oranında hazırlandı.
34. Membranlar ikincil antikor solüsyonu ile 1.5-2 saat süre ile oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
35. İkincil antikor solüsyonu uzaklaştırılıp 1X TBST ile 3 kere 5'er dakika çalkalayıcı üzerinde yıkama yapıldı.
36. Sonrasında membranlara 1:1 oranında Clarity Western ECL Substrat kiti uygulandı. Membran karanlık ortamda 5 dakika inkübe edildi.
37. Protein ifadeleri kemilüminesan görüntüleme sistemi ile saptandı. Bu aşamada ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad) kullanıldı.
38. Protein ifadelerinin grafiksel analizinde Image J ve GraphPad Prism programları kullanıldı.

5.5. Fonksiyona Özgü Nöronların İncelenmesi

5.5.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

iMKH hücre hattı ve sağlıklı donör iMKH'lerinden RNA izole edildikten sonra, 1000 ng konsantrasyona sahip RNA'dan cDNA elde edildi

Kontrol, Gün 2, Gün 6 ve Gün 12 örnekleri kullanılarak, qRT-PCR analizi her örnek için üç biyolojik kopya halinde gerçekleştirildi.

Analiz sırasında kullanılan blank ve örnek reaksiyon içerikleri aşağıdaki gibidir:

| Blank reaksiyonu | Örnek reaksiyonu |
|----------------------|----------------------|
| 5 µl SYBR No-Rox | 5 µl SYBR No-Rox |
| 3 µl Nükleaz free su | 2 µl Nükleaz free su |
| 1 µl Forward primer | 1 µl Forward primer |
| 1 µl Reverse primer | 1 µl Reverse primer |
| cDNA içermez | 1 µl cDNA |

CFX Connect-Real Time System (BIO RAD) kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR reaksiyonları için. parametreler şu şekildedir:

- 95 ° C’de 2 dakika polimeraz aktivasyonu,
- 95 C’de 5 saniye denatürasyon,
- 55 C’de 10 saniye primer eşleşmesi
- 72 C’de 15 saniye primer uzaması

Deneylerde kullanılan primerlerin listesi aşağıdaki gibidir:

- GAPDH;
F: 5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3'
R: 5-TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3'
- TH
F: 5'-GCTGGACAAGTGTCATCACCTG-3'
R: 5'-CCTGTACTGGAAGGCGATCTCA-3'
- ChAT
F: 5'- GTGGCTCAGAACAGCAGCATCA-3'
R: 5'-CCTCACTGAGACGGCGGAAATT-3'
- DAT
F: 5'-CCTCAACGACACTTTTGGGACC-3'
R: 5'-AGTAGAGCAGCACGATGACCAG-3'
- GAD67
F: 5'-TGTCCAGGAAGCACCGCCATAA-3'
R: 5'-TCCTTGACGAGAATGGCAGAGC-3'

➤ VGLUT1

F: 5'-GCAAGTACATCGAGGACGCCAT-3'

R: 5'-GCCACGATGATGGCATAGACTG-3'

5.5.2. Akım sitometrisi

Ticari iMKH hücre hatları 8 tane cam tabanlı 6 kuyucuklu plakalara ekildi. 6 tanesine Nİ besiyeri ile 6 gün boyunca nöronlaştırma süreci uygulandı. Diğer 2 tanesi ise kontrol grubu iMKH'leri sadece büyüme besiyeri ile muamele edildi. iMKH-Nöron'lar ve iMKH'ler ile 6 günün ardından nöronal alt tiplendirme için akım sitometrisi deneyi yapıldı.

1. Öncelikle boyama tamponu hazırlandı:
 - 1 ml %0.9'luk sodyum azit ve 3 gr BSA karıştırılıp, 100 ml 1X PBS (Ca^+ , Mg^+) içine eklendi ve karışması sağlandı.
2. Kuyucuklardan besiyeri çekildi ve önceden ısıtılmış 1X Tryple ile hücreler 3 dakika 37°C de inkübe edildi.
3. 3 dakika sonunda boyama tamponu ile nötralizasyon sağlandı.
4. İndüklenmiş hücre süspansiyonu 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne, kontrol hücre süspansiyonu ise başka bir 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve 4°C sıcaklığında 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
5. Süpernatant atıldı. İndüklenmiş hücrelerin peleti 5 ml ve kontrol hücrelerinin peleti 5 ml 1X PBS ile süspansiyon edildi, her tüpte 1 ml olacak şekilde 5'er ayrı polipropilen tüpe aktarıldı.

| | |
|--------------------------------|--------------------------|
| 1. TH iMKH-Nöron boyanmış | 1. TH iMKH boyanmış |
| 2. TH iMKH-Nöron boyanmamış | 2. TH iMKH boyanmamış |
| 3. ChAT iMKH-Nöron boyanmış | 3. ChAT iMKH boyanmış |
| 4. ChAT iMKH-Nöron boyanmamış | 4. ChAT iMKH boyanmamış |
| 5. İkincil iMKH-Nöron boyanmış | 5. İkincil iMKH boyanmış |

6. Her tüpe 100 µl boyama tamponu eklendi, pelet yavaşça süspansiyon edildi.
7. Tüpler 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

8. 20 dakika sonunda her tüpe 1 ml boyama tamponu eklendi.
9. Tüpler 4°C sıcaklığında 2500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
10. Santrifüj sonunda tüpler ters çevrilip süpernatant süzdürüldü.
11. Ardından tüpler vorteks üzerindeyken her tüpe 100 µl soğuk perm tamponu damla damla eklendi.
12. Tüpler 30 dakika buzda inkübe edildi.
13. İnkübasyon sonrası her tüpe 1 ml boyama solüsyonu eklendi.
14. 4°C sıcaklığında 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
15. Santrifüj sonunda tüpler ters çevrilip süpernatant süzdürüldü.
16. Her tüpe 100 µl boyama tamponu eklendi ve pelet yavaşça süspanse edildi.
17. Birincil antikor koyulacak tüplere TH: 1:50 ve ChAT: 1:75 oranında 100 µl birincil antikor dilüsyonu eklenirken, boyanmayacak ve ikincil antikor koyulacak tüplere ise 100 µl boyama tamponu eklendi.
18. Tüpler folyolandı ve 45 dakika 4°C'de çalkalayıcıda inkübe edildi.
19. İnkübasyon sonrası her tüpe 1 ml soğuk 1X PBS eklendi ve pelet yavaşça süspanse edildi.
20. Ardından tüplere 1:200 oranında goat anti rabbit Alexa Fluor 555 ikincil antikor eklendi. Boyanmayacak tüplere ise 1X PBS eklendi.
21. Tüpler folyolandı ve 45 dakika 4°C'de çalkalayıcıda inkübe edildi.
22. İnkübasyon sonrası her tüpe 1 ml soğuk 1X PBS eklendi.
23. 4°C sıcaklığında 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
24. Santrifüj sonunda tüpler ters çevrilip süpernatant süzdürüldü.
25. Her tüpe 500 µl soğuk 1X PBS eklendi, pelet yavaşça süspanse edildi.
26. 4°C sıcaklığında 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
27. Santrifüj sonunda tüpler ters çevrilip süpernatant süzdürüldü.
28. Her tüpe 500 µl soğuk 1X PBS eklendi, pelet yavaşça süspanse edildi.
29. Tüplere 5 µl DNaz eklendi ve buz içerisinde analizi götürüldü.

5.5.3. İmmünfloresan boyama

Ticari iMKH hücre hatları 6 tane 35 mm'lik cam tabanlı petrilere ekildi. 3 tanesine Nİ besiyeri ile 6 gün boyunca nöronlaştırma süreci uygulandı. Diğer 3 tanesi ise kontrol

grubu iMKH'leri sadece büyüme besiyeri ile muamele edildi. iMKH-Nöron'lar ve iMKH'ler ile 6 günün ardından immünsitokimya deneyi yapıldı.

1. Tüm hücrelerin besiyeri çekildikten sonra, hücreler 500 µl 1X PBS (Ca⁺,Mg⁺) ile 1 kez yıkandı.
2. Ardından işleminden sonra 400 µl %4'lük PFA ile 15 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. İnkübasyon aşamasının bitimini takiben PFA ortamdan uzaklaştırılarak, hücreler 500 µl 1X PBS ile 2 kez yıkandı.
4. 10X bloklama solüsyonu 1X PBS ile seyreltilerek 1X hale getirildi.
5. Petrilere 400 µl 1X bloklama solüsyonu eklendi.
6. Hücreler 45 dakika boyunca oda sıcaklığında bloklama solüsyonu ile inkübe edildi.
7. 45 dakika sonra bloklama solüsyonu uzaklaştırılıp, hücreler 500 µl 1X PBS ile 2 kez yıkandı.
8. 1.5 ml'lik tüplere birincil antikor ve antikor seyreltme solüsyonu karıştırılarak birincil antikor dilüsyonları hazırlandı:
- 9.

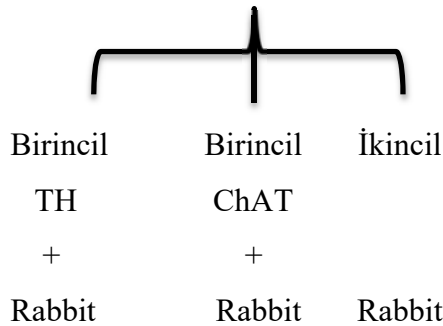
TH: 1:100

ChAT: 1:100

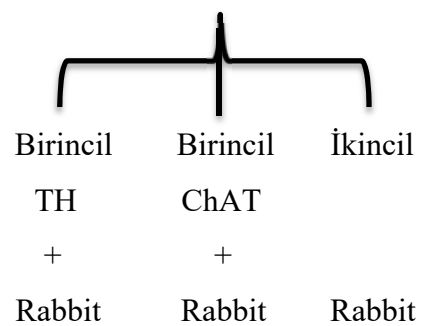
Goat Anti-Rabbit
Alexa Fluor 555
1:500

Goat Anti-Rabbit
Alexa Fluor 555
1:500

İndüklenmiş (G6)



Kontrol



10. Birincil antikor eklenecek petrilere 100 µl birincil antikor eklendi, ikincil antikor eklenecek petrilere ise bu aşamada antikor seyreltme solüsyonu eklendi.
11. Petrilere 4°C’de gece boyunca inkübe edildiler.
12. %0.2’lik Tween 20’li PBS hazırlandı: 50 ml 1X PBS içerisine 100 µl Tween 20 eklendi ve berrak hale gelene kadar karıştırıldı.
13. İnkübasyon bitiminde birincil antikor ortamdan uzaklaştırılıp, 500 µl 1X PBS ile 2 kez yıkama yapıldı.
14. 1.5 ml’lik tüplere ikincil antikor ve antikor seyreltme solüsyonu karıştırılarak ikincil antikor dilüsyonları hazırlandı.
15. 100 µl ikincil antikor eklenip, petrilere folyolanıp 3 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
16. İnkübasyon bitiminde ikincil antikor ortamdan uzaklaştırılıp, çalkalayıcı üzerinde her biri 4’er dakikalık 4 kere Tween 20’li PBS ile yıkama yapıldı.
17. Tween 20’li PBS ortamdan uzaklaştırılıp, petrilere hücre çekirdeklerinin görüntülenmesi için 200 µl DAPI solüsyonu eklenip 3 dakika çalkalayıcı üzerinde inkübe edildiler.
18. DAPI eklenmesinin ardından 1 kere Tween 20’li PBS ile yıkama yapıldı.
19. Son olarak her petriye 500 µl sodyum azit eklenip, folyolu bir şekilde hücreler görüntüleninceye kadar +4 derecede muhafaza edilecektir.
20. Sonrasında Zeiss LSM 800 Konfokal Mikroskop ile görüntüleme yapıldı.

5.5.4. Western blot

Nöronların alt tiplendirmesi için, nöronlara ait protein ifadeleri western blot ile gösterildi.

Ticari iMKH hücre hatları cam tabanlı 6 kuyucuklu plakalara, her kuyucukta $1-1.5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM-LG ile ekildi ve ertesine güne kadar 37°C’lik, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.

Ertesi gün; G0 hücreleri protein lizati elde etmek için Ripa/PIC ile toplandı. G2, G6 ve G12 hücrelerinin besiyeri ise, N1 besiyeri ile değiştirildi. Farklılaşma işlemi boyunca her 48 saatte bir değişim yapıldı. Buna uygun olarak iMKH'lerden farklılaştırılan nöronlar, farklı zaman aralıklarında (G2, G6 ve G12) protein lizati elde etmek için Ripa/PIC ile toplandı.

Materyal ve Metot bölümünde 5.5. numaralı kısımda daha önceden anlatıldığı gibi protein izolasyonu ve konsantrasyon ölçümü yapıldı. Ardından western blot yöntemine uygun şekilde örnek yükleme, yürütme ve transfer basamakları gerçekleştirildi.

1. Transfer sonrasında Anti-TH ve Anti-ChAT birincil antikorlarına bağlı olarak, bloklama solüsyonu için %5'lik BSA hazırlandı.
2. Bloklama sonrasında Anti-TH antikoruna 1:5000 ve Anti-ChAT antikoruna 1:5000 oranında bloklama solüsyonu içerisine eklendi.
3. Membranlar birincil antikor solüsyonu ile gece boyunca 4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
4. İnkübasyon bitiminden sonra 1X TBST ile yıkamalar yapıp, ikincil antikor olarak %5 BSA ile goat anti-rabbit IgG, HRP-bağlı antikoruna 1:2000 oranında hazırlandı.
5. İkincil antikor ile 1.5-2 saat süre ile oda sıcaklığında inkübe edilen membranlara, ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad) ile kemilüminesan görüntüleme işlemi uygulandı.
6. β -aktin bantlarını görüntülemek için, 5.5. numaralı kısımda daha önceden anlatıldığı gibi stripleme işlemi yapıldı.
7. Anti- β aktin birincil antikoruna bağlı olarak, bloklama solüsyonu için %5'lik BSA hazırlandı.
8. Bloklama sonrasında Anti- β aktin antikoruna 1:1000 oranında bloklama solüsyonu içerisine eklendi.
9. Membranlar birincil antikor solüsyonu ile gece boyunca 4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

10. İnkübasyon bitiminden sonra 1X TBST ile yıkamalar yapıp, ikincil antikor olarak %5 BSA ile goat anti-rabbit IgG, HRP-bağlı antikorunu 1:2000 oranında hazırlandı.
11. İkincil antikor ile 1.5-2 saat süre ile oda sıcaklığında inkübe edilen membranlara, ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad) ile kemilüminesan görüntüleme işlemi uygulandı.
12. Protein ifadelerinin grafiksel analizinde Image J ve GraphPad Prism programları kullanıldı.

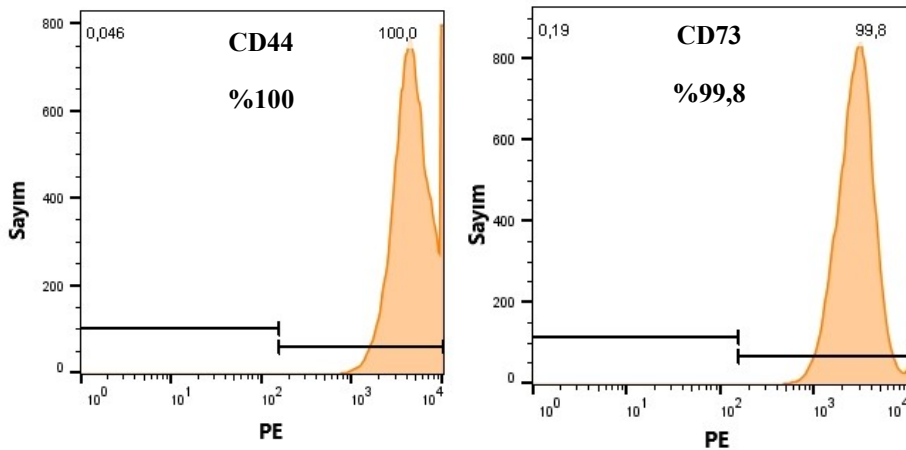
5.6. İstatistik

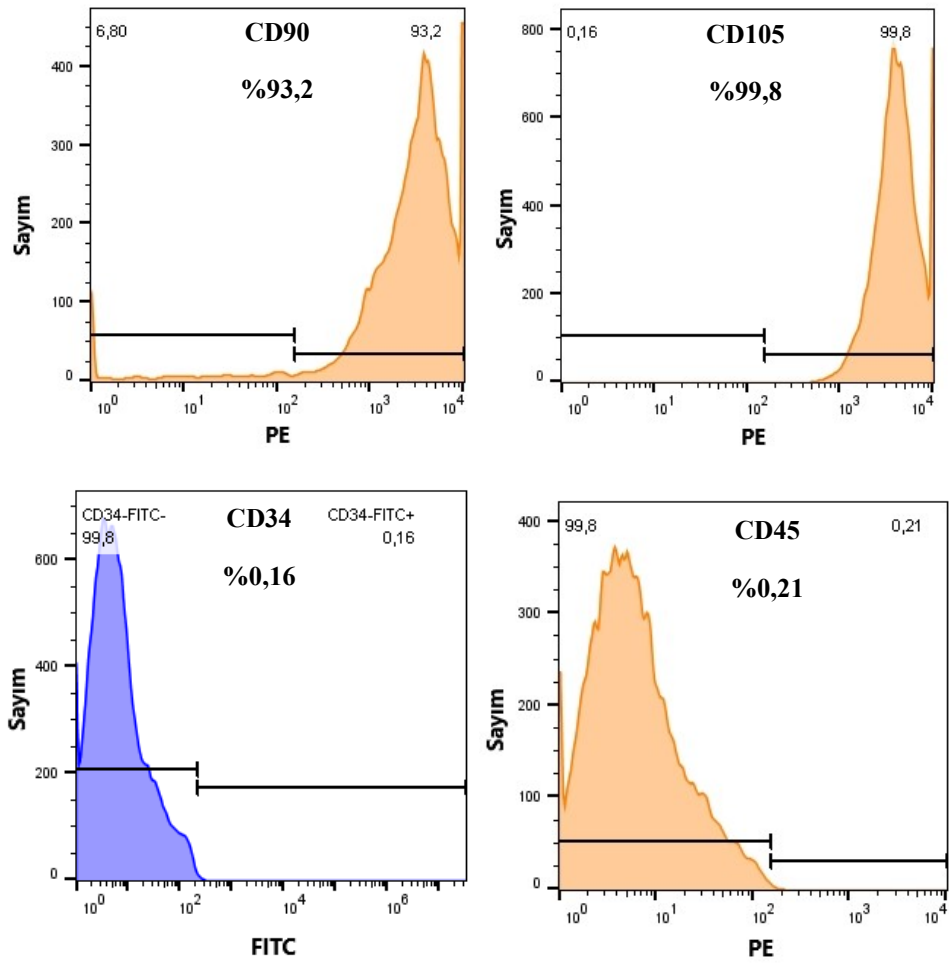
İstatistiksel analizlerde; Image J, SPSS (IBM), GraphPad Prism 8 programları ve ikili karşılaştırmalarda T test unpaired, çoklu karşılaştırmalarda ise One-way Anova testleri kullanıldı.

6. BULGULAR

6.1. Sağlıklı kemik iliği donörlerinden izole edilmiş hücreler ve insan mezenkimal kök hücre hattı mezenkimal kök hücre fenotipi gösterir

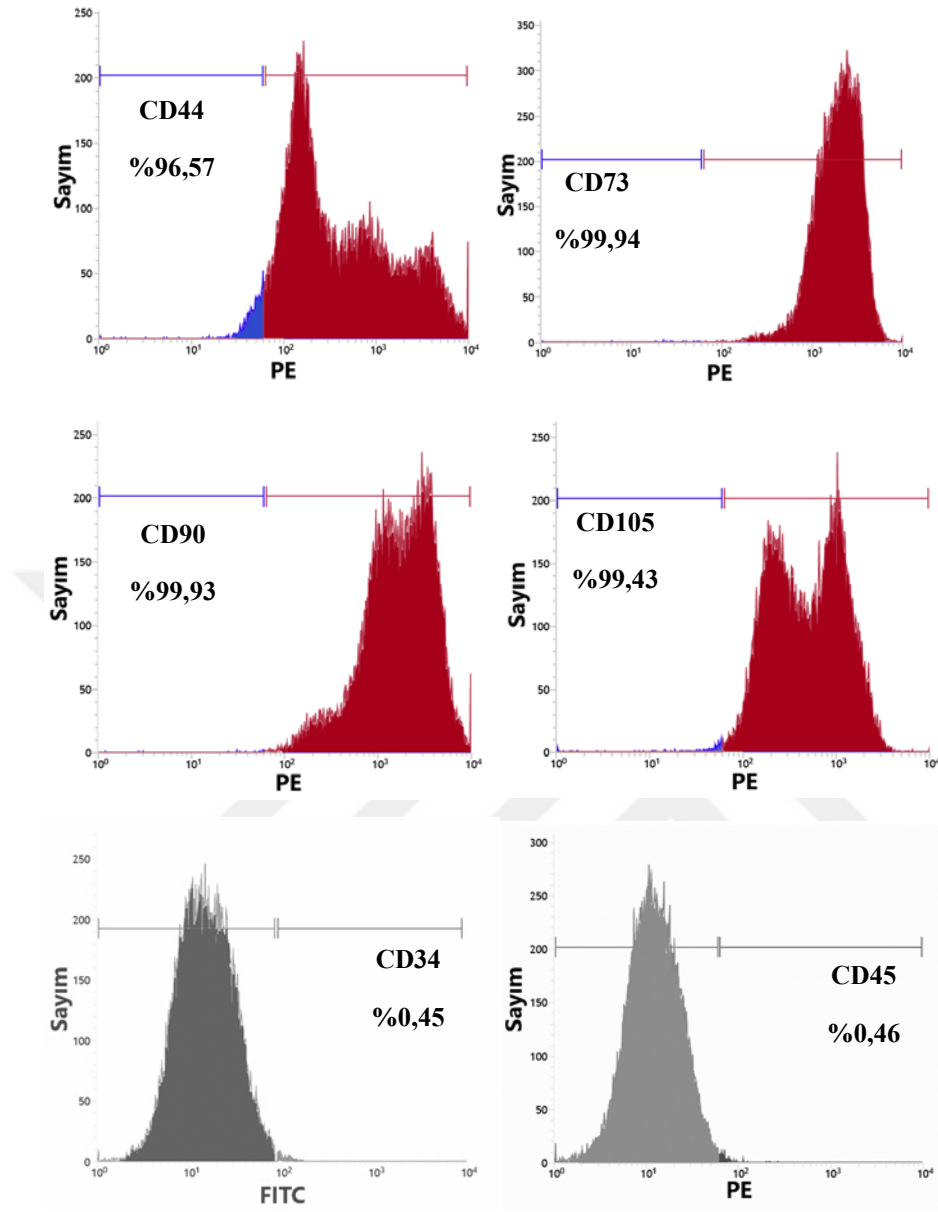
İlk olarak, insan kemik iliğinden izole edilen hücrelerin, 2006 yılında yayınlanan Uluslararası Hücresel Terapi Derneği kriterlerine (95) uygun olarak MKH'ler olduğu gösterilmiştir. Kültürün ilk aşamalarında, yapışmamış hücreler elendi ve plastik kültür yüzeyine hücrelerin çok küçük bir oranı tutundu. Bu hücreler, fibroblast benzeri bir morfolojiye sahipti, koloniler oluşturdular ve pasaj 3 (P3) olarak toplanan hücrelerin %95'inden fazlasının akım sitometri analizleri ile MKH'ler olduğu tespit edildi. Farklı sağlıklı donörlerden elde edilen sonuçlar, P3'teki bu yapışık hücrelerin; CD29, CD44, CD73, CD90 ve CD105 için pozitifken CD14, CD31, CD34 ve CD45'in negatif ekspresyonu ile iMKH immünofenotipine sahip olduğu gösterildi (Şekil 6.1.1). Akım sitometrisi FACS (Floresan Aktive Hücre Ayırma) (Bioprotect IV Güvenlik Kabini ile BD Influx Hücre Sınıflandırıcısı) sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler FlowJo (V10) yazılımı ile analiz edildi.





Şekil 6.1.1. Sağlıklı donörün kemik iliği stromasından (donör-1, yaş=4) izole edilmiş hücreler, tipik iMKH fenotipi gösterir. (A) Fenotipik karakterizasyon için akım sitometrisi ile analiz edilen hücreler; CD44, CD73, CD90 ve CD105 için pozitif ekspresyon gösterirken, CD34 ve CD45 için negatif olarak tespit edildi.

Ayrıca, iMKH hücre hattı ile de akım sitometri analizi yapılarak iMKH immünofenotipine sahip oldukları gösterildi. iMKH hücre hattı; CD44, CD73, CD90 ve CD105 için pozitifken CD34 ve CD45 için negatif ekspresyon gösterdi (Şekil 6.1.2).

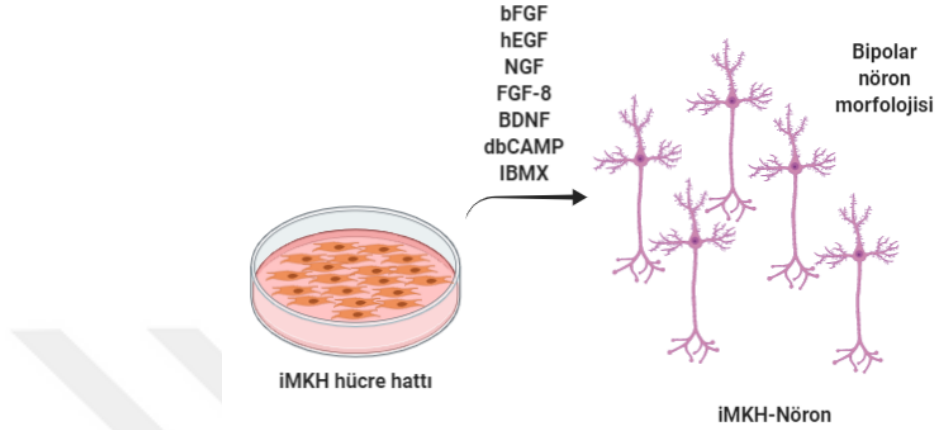


Şekil 6.1.2. iMKH hücre hattı iMKH fenotipi gösterir. (A) iMKH'ler, fenotipik karakterizasyon için akım sitometrisi ile analiz edildi. Hücreler, CD34 ve CD45 için negatif ekspresyon ile CD44, CD73, CD90 ve CD105 için pozitif ekspresyon gösterdi.

6.2. İnsan mezenkimal kök hücreleri *in vitro* olarak nöronlara farklılaşabilir

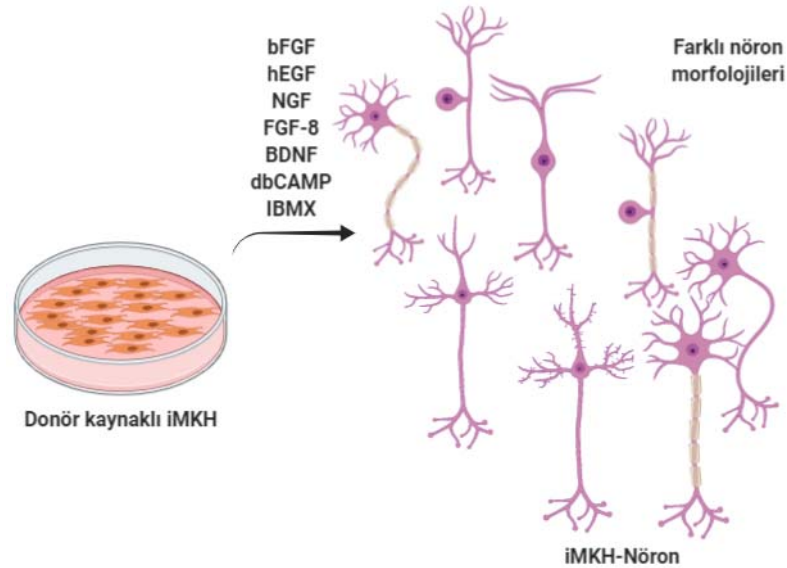
iMKH'lerin nöronal farklılaşmasını incelemek için, başlangıçta insan kemik iliği MKH hücre hattı (iMKH) kullanıldı (191–195). Yeterli farklılaşma kapasitesine sahip *in vitro* nöronal hücrelerin oluşumunu iyileştirmek için, daha önce tanımlanmış

kombinasyonun zenginleştirilmiş bir formu olan viral olmayan nöronal indüksiyon yöntemi kullanıldı (195). Nöronal hücre morfolojisi, Nİ üzerine 24 saat içinde gözlemlendi ve hemen hemen tüm iMKH hücre hatları, nöritli bipolar nöron benzeri hücrelere farklılaştı (Şekil 6.2.1).



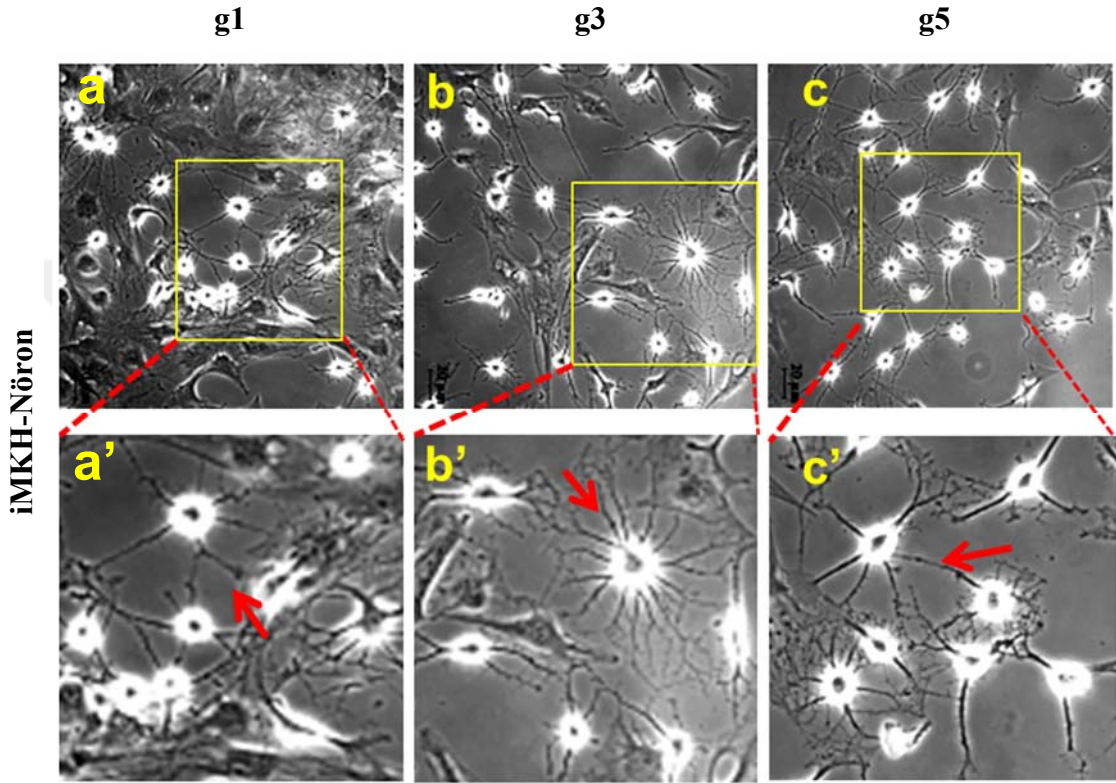
Şekil 6.2.1. iMKH hücre hattının nöronal indüksiyonunun şematik gösterimi

Kemik iliği donörlerinden nöronal indüklenmiş iMKH'lerin fenotipik/fonksiyonel karakterizasyonundan önce 12 gün süreyle Nİ korundu ve kültürdeki nöronal morfolojiler değişkendi (Şekil 6.2.2).



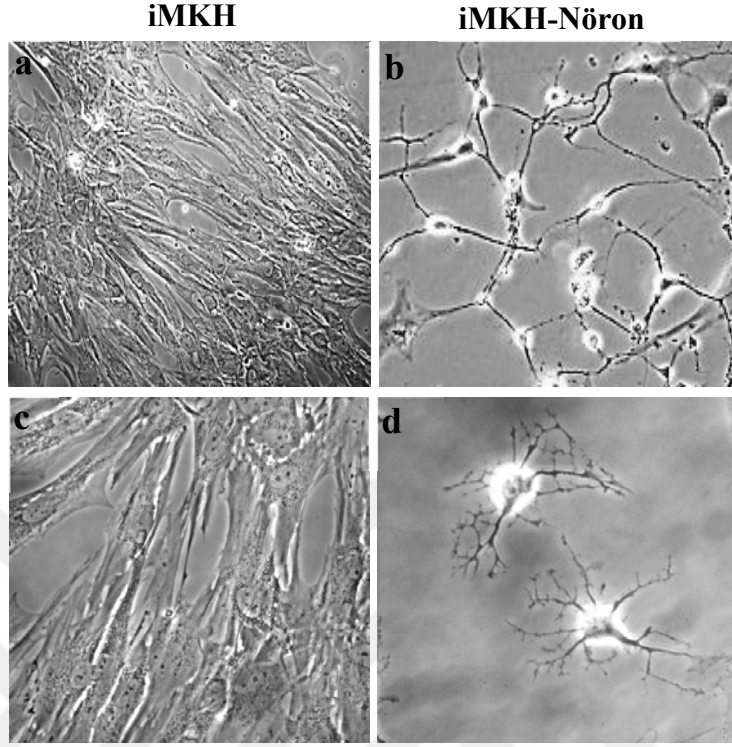
Şekil 6.2.2. Sağlıklı donörlerin kemik iliğinden izole edilmiş iMKH'lerin nöronal indüksiyonunun şematik gösterimi

Nörit uzantılarına sahip morfolojik olarak nöronal hücreler 10 farklı bağımsız alandan sayıldı ve nöronal morfoloji yüzdeleri belirlendi. Bir yandan, kemik iliği donörlerinden türetilen iMKH'ler Nİ'nin 1. gününde nöronal morfoloji (%65) gösterirken, nöronal hücre yüzdesi 3. günde %80 olarak artış gösterdi (Resim 6.2.1 a ve Resim 6.2.1 b).



Resim 6.2.1. Nörit uzantıları olan nöral hücre morfolojisi, iMKH nöral indüksiyonunun 1. gününde ortaya çıkar. (A) Parlak alan görüntüleri, kültürdeki sağlıklı kemik iliği donörlerinden g1, g3 ve g5 (a, b, c) ile iMKH-Nöron morfolojisini temsil eder. Görüntüler 10X altında alınmıştır. Kesikli kareler sırasıyla 2 kat büyütülmüştür (a', b', c'). Oklar nöritten nörite ve nöritten hücre gövdesi uç noktalarına işaret etmektedir.

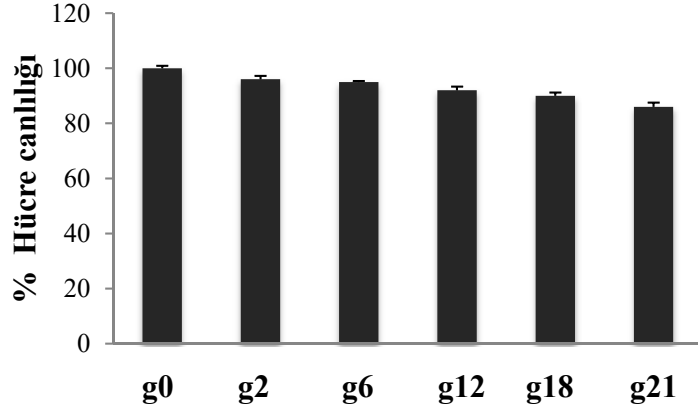
iMKH donörlerinden alınan en yüksek nöronal hücre oranı 5. Günde %85 olarak belirlendi, bu oran 12. günde %90-95'e kadar hafifçe arttı (Resim 6.2.2).



Resim 6.2.2. Sağlıklı donörlerden kemik iliği iMKH'si fenotipik özelliklerle iMKH-Nöron'a farklılaşmıştır. Parlak alan görüntüleri, indüklenmemiş iMKH proliferasyonu korurken (a, d), 12. günde kültürde morfolojik olarak nöron benzeri hücelere yol açan nöral kaynaklı insan kemik iliği donöründen türetilen iMKH'nin %80-90'ını temsil eder (b, d). İnsan örneklerinden iMKH-Nöron'un morfolojisi, nörit uzatma modellerinde görüldüğü gibi kültürde farklılık gösterir (b, d).

6.3. Nöronal indüksiyon ortamı insan mezenkimal kök hücrelerin canlılığını sürdürerek nöronlara farklılaşmasını sağlar

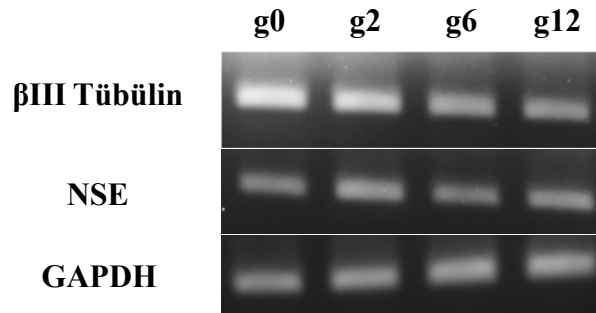
Kemik iliği donörlerinden iMKH-Nöron'ların üzerinde ileri analizler yapılmadan önce, Nİ ortamının hücre canlılığına etkisi belirlendi. Bunun için 2., 6., 12., 18., ve 21. günde kemik iliği donörlerinden iMKH'lerin nöronal indüksiyonu sırasında hücre canlılığı ve apoptozu değerlendirildi. 21. gün sonunda iMKH-Nöronlar'ın herhangi bir hücre dışı matris proteini veya kaplama malzemesi eklenmeden Nİ ortamında uzun süreler boyunca hayatta kalabileceği görüldü.



Şekil 6.3.1. Sağlıklı donör kaynaklı iMKH-Nöron'ların canlılığı, Cell Titer Glo (Promega) hücre canlılık testi kullanılarak kültürde daha fazla olgunlaşma için değerlendirildi. Kültürde g0-g21 aralığında %14'lük bir azalma göstererek olgun nöronların canlılıklarını sürdürdükleri gözlemlendi.

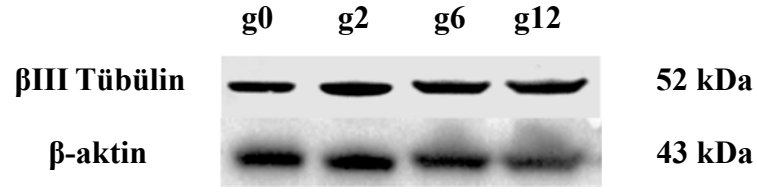
6.4. İnsan mezenkimal kök hücrelerden *in vitro* ortamda yüksek oranda fonksiyonel nöronlar elde edilebilir

Nörona özgü özellikler için RT-PCR ile β III Tübülin, NSE ve GAPDH nöronal transkriptleri değerlendirildi, iMKH hücre hattından indüklenerek elde edilen nöronlar (iMKH-Nöron); nöronal belirteçler için (g2, g6, g12), hem de indüklenmemiş iMKH hücre hattı (g0), β III Tübülin ve NSE transkriptlerini ve protein ekspresyonlarını gösterdi.

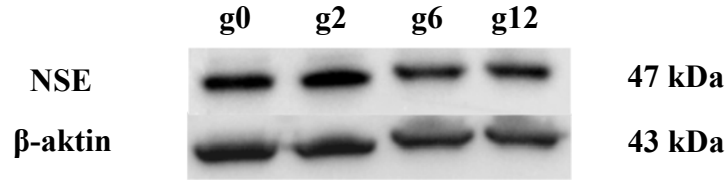


Resim 6.4.1. 12 gün boyunca nöral indüklenmiş iMKH hücre hattında β III tübülün ve NSE RT-PCR sonuçları.

A

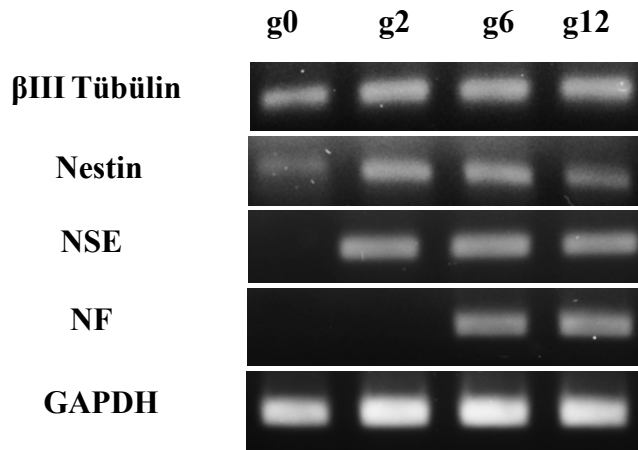


B



Resim 6.4.2. 12 gün boyunca nöral indüklenmiş iMKH hücre hattında (A) β III tübülün ve (B) NSE western blot sonuçları.

Nöronal farklılaşmanın fenotipik bir sonucu olarak, β III Tübülün, Nestin, NSE, NF ve referans gen GAPDH nöronal transkriptleri değerlendirildi. RT-PCR sonuçları, donörden türetilen iMKH-Nöron'ların, 2. günde erken nöronal belirteç NSE'nin ve 10. günde geç nöronal belirteç NF'nin transkriptlerine sahip olduğunu gösterdi. β III Tübülün ve Nestin'in transkriptleri, tüm farklılaşma aşamalarında tespit edildi. Bununla birlikte, indüklenmemiş iMKH'de ayrıca daha önce bildirilmiş olan β III Tübülün ve Nestin mRNA'ları (Resim 6.4.3) tespit edildi (17,196–198).



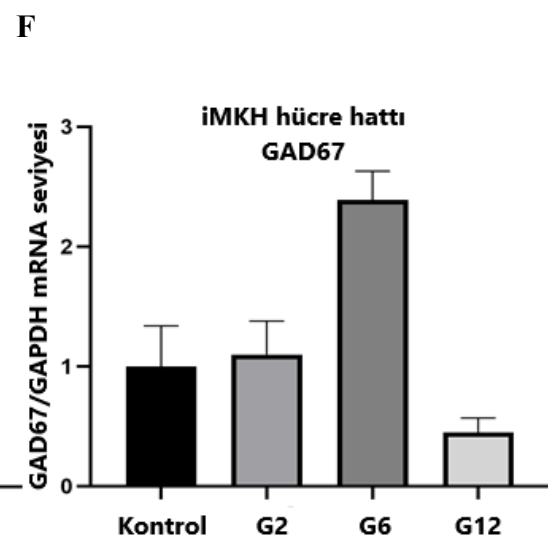
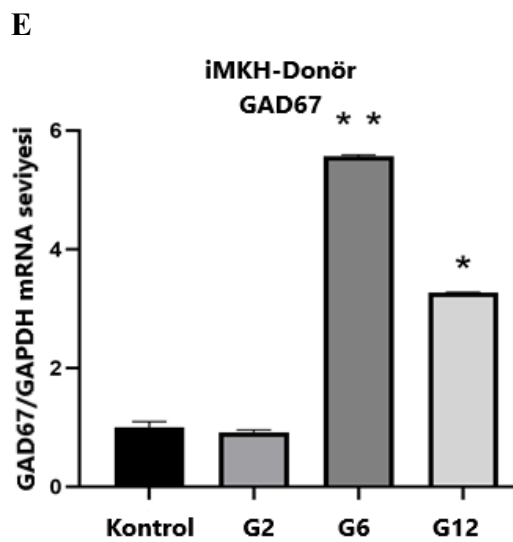
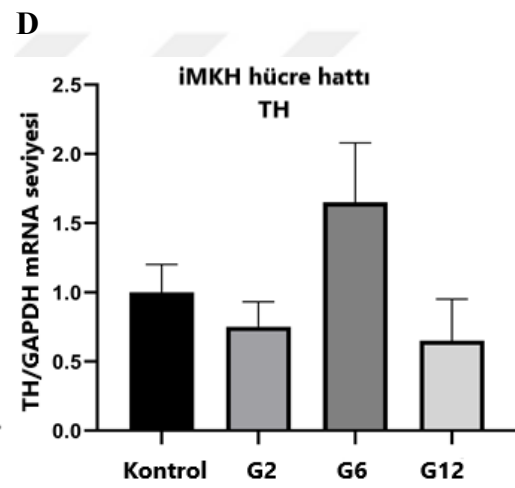
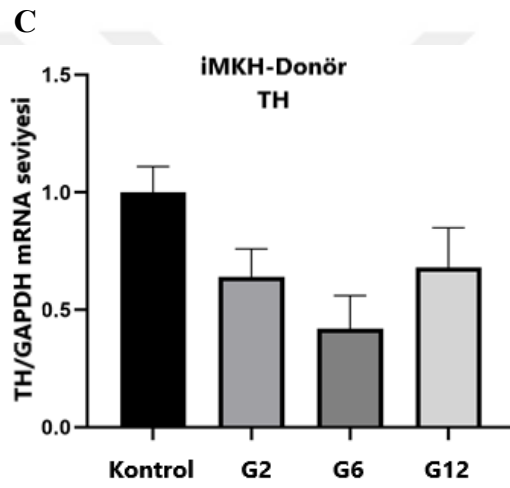
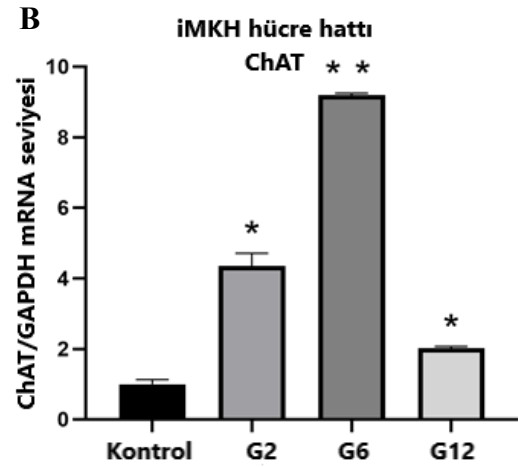
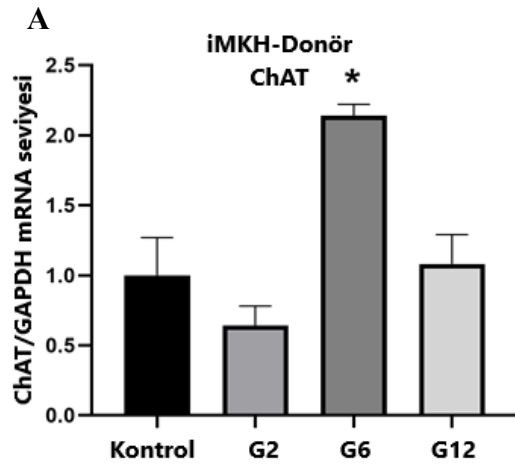
Resim 6.4.3. Nöronal farklılaşma (g0-g12) sırasında yapılan RT-PCR sonuçlarına göre, donörden türetilen iMKH-Nöron'larda β III tübülün, Nestin, NSE, NF transkriptlerinin varlığına karşı indüklenmemiş iMKH'lerde (g0) transkriptler görülmemiştir.

6.5. İnsan mezenkimal kök hücre kaynaklı nöronlar fonksiyona özgü mRNA'ları ifade eder

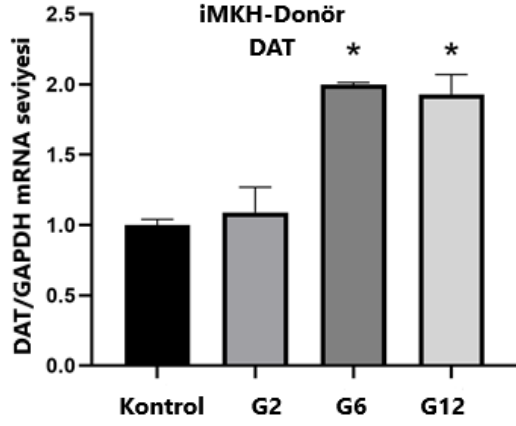
Nöronal farklılaşmanın ardından fonksiyona özgü mRNA ifadelerinin saptanması için, TH (Tirozin Hidroksilaz), ChAT (Kolin Asetiltransferaz), GAD67 (Glutamik Asit Dekarboksilaz 67), DAT (Dopamin Aktif Taşıyıcı), VGLUT1 (Veziküler Glutamat Taşıyıcısı 1) ve referans gen GAPDH nöronal transkriptleri değerlendirildi.

qRT-PCR transcript sonuçları, donörden türetilen iMKH-Nöron'ların, TH hariç 2. günden 6. güne geçerken belirgin bir şekilde artış gösterdiğini ortaya koydu. TH için ise, 6. günden 12. güne geçerken belirgin bir artış saptandı. iMKH hücre hattından elde edilen iMKH-Nöron'larda ise, DAT hariç 2. günden 6. güne geçerken anlamlı derecede artış görüldü. DAT için ise, kontrole oranla 2. günde belirgin bir artış tespit edilirken, 2. günden 12. güne doğru orantılı şekilde bir azalma görüldü.

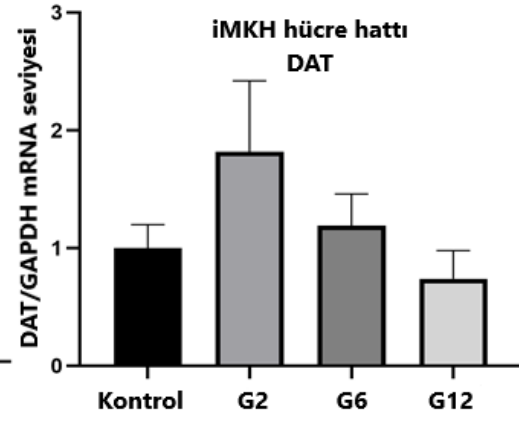
Sonuçlara göre, donör kaynaklı iMKH-Nöron'lar ChAT nöronal transkriptleri bakımından 6. günde istatistiksel olarak anlamlılık ($*p<0.05$) gösterdi. iMKH hücre hattından elde edilen iMKH-Nöron'ların ChAT nöronal transkriptleri bakımından istatistiksel olarak, 2. günde anlamlılık ($*p<0.05$), 6. günde ise yüksek derecede anlamlılık ($**0.05<p<0.001$) gösterdiği saptandı. Donörden türetilen iMKH-Nöron'ların GAD67 nöronal transkriptleri açısından 6. günde istatistiksel olarak anlamlılık ($*p<0.05$) ve 12. günde yüksek anlamlılık ($**0.05<p<0.001$) gösterdiği belirlendi. Donör kaynaklı iMKH-Nöron'larda DAT transkriptlerine bakıldığında ise, 6. günde istatistiksel olarak anlamlılık ($*p<0.05$) saptandı. 12. güne doğru, istatistiksel anlamlılığın ($*p<0.05$) devam ettiği tespit edildi (Şekil 6.5.1).



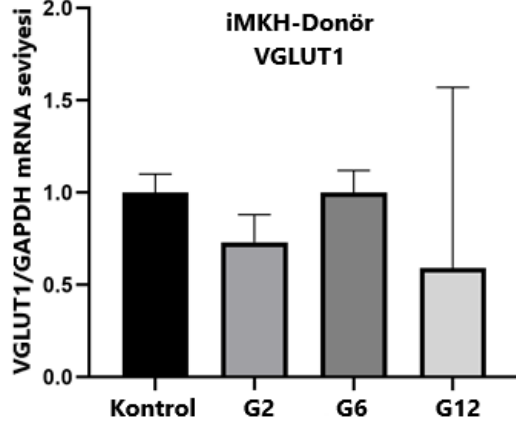
G



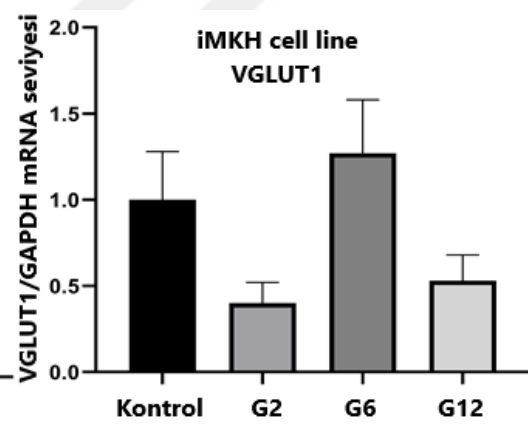
H



I



İ



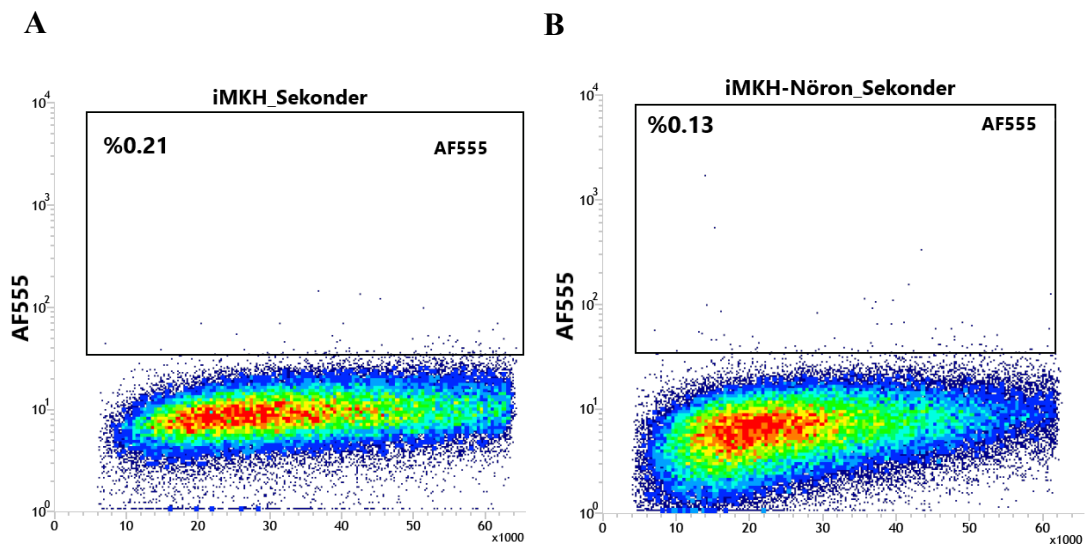
Şekil 6.5.1. Grafikler, donör kaynaklı ve hücre hattından türetilen iMKH-Nöron'larda nöronal indüksiyondan sonra, nöronal alt tiplendirme bakımından; sırasıyla A) iMKH donör ChAT, B) iMKH hücre hattı ChAT, C) iMKH donör TH, D) iMKH hücre hattı TH, E) iMKH donör GAD67, F) iMKH hücre hattı GAD67, G) iMKH donör DAT, H) iMKH hücre hattı DAT, I) iMKH donör VGLUT1, İ) iMKH hücre hattı VGLUT1, kontrol ve indüklenmiş, referans gen GAPDH'e göre normalize edilmiş mRNA ifadeleri için qRT-PCR sonuçlarını temsil eder. * $p < 0.05$, ** $0.05 < p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

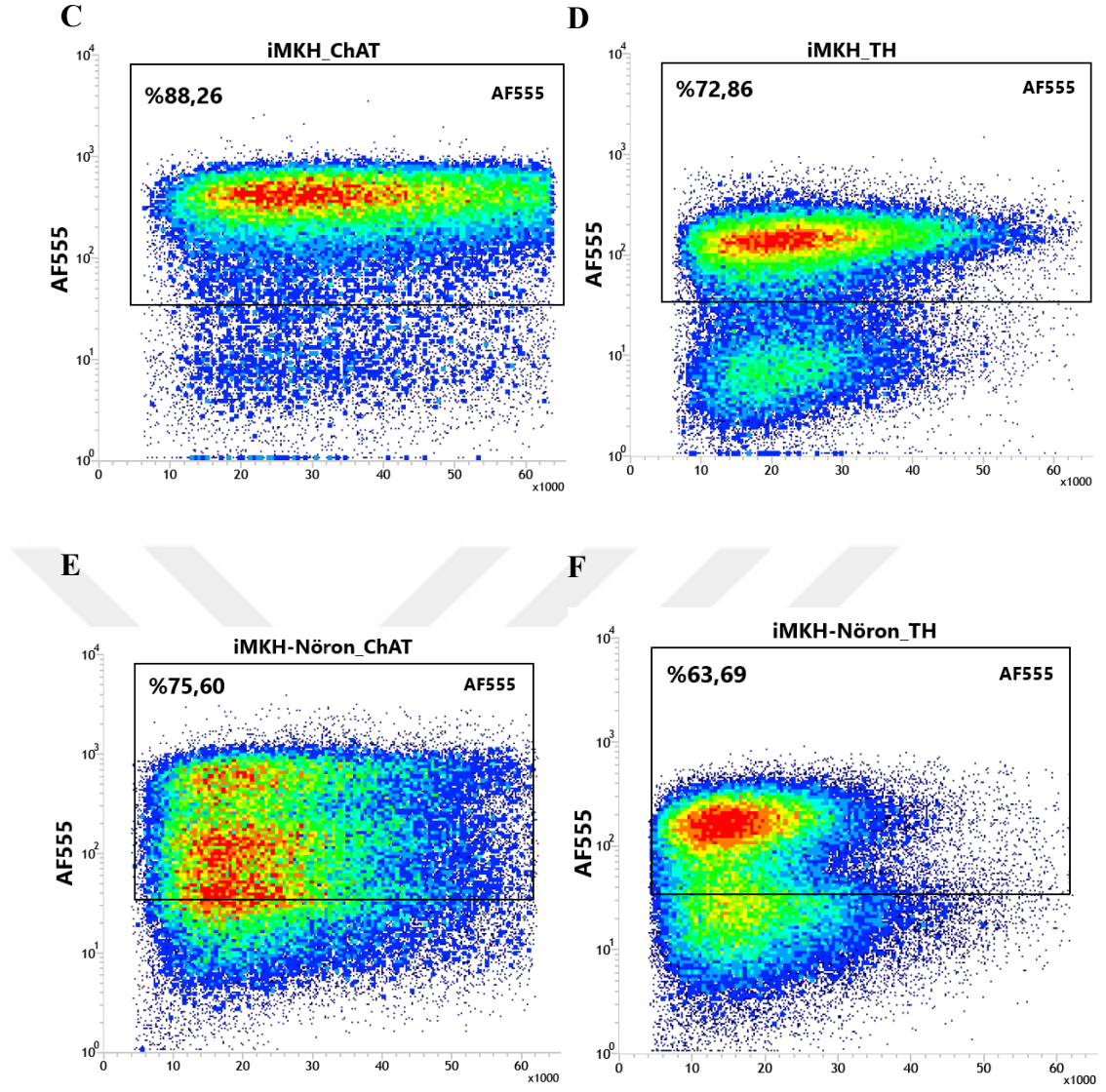
Bu deney setinde, iMKH-Nöron'larda g0-g12 aralığında Dopaminerjik, Kolinerjik, Gabaerjik ve Glutamaterjik nöron mRNA ifadeleri incelendi. iMKH hücre hattından elde edilen iMKH-Nöron'lardan ve donör kaynaklı iMKH-Nöron'lardan, bu fonksiyon spesifik nöron tipleri için istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi. Ancak, nörodejeneratif hastalıklardan Alzheimer hastalığı dünya nüfusunda yaklaşık 47

milyon bireyde görülmektedir ve en yaygın nörodejeneratif hastalıktır (131). Parkinson hastalığı ise görülme sıklığı bakımından dünyada ikinci sıradadır (136). Bireylerde görülme sıklıklarına (insidans) dayanarak; fonksiyona özgü nöronlarla ilgili devam deneylerinde bu iki nörodejeneratif hastalığa odaklanılıp, Kolinerjik ve Dopaminerjik nöronlara farklılaşmaları incelendi.

6.6. iMKH-Nöron'lar dopaminerjik ve kolinerjik nöronlara farklılaşabilmektedir

iMKH-Nöron'ların fonksiyona özgü şekilde farklılaşma sürecini incelemek için 6. günde iMKH-Nöron'larda ChAT ve TH pozitif hücrelerin yüzdeleri değerlendirildi. Akım sitometri analizi; iMKH hücre hattından elde edilen iMKH-Nöron'ların %75,60 oranında ChAT pozitif ve %63,69 oranında TH pozitif olduğunu gösterdi. Ayrıca hedef dışı bağlanma olasılığını saptamak için ilk olarak sadece ikincil antikor boyaması yapıldı. Sonuçta, ikincil antikorun anlamlı sayılacak oranlarda hedef dışı bağlanma yapmadığı görüldü (Şekil 6.6.1). Akım sitometrisi FACS (Floresan Aktive Hücre Ayırma) (Bioprotect IV Güvenlik Kabini ile BD Influx Hücre Sınıflandırıcısı) sistemi kullanılarak gerçekleştirildi.



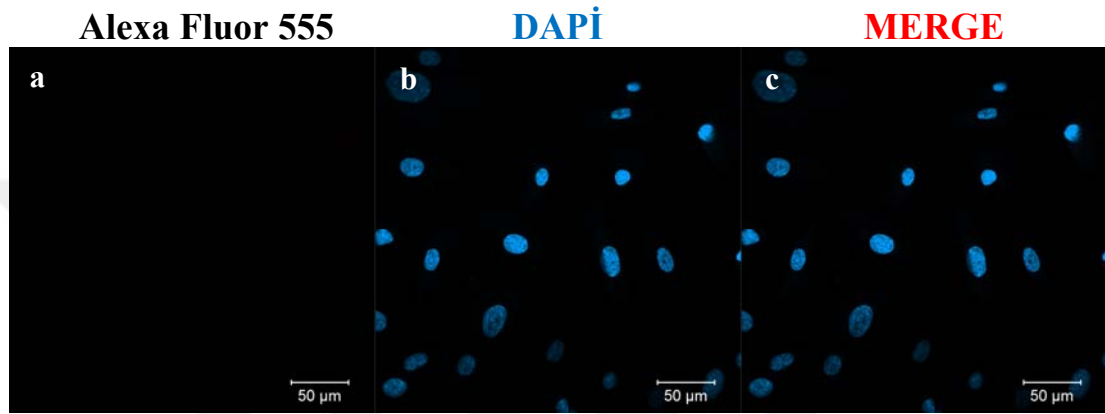


Şekil 6.6.1. iMKH hücre hatlarının nöral indüksiyondan sonra g6'da, nöronal alt tiplendirme bakımından ChAT ve TH varlığını gösteren akım sitometrisi analizi; A) ChAT antikoruna için Alexa Fluor 555 kontrol boyaması, B) TH antikoruna için Alexa Fluor 555 kontrol boyaması, C) iMKH'lerde ChAT kontrol boyaması, D) iMKH'lerde TH kontrol boyaması, E) iMKH-Nöron'larda ChAT boyaması, F) iMKH-Nöron'larda TH boyaması.

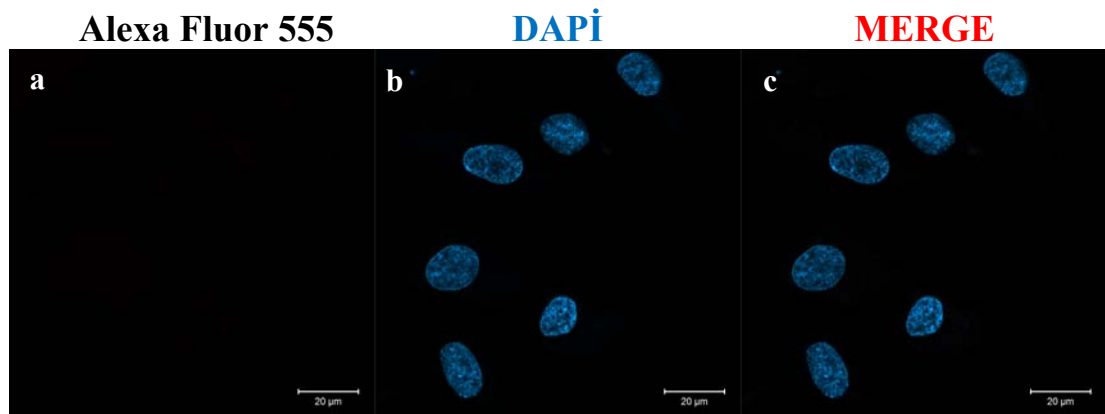
iMKH-Nöron'ların fonksiyona özgü şekilde farklılaşma sürecini incelemek için, 6. günde iMKH hücre hattından elde edilen iMKH-Nöron'larda ChAT ve TH pozitif hücrelerin saptanması için immünfloresan boyamalar yapıldı. 20 X ve 40 X objektif büyütme oranlarında floresan mikroskop ile (Zeiss LSM800 Konfokal Mikroskop)

görüntülemeler yapıldı. Görüntülemeler ve analizler sırasında Zen Blue Görüntü Analiz Programı kullanıldı.

Öncelikle, her iki antikor için de bölgelerinde hedef dışı bağlanma durumunu saptamak amaçlı ilk olarak sadece ikincil antikor boyaması yapıldı. Sonuçta, ikincil antikorun herhangi bir hedef dışı bağlanma yapmadığı görüldü (Resim 6.6.1 ve Resim 6.6.2).

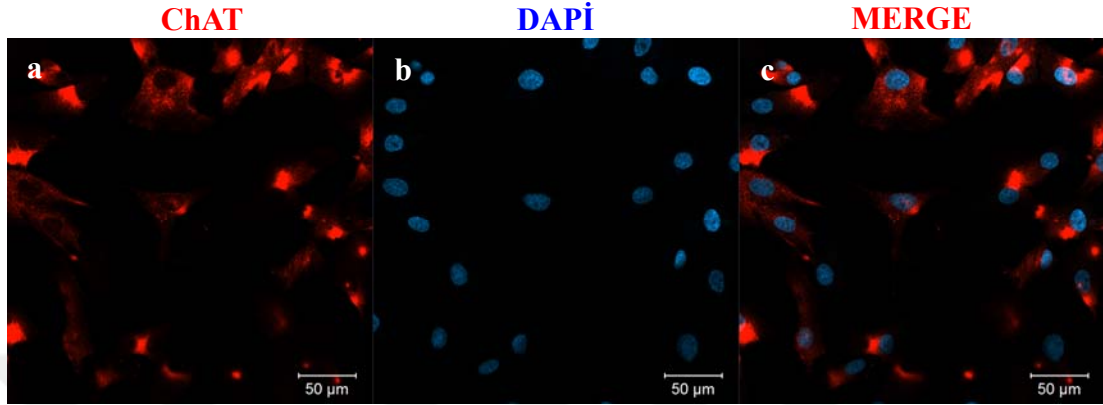


Resim 6.6.1. İkincil antikor kontrolü için yapılan negatif kontrol boyaması; Alexa Fluor 555 (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 20 X ölçekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 50 µm'yi temsil etmektedir.

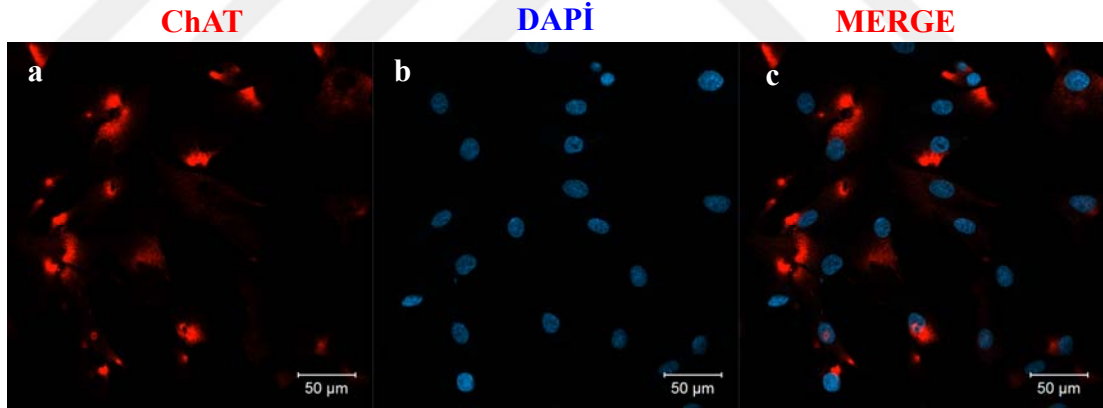


Resim 6.6.2. İkincil antikor kontrolü için yapılan negatif kontrol boyaması; Alexa Fluor 555 (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 40 X ölçekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 20 µm'yi temsil etmektedir.

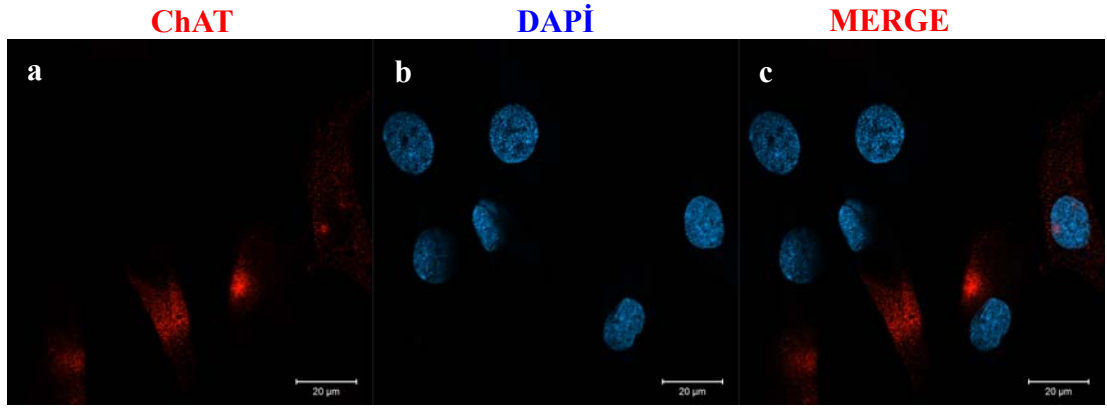
Boyamalar sonucu ChAT kontrol hücrelerinde (ChAT-iMKH) pozitif boyamalar saptandı (Resim 6.6.3, Resim 6.6.4, Resim 6.6.5 ve Resim 6.6.6).



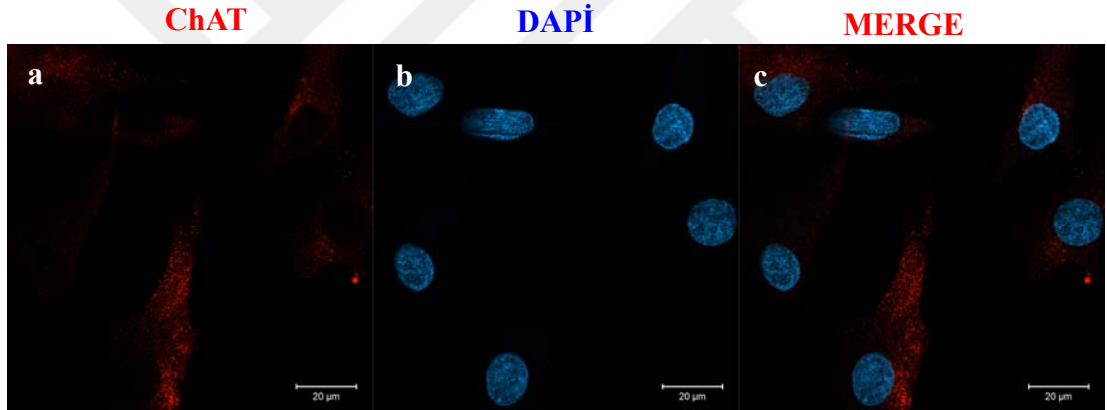
Resim 6.6.3. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler; g6'da ChAT kontrol (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 20 X ölçekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 50 µm'yi temsil etmektedir.



Resim 6.6.4. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler; g6'da ChAT kontrol (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 20 X ölçekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 50 µm'yi temsil etmektedir.

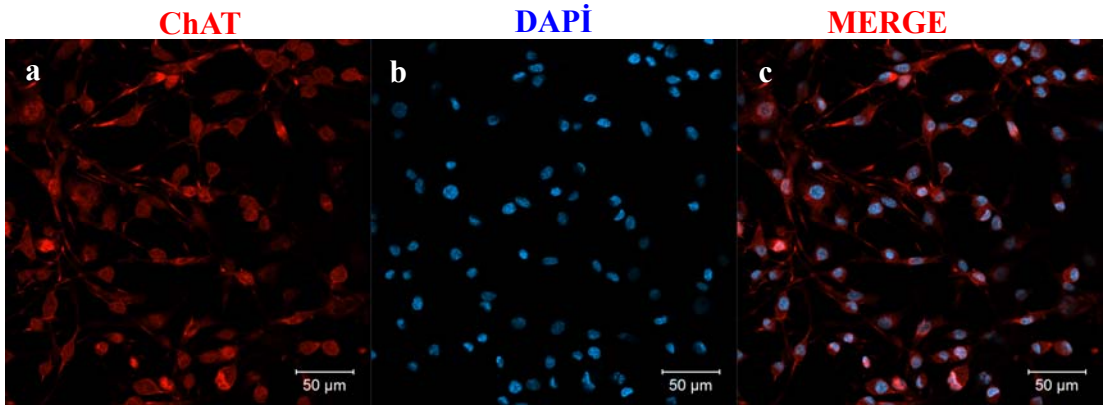


Resim 6.6.5. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler; g6'da ChAT kontrol (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 40 X ölçekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 20 μm'yi temsil etmektedir.

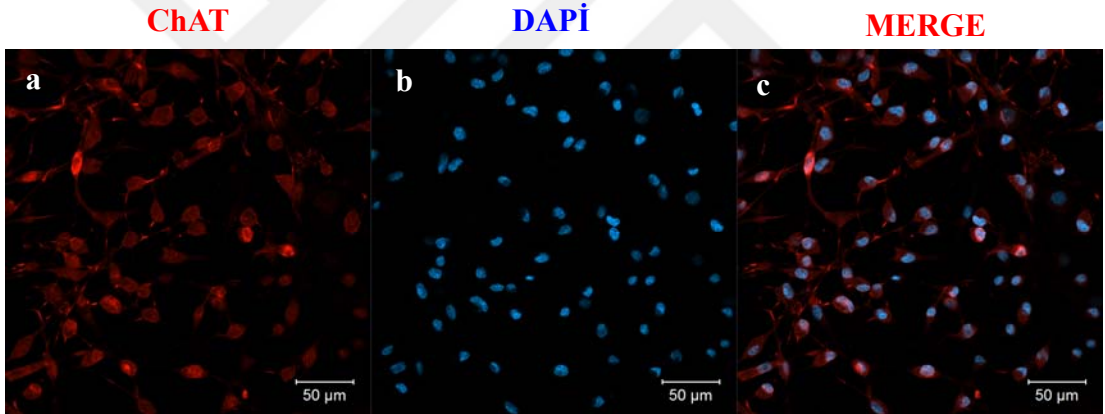


Resim 6.6.6. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler; g6'da ChAT kontrol (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 40 X ölçekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 20 μm'yi temsil etmektedir.

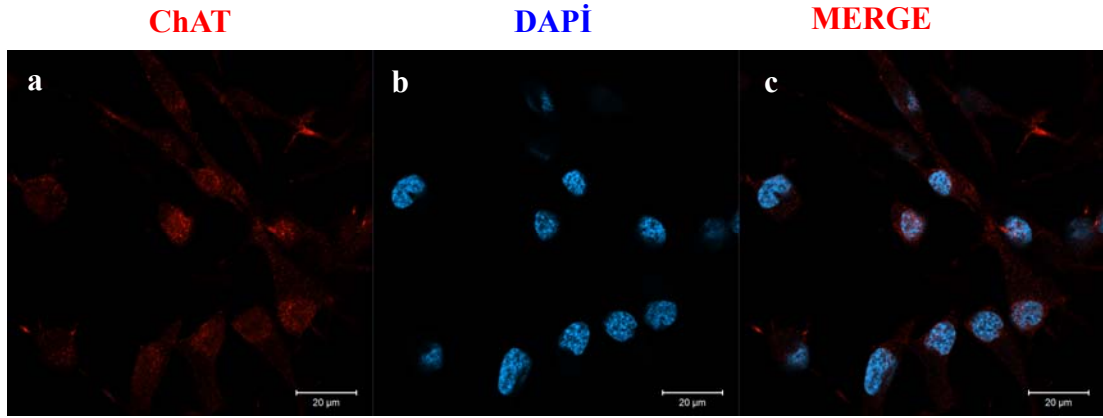
ChAT antikoru ile immünfloresan boyamalar yapıldığında iMKH-Nöron'larda çok yüksek oranlarda pozitiflik görüldü (Resim 6.6.7, Resim 6.6.8, Resim 6.6.9 ve Resim 6.6.10).



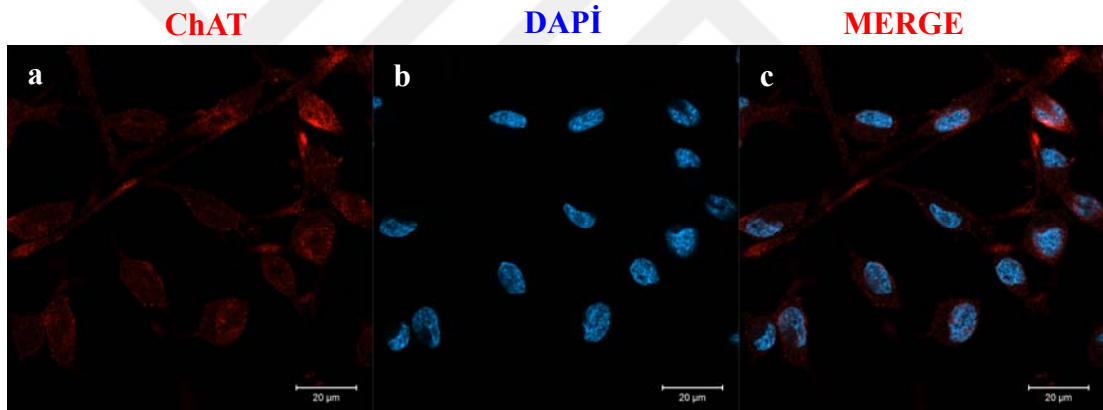
Resim 6.6.7. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler; g6'da ChAT iMKH-Nöron (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 20 X ölçeekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 50 μm'yi temsil etmektedir.



Resim 6.6.8. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler; g6'da ChAT iMKH-Nöron (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 20 X ölçeekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 50 μm'yi temsil etmektedir.

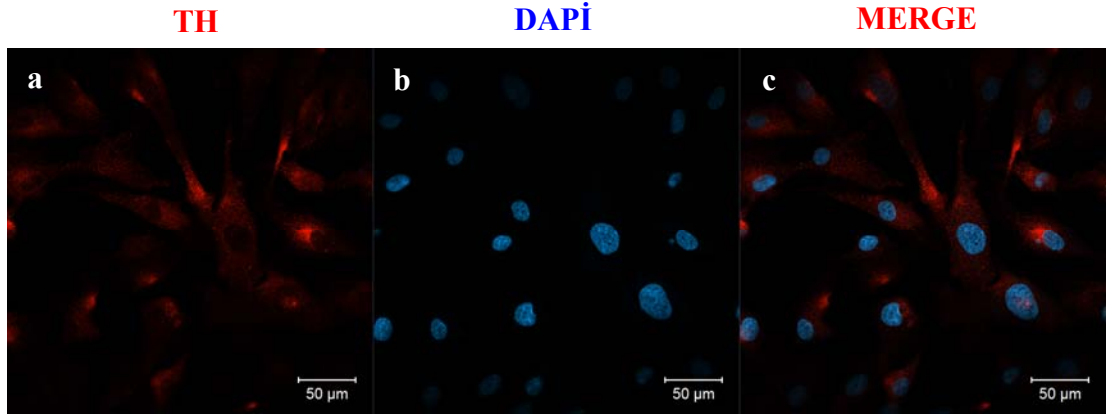


Resim 6.6.9. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler; g6'da ChAT iMKH-Nöron (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 40 X ölçekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 20 μm'yi temsil etmektedir.

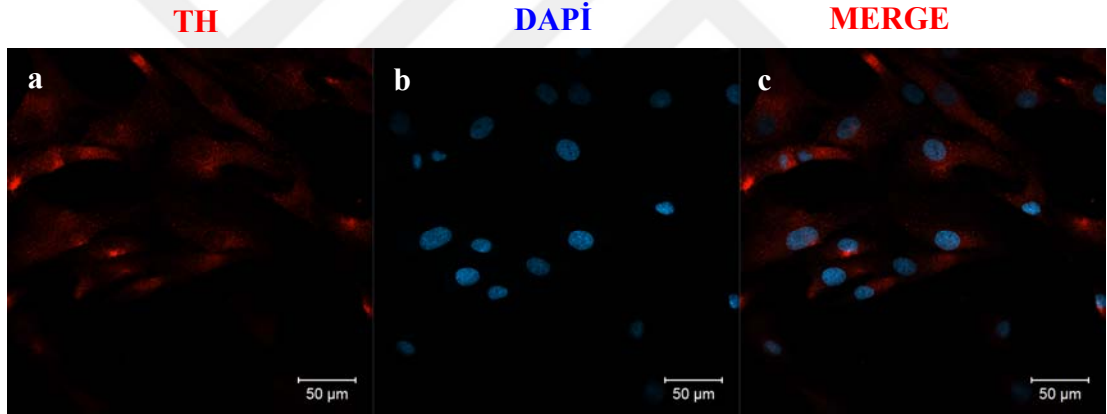


Resim 6.6.10. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler; g6'da ChAT iMKH-Nöron (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 40 X ölçekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 20 μm'yi temsil etmektedir.

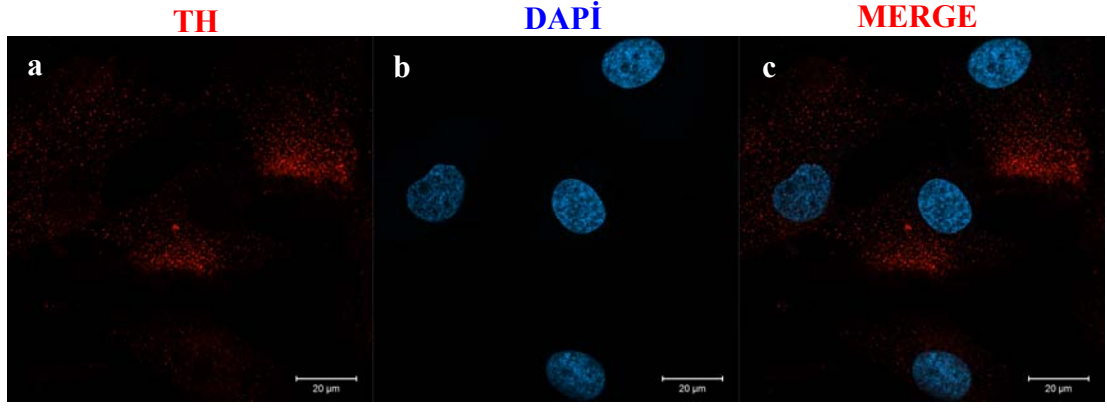
Boyamalar sonucu TH kontrol hücrelerinde (TH-iMKH) pozitif boyamalar saptandı (Resim 6.6.11, Resim 6.6.12, Resim 6.6.13 ve Resim 6.6.14).



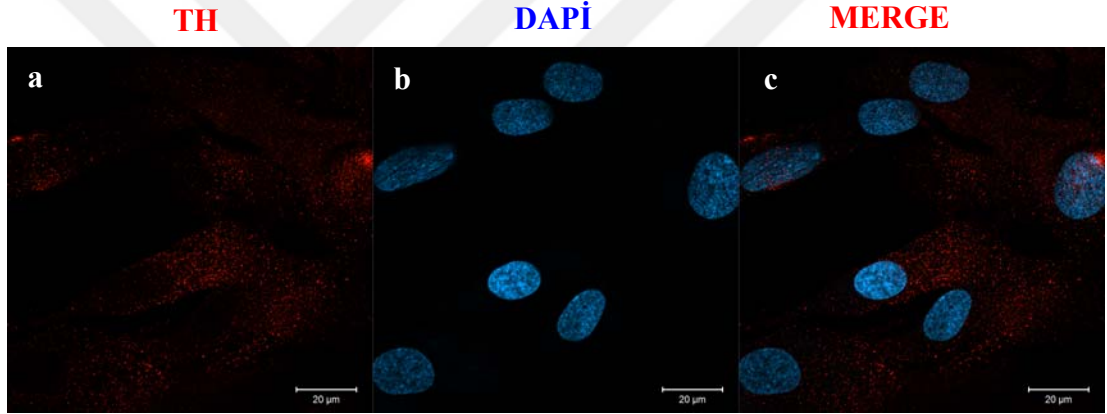
Resim 6.6.11. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler; g6'da TH kontrol (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 20 X ölçekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 50 µm'yi temsil etmektedir.



Resim 6.6.12. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler; g6'da TH kontrol (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 20 X ölçekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 50 µm'yi temsil etmektedir.

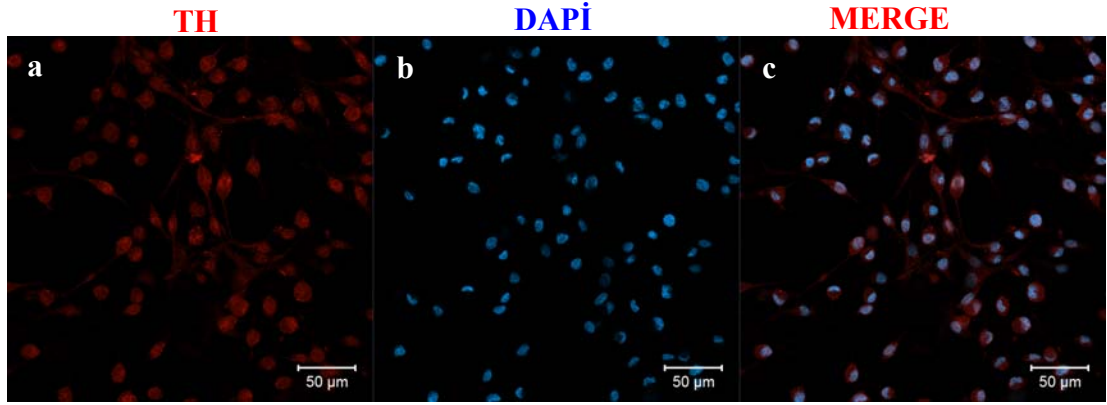


Resim 6.6.13. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler; g6'da TH kontrol (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 40 X ölçekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 20 μm'yi temsil etmektedir.

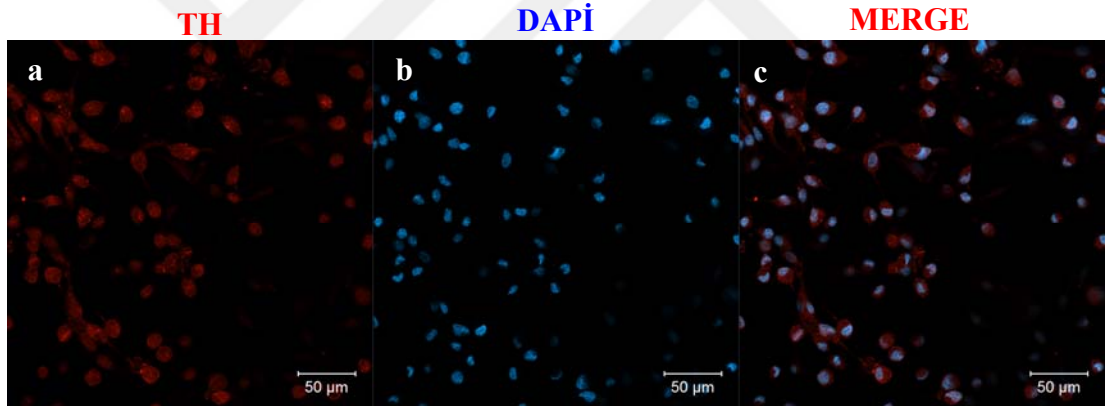


Resim 6.6.14. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler; g6'da TH kontrol (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c). 40 X ölçekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 20 μm'yi temsil etmektedir.

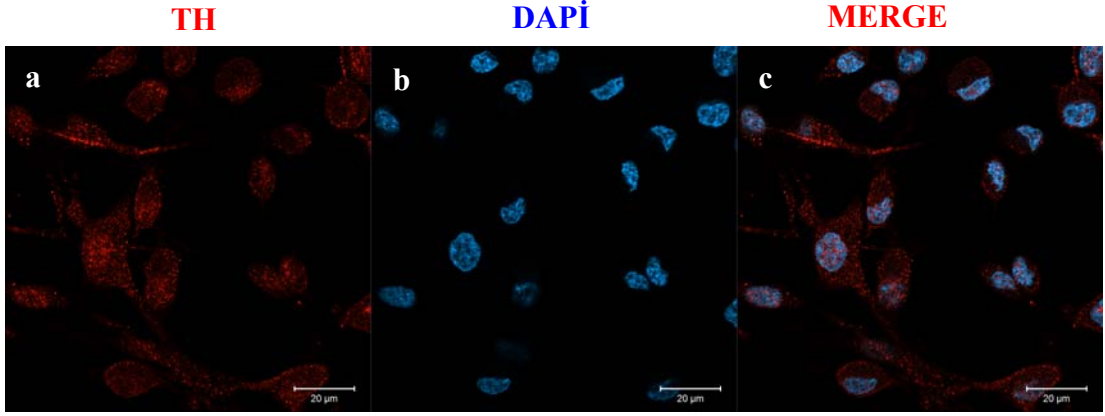
TH antikoru ile immünfloresan boyamalar yapıldığında iMKH-Nöron'larda çok yüksek oranlarda pozitiflik görüldü (Resim 6.6.15, Resim 6.6.16, Resim 6.6.17 ve Resim 6.6.18).



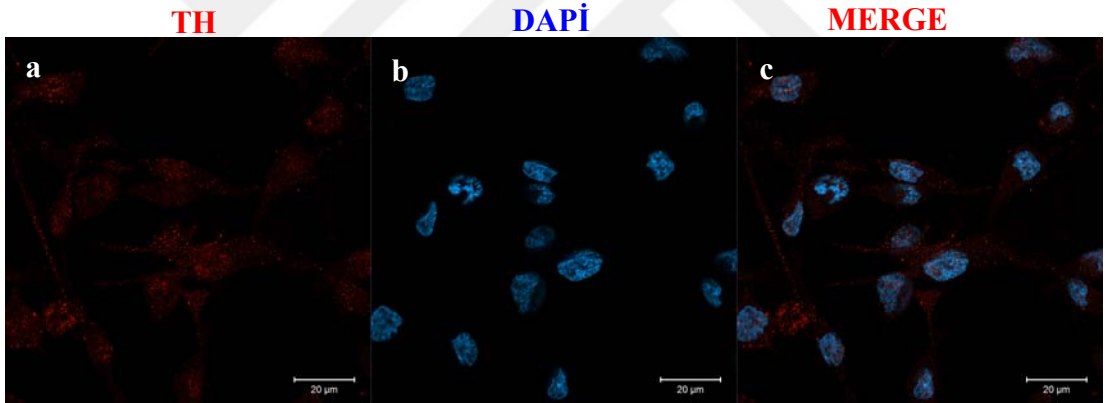
Resim 6.6.15. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler; g6'da TH iMKH-Nöron (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 20 X ölçekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 50 µm'yi temsil etmektedir.



Resim 6.6.16. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler; g6'da TH iMKH-Nöron (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 20 X ölçekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 50 µm'yi temsil etmektedir.

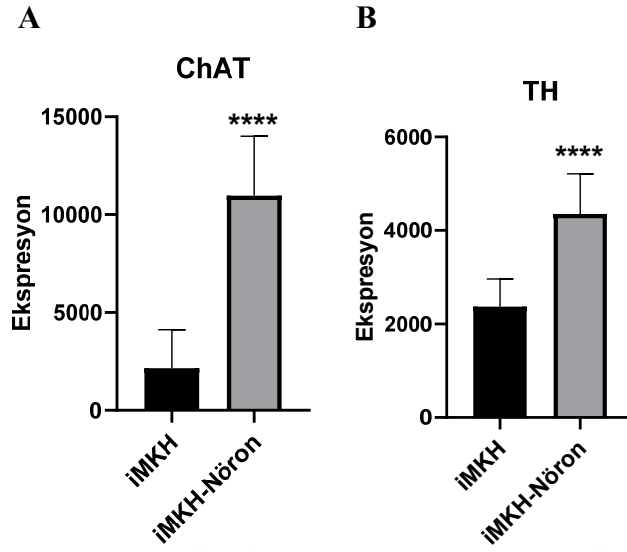


Resim 6.6.17. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler; g6'da TH iMKH-Nöron (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 40 X ölçekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 20 μm 'yi temsil etmektedir.



Resim 6.6.18. Nöronal alt tiplendirme protein ifadelerini gösteren temsili eş odaklı görüntüler; g6'da TH iMKH-Nöron (a), DAPI nükleer boyaması b), MERGE c) ile. 40 X ölçekte görüntüleme yapılmıştır. Ölçek çubukları 20 μm 'yi temsil etmektedir.

iMKH-Nöron'ların fonksiyona özgü şekilde farklılaşma sürecini incelemek ChAT ve TH antikorları ile yapılan immünfloresan boyama görüntüleri analiz edildiğinde, kontrol hücrelerinde (iMKH) var olan ekspresyon düzeylerinin iMKH-Nöron'larda da artarak devam ettiği ve bu artışın istatistiksel olarak yüksek anlamlılık (***) $p < 0.0001$) gösterdiği saptandı.

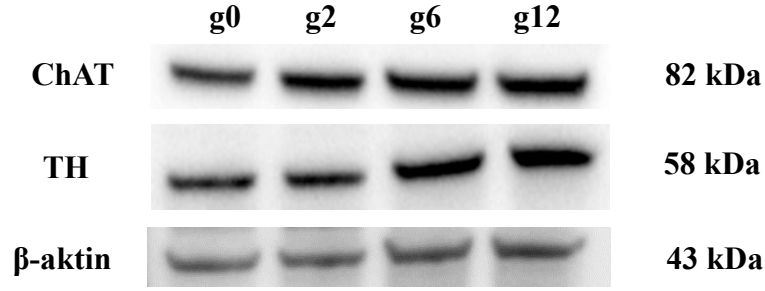


Şekil 6.6.2. iMKH hücre hattının nöronlara farklılaştırılmasını takiben g6'da, A) ChAT ve B) TH ekspresyonlarının immünohistokimya analizleri. ChAT çekirdek **** $p < 0.0001$, TH sitoplazma **** $p < 0.0001$.

iMKH-Nöron'ların spesifik nöronlara farklılaşma sürecini incelemek için, iMKH hücre hattı ile g0, g2, g6 ve g12 gün aralığında yapılan western blot sonucuna göre; ChAT ve TH antikorlarına özgü protein ifadelerin dört ayrı günde de eksprese edildiği görüldü. Referans gen olan β -aktin bantlarında günlere bağlı olarak anlamlı bir farklılık görülmedi.

ChAT protein ifadesinde g0'a göre 2. günden itibaren protein ifadesinde anlamlı artış gözlemlendi. 6. günden itibaren ise 12. güne kadar protein ifadesinin anlamlı derecede artarak devam ettiği görüldü.

TH protein ifadesinde 2. günde anlamlı artış gözlemlendi. 6. günden itibaren ise 12. güne kadar protein ifadesinin anlamlı derecede artarak devam ettiği görüldü.

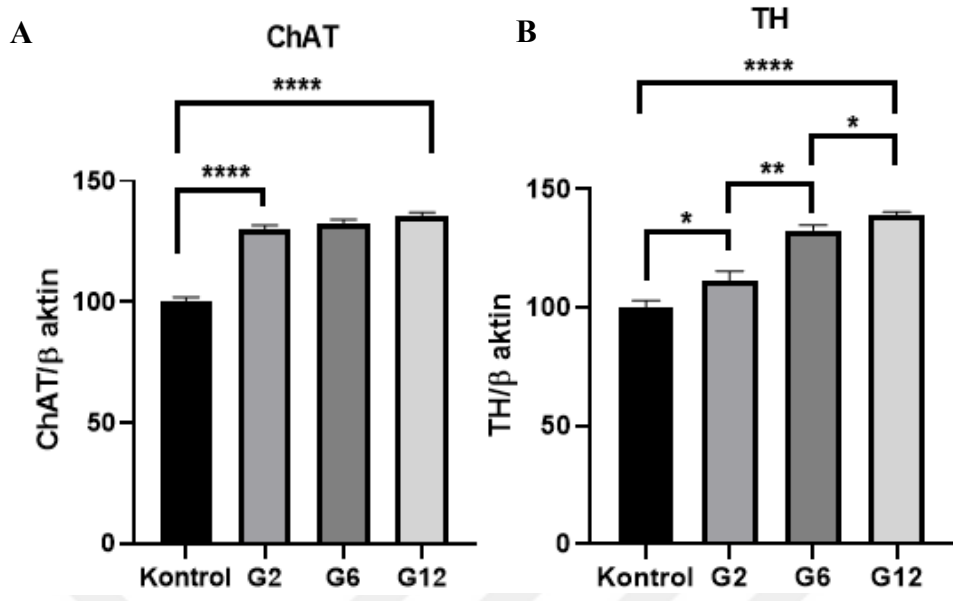


Resim 6.6.19. iMKH hücre hattı kaynaklı iMKH-Nöron'lara ait ChAT ve TH protein ifadelerini zamana bağlı olarak (g0-g12) gösteren western blot sonuçları.

iMKH-Nöron'ların nöron spesifik farklılaşma sürecini incelemek için, iMKH hücre hattı ile g0, g2, g6 ve g12 gün aralığında yapılan western blot bantları analiz edildiğinde; nöronal farklılaşma süreci ile orantılı bir şekilde TH ve ChAT ekspresyonlarında kontrole kıyaslı anlamlı derecede artışlar saptandı.

ChAT protein ifadesi sonuçları incelendiğinde, g0 ile g2 arasında belirgin bir artış görülmekle birlikte istatistiksel olarak da yüksek anlamlılık (**** $p < 0.0001$) saptandı. g2, g6 ve g12 sırasıyla incelendiğinde artışın devam ettiği görüldü. Sonuç olarak, 0. ve 12. gün aralığında Kolinerjik nörona özgü protein ifadesinin istatistiksel olarak yüksek anlamlılık (**** $p < 0.0001$) gösterdiği belirlendi.

TH protein ifadesi sonuçları incelendiğinde, g0 ile g2 arasında artış ($*p < 0.05$) olduğu, g2 ile g6 arasında ise belirgin bir artış görülmekle birlikte istatistiksel olarak da yüksek anlamlılık ($**0.05 < p < 0.001$) saptandı. Nöronal farklılaşmanın 12. gününe gelindiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı ($*p < 0.05$) şekilde artışın devam ettiği görüldü. Sonuç olarak, 0. ve 12. gün aralığında Dopaminerjik nörona özgü protein ifadesinin istatistiksel olarak yüksek anlamlılık (**** $p < 0.0001$) gösterdiği belirlendi.



Şekil 6.6.3. iMKH hücre hattının nöronlara farklılaştırılmasını takiben, A) ChAT ve B) TH ekspresyonlarının zamana bağlı olarak (g0-g12) kontrol grubu ile karşılaştırılmış western blot analizleri. *p<0.05, **p<0.005, ****p<0.001, ****p<0.0001.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

iMKH'lerin kültür ortamında nöronlara farklılaşabildiği birçok çalışmada gösterilmiştir (1,14,15,37–40). Ancak nöronal farklılaşma ile yapılan çalışmalarla ilgili sorgulanan konulardan birisini, fonksiyonel nöronların sürdürülebilir ve yüksek verimine yol açan başarılı bir indüksiyon yönteminin tanımlanması oluşturmaktır (57). Daha önceki çalışmamızda, hücre hattından veya sağlıklı donörlerden izole edilen kemik iliği iMKH'lerinin tek aşamalı bir protokolle fonksiyonel nöronlara farklılaştığı ve spontan aktivite sergiledikleri gösterilmiştir (14). Bu tez çalışmasında ise, iMKH'lerden farklılaştırılan bu nöronların fonksiyonel alt tipleri analiz edilmiş, dopaminerjik ve kolinerjik nöron popülasyonları tespit edilmiştir. Dolayısıyla elde edilen sonuçlar, bu özel nöron grupları ile ilişkili nöropatolojilerin ve tedavi yaklaşımlarının iMKH'lerden elde edilen bu deneysel modelde çalışılabilme potansiyelini göstermiştir.

Bu çalışmada, öncelikle iMKH hücre hattı ve donör kaynaklı stromal hücrelerin iMKH fenotipi gösterip göstermediği incelenmiştir. Bu kapsamda, RT-PCR sonuçlarına göre, iMKH'lerden farklılaştırılan nöronların, nöronal mRNAların ve proteinlerin (β III Tübülün, NSE, NF ve Nestin) pozitif ifadeleriyle nöronal farklılaşmaya ilerleyebildiği görülmüştür. Çalışmanın devamında ise, nöronal indükleme (NI) ortamının hücre canlılığına etkisi araştırılmıştır. Nöronal indüksiyon ortamında olgunlaşmaya bırakılan kemik iliği iMKH'lerinin, kültür ortamında uzun süre (21 gün) hayatta kalabildiği ve nöron canlılığına olumsuz bir etkisi olmadığı görülmüştür.

Nöronal mikro-çevreyi taklit eden doku mühendisliği araçları kullanılarak kültür koşullarının iyileştirilmesi, iMKH-Nöron'ların olgunlaşma sürecini daha detaylı bir şekilde incelemek için uygulanabilir. Bu çalışmalar, iMKH-Nöron'ların fonksiyonel nöronal ağlar oluşturma yeteneklerini anlamak için genişletilebilir. Ayrıca, nöronların yeteneklerini, özelliklerini ve doku/işleve özgü fenotiplerini iyi tanımlamak için iMKH-Nöron'lar (veya kök hücrelerden türetilen diğer işlevsel nöronlar) üzerinde daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

iMKH hücre hattı iMKH-Nöron'ları ve donör iMKH-Nöron'ları karşılaştırıldığında, iMKH hücre hatlarından türetilen iMKH-Nöron'ların aynı olduğunu ve çoğunlukla bipolar yapılara sahip olduğu gözlemlenmiştir. Aksine, insan kemik iliği donörlerinden gelişen iMKH-Nöron'lar, nörit uzantıları yönüyle heterojenlik göstermiştir. Bu durum, iMKH hücre hattının hücreleri genetik olarak aynı olduğundan, daha az karmaşık nöronlara yol açmalarını açıklar. Ayrıca, bu çalışmada kullanılan iMKH hücre hattı, nöronlara farklılaşmadan birkaç nöronal belirteç ifadesi gösterirken, donörden türetilen iMKH'ler, nöronal proteinlerin düşük ekspresyonlarını göstermiştir.

iMKH hücre hattından türetilen ve donör kaynaklı iMKH-Nöron'larında, Kolinerjik, Dopaminerjik, Gabaerjik, Glutamaterjik gibi farklı nöron tiplerine ait fonksiyona özgü ifadelere bakıldığında; iMKH hücrelerinin, plastisite özelliğinden dolayı fonksiyon spesifik nöronal proteinleri ifade edebildiği görülmektedir. Ayrıca, akım sitometrisi çalışmaları, nöronal fonksiyona özgü proteinleri ifade eden iMKH hücre popülasyonunun, nöronal farklılaşma ile birlikte değişmediğini göstermiştir. Ancak, mRNA ve protein düzeyinde analiz edildiğinde ise nöronal farklılaşma boyunca ekspresyonun anlamlı derecede arttığını göstermiştir.

qRT-PCR sonuçları; iMKH-Nöron'larda kritik olarak 6. gün civarında fonksiyona özgü nöron kaderinin şekillendiğini, bir yol ayrımına girildiğini ve ortamda nöron tipinin ifadesini sürdürmesi için gerekli olan faktörler bulunduğu takdirde olgunlaşma sürecinin devam edebileceğini, ancak uygun faktörler olmadığında ise nöronlarda bir kararsızlık oluşturabileceğini düşündürmektedir. Nöron spesifik mRNA ifadesinin mevcut olması, var olan mRNA'nın tamamının proteine dönüşeceğine dair kesinlik sunmadığı için, nöron olgunlaşma sürecine girdikten sonra mRNA düzeylerinin olgunlaşmayı sürdürmeye yeterli olup olmayacağı hakkında kesin bilgi verememektedir. Ayrıca, 12. günde western blot ile tespit edilen TH ve ChAT'ın nöronal farklılaşma günlerine göre artmış protein düzeyleri (****p<0.0001) de bu yaklaşımı desteklemektedir. Aynı şekilde, immünfloresan boyama sonuçlarında da, iMKH hücre boyamalarında gözlemlenen ChAT ve TH ekspresyonlarının, iMKH-Nöron'larda istatistiksel olarak anlamlı bir artış (****p<0.0001) gösterdiği

görülmektedir. Fonksiyon spesifik nöron tiplerinin olgunlaşma süreci 6. gün civarında nöronal olgunlaşma faktörleri eşliğinde sürdürülerek, ve 12. günden sonraki süreçte de takip edilerek nöron kaderi daha kapsamlı analiz edilebilir.

Diğer taraftan kemik iliği donörlerinden izole edilen iMKH'ler, ayrı farklılaşma yeteneklerine sahip farklı alt popülasyonlara sahip olabilir. Bu nedenle, izole hücrelerin kemik iliğinden iMKH'ler olarak immünofenotiplendirilmesi, araştırmacıların iMKH'leri spesifik nöron türüne yol açan farklılaşma kapasiteleri için değil, iMKH genel özellikleri için sınıflandırılmasına izin verir. Ayrıca, iMKH-Nöron'lar, Dopaminerjik, Kolinergic, Gabaergic nöronlar vb. gibi belirli tipte nöronların yüksek verimlilikle eldesi için potansiyel bir kök hücre kaynağı olarak kullanılabilir (40,199,200). Bu amaçla, belirli koşullar altında yüksek saflıkta belirli bir nöron tipine farklılaşma potansiyeli olan iMKH alt popülasyonları hücre ayırma yöntemi (FACS veya MACS) ile ayrıştırılabilir. Benzer yaklaşım ile yapılan bir çalışmada Nestin pozitif iMKH'lerden nöronları başarılı bir şekilde verdiği bildirilmiştir (201,202). iMKH alt tiplerinden fonksiyona/dokuya spesifik nöronlar elde etmeye odaklanmak, nöronal farklılaşma çalışmaları için klonal tabanlı bir yaklaşım olabilir. Ayrıca iMKH-Nöron'ların yapısal sınıflarına göre sınıflandırılması, belirli nörotransmitter reseptör türlerine ev sahipliği yapması ve bunların fonksiyon/dokuya özgü yeteneklerinin genel olarak araştırılması, geniş bir yelpazede sinir sistemi deformasyonları için rejeneratif çalışmalara öncülük edebilir ve böylelikle hastalık modelleri ve klinik öncesi terapötik yaklaşımlar sunabilir (203,204).

Birlikte ele alındığında, bu bulgular, tanımlanmış bir indüksiyon protokolü aracılığıyla iMKH hücre hattından veya donörden türetilen iMKH'lerden *in vitro* olarak kolayca elde edilebilen iMKH-Nöronları'nın fonksiyonel yetenek kazanabildiğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, iMKH-Nöron'lar, hastalık modelleme, doku mühendisliği yaklaşımları, nöronal farklılaşma mekanizmasını incelemek ve yeni doğmuş nöronların iMKH'lerden hiyerarşik oluşumunu anlamak da dahil olmak üzere çok çeşitli uygulamalar için kullanılabilir niteliktedir.

8. KAYNAKLAR

1. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;61(4):364–70.
2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (80-). 1999;284(5411):143–7.
3. Abouelfetouh A, Kondoh T, Ehara K, Kohmura E. Morphological differentiation of bone marrow stromal cells into neuron-like cells after co-culture with hippocampal slice. *Brain Res*. 2004;1029(1):114–9.
4. Cano E, Gebala V, Gerhardt H. Pericytes or Mesenchymal Stem Cells: Is That the Question? *Cell Stem Cell*. 2017;20(3):296–7.
5. Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(5):815–20.
6. Taran R, Mamidi MK, Singh G, Dutta S, Parhar IS, John JP, et al. In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources. *J Biosci*. 2014;39(1):157–69.
7. Zhang J, Huang X, Wang H, Liu X, Zhang T, Wang Y, et al. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2015;6(1):1–7.
8. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells*. 2007;25(11):2739–49.
9. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*. 2019;8(8):886.
10. Wang SP, Wang ZH, Peng DY, Li SM, Wang H, Wang XH. Therapeutic effect of mesenchymal stem cells in rats with intracerebral hemorrhage: Reduced apoptosis and enhanced neuroprotection. *Mol Med Rep*. 2012;6(4).
11. Song CG, Zhang YZ, Wu HN, Cao XL, Guo CJ, Li YQ, et al. Stem cells: A promising candidate to treat neurological disorders. *Neural Regen Res*.

- 2018;13(7):1294–304.
12. Hess, D. C.; Borlongan C V. Stem cells and neurological diseases. *Cell Prolif.* 2008;94–114.
 13. Hernández R, Jiménez-Luna C, Perales-Adán J, Perazzoli G, Melguizo C, Prados J. Differentiation of human mesenchymal stem cells towards neuronal lineage: Clinical trials in nervous system disorders. *Biomol Ther.* 2020;28(1):34–44.
 14. Karakaş N, Bay S, Türkel N, Öztunç N, Öncül M, Bilgen H, et al. Neurons from human mesenchymal stem cells display both spontaneous and stimuli responsive activity. *PLoS One.* 2020;15(5):1–18.
 15. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol.* 2000;164(2):247–56.
 16. Wyse RD, Dunbar GL, Rossignol J. Use of genetically modified mesenchymal stem cells to treat neurodegenerative diseases. Vol. 15, *International Journal of Molecular Sciences.* 2014.
 17. Tio M, Tan KH, Lee W, Wang TT, Udolph G. Roles of db-cAMP, IBMX and RA in aspects of neural differentiation of cord blood derived mesenchymal-like stem cells. *PLoS One.* 2010;5(2).
 18. Wei ZJ, Fan BY, Liu Y, Ding H, Tang HS, Pan DY, et al. MicroRNA changes of bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiated into neuronal-like cells by Schwann cell-conditioned medium. *Neural Regen Res.* 2019;14(8):1462–9.
 19. Takeda YS, Xu Q. Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells using exosomes derived from differentiating neuronal cells. *PLoS One.* 2015;10(8).
 20. Lee YJ, Seo TH, Lee S, Jang W, Kim MJ, Sung JS. Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells in response to the domain size of graphene substrates. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2018;106(1):43–51.
 21. Boulanger-Weill J, Candat V, Jouary A, Romano SA, Pérez-Schuster V, Sumbre G. Functional Interactions between Newborn and Mature Neurons Leading to Integration into Established Neuronal Circuits. *Curr Biol.*

- 2017;27(12).
22. Wang Y, Yang J, Li H, Wang X, Zhu L, Fan M, et al. Hypoxia Promotes Dopaminergic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Shows Benefits for Transplantation in a Rat Model of Parkinson's Disease. *PLoS One*. 2013;8(1).
 23. Gao S, Zhao P, Lin C, Sun Y, Wang Y, Zhou Z, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into neuron-like cells which are compatible with photocurable three-dimensional scaffolds. *Tissue Eng - Part A*. 2014;20(7–8).
 24. Nakao N, Shintani-Mizushima A, Kakishita K, Itakura T. The ability of grafted human sympathetic neurons to synthesize and store dopamine: A potential mechanism for the clinical effect of sympathetic neuron autografts in patients with Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2004;188(1).
 25. George S, Hamblin MR, Abrahamse H. Differentiation of Mesenchymal Stem Cells to Neuroglia: in the Context of Cell Signalling. *Stem Cell Rev Reports*. 2019;15(6):814–26.
 26. Franco Lambert AP, Fraga Zandonai A, Bonatto D, Cantarelli Machado D, Pêgas Henriques JA. Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: Does it work? *Differentiation*. 2009;77(3):221–8.
 27. Buzsáki G. Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nat Neurosci*. 2004;7(5):446–51.
 28. Irwin RP, Allen CN. Simultaneous electrophysiological recording and calcium imaging of suprachiasmatic nucleus neurons. *J Vis Exp*. 2013;(82):50794.
 29. Winnubst J, Cheyne JE, Niculescu D, Lohmann C. Spontaneous Activity Drives Local Synaptic Plasticity InVivo. *Neuron* [Internet]. 2015;87(2):399–410.
 30. Singh M, Kakkar A, Sharma R, Kharbanda OP, Monga N, Kumar M, et al. Synergistic Effect of BDNF and FGF2 in Efficient Generation of Functional Dopaminergic Neurons from human Mesenchymal Stem Cells. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–13.
 31. Cortés-Medina L V., Pasantes-Morales H, Aguilera-Castrejon A, Picones A, Lara-Figueroa CO, Luis E, et al. Neuronal transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells from neonatal and adult sources by a small molecule cocktail. *Stem Cells Int*. 2019;2019.

32. Neirinckx V, Coste C, Rogister B, Wislet- S. Neural Fate of Mesenchymal Stem Cells and Neural Crest Stem Cells: Which Ways to Get Neurons for Cell Therapy Purpose? Trends Cell Signal Pathways Neuronal Fate Decis. 2013;
33. Shall G, Menosky M, Decker S, Nethala P, Welchko R, Leveque X, et al. Effects of passage number and differentiation protocol on the generation of dopaminergic neurons from rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3).
34. Grade S, Götz M. Neuronal replacement therapy: previous achievements and challenges ahead. *npj Regen Med.* 2017;2(1).
35. Irion S, Zabierowski SE, Tomishima MJ. Bringing Neural Cell Therapies to the Clinic: Past and Future Strategies. *Mol Ther - Methods Clin Dev* [Internet]. 2017;4:72–82.
36. Scuteri A, Miloso M, Foudah D, Orciani M, Cavaletti G, Tredici G. Mesenchymal Stem Cells Neuronal Differentiation Ability: A Real Perspective for Nervous System Repair? Vol. 6, *Current Stem Cell Research & Therapy.* 2011. p. 82–92.
37. Marei HES, El-Gamal A, Althani A, Afifi N, Abd-Elmaksoud A, Farag A, et al. Cholinergic and dopaminergic neuronal differentiation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2018;233(2):936–45.
38. Oh SH, Kim HN, Park HJ, Shin JY, Bae EJ, Sunwoo MK, et al. Mesenchymal Stem Cells Inhibit Transmission of α -Synuclein by Modulating Clathrin-Mediated Endocytosis in a Parkinsonian Model. *Cell Rep* [Internet]. 2016;14(4):835–49.
39. Kan I, Ben-Zur T, Barhum Y, Levy YS, Burstein A, Charlow T, et al. Dopaminergic differentiation of human mesenchymal stem cells-Utilization of bioassay for tyrosine hydroxylase expression. *Neurosci Lett.* 2007;419(1):28–33.
40. Yu JH, Kim MS, Lee MY, Lee JY, Seo JH, Cho SR. GABAergic neuronal differentiation induced by brain-derived neurotrophic factor in human mesenchymal stem cells. *Animal Cells Syst (Seoul).* 2014;18(1).
41. Friedenstein AJ, Petrakova K V, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and

- hematopoietic tissues. [Internet]. Vol. 6, Transplantation. 1968. p. 230–47.
42. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641–50.
 43. Fan XL, Zhang Y, Li X, Fu QL. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2020;77(14):2771–94.
 44. Musiał-Wysocka A, Kot M, Majka M. The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies. *Cell Transplant.* 2019;28(7):801–12.
 45. Zuk PA. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(December):4279–95.
 46. Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 2001;98(8):2396–402.
 47. Ukai, R.; Honmou O. Mesenchymal Stem Cells Derived from Peripheral Blood Protects against Ischemia. *J Neurotrauma* [Internet]. 2007;24(3):508–20.
 48. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FHJ, Willemze R, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood.* 2003;102(4):1548–9.
 49. Erices, A.; Conget, P.; Minguell J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord. *Br J Haematol.* 2000;109:235–42.
 50. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001;44(8):1928–42.
 51. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001;153(5):1133–9.
 52. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, et al. Mesenchymal Stem Cells Derived from CD133-Positive Cells in Mobilized Peripheral Blood and Cord Blood: Proliferation, Oct4 Expression, and Plasticity. *Stem Cells.* 2005;23(8):1105–12.
 53. Carlotti F, Zaldumbide A, Loomans CJ, Van Rossenberg E, Engelse M, De Koning EJ, et al. Isolated human islets contain a distinct population of mesenchymal stem cells. *Islets.* 2010;2(3).
 54. Paul G, Özen I, Christophersen NS, Reinbothe T, Bengzon J, Visse E, et al. The

- adult human brain harbors multipotent perivascular mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2012;7(4).
55. Huang F, Chen M, Chen W, Gu J, Yuan J, Xue Y, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells inhibit xeno-graft-versus-host disease via CD39-CD73-adenosine and IDO signals. *Front Immunol*. 2017;8(FEB):1–9.
 56. Sarukhan A, Zanotti L, Viola A. Mesenchymal stem cells: Myths and reality. *Swiss Med Wkly*. 2015;145(December):1–11.
 57. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective. *Biosci Rep*. 2015;35.
 58. Pevsner-Fischer M, Levin S, Zipori D. The Origins of Mesenchymal Stromal Cell Heterogeneity. *Stem Cell Rev Reports*. 2011;7(3):560–8.
 59. Maleki M, Ghanbarvand F, Behvarz MR, Ejtemaei M, Ghadirkhomi E. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int J Stem Cells*. 2014;7(2):118–26.
 60. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation*. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(1):1–10.
 61. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005;33(11):1402–16.
 62. Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In Vitro Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells: Choice of Serum Is a Determinant of Cell Proliferation, Differentiation, Gene Expression, and Transcriptome Stability. *Stem Cells*. 2005;23(9):1357–66.
 63. FRIEDENSTEIN AJ. THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MARROW AND SPLEEN CELLS MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE. *Cell Tissue Kinet*. 1970;393–403.
 64. FRIEDENSTEIN AJ. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974;2(2):83–92.
 65. Lanza, R.; Gearhart J. *Essentials of Stem Cell Biology, Mesenchymal Stem*

- Cells. Elsevier Acad Press. 2006;7(2):205–10.
66. Hou ZL, Liu Y, Mao XH, Wei CY, Meng MY, Liu YH, et al. Transplantation of umbilical cord and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a patient with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Cell Adhes Migr*. 2013;7(5):404–7.
 67. Ayatollahi M, Geramizadeh B, Zakerinia M, Ramzi M, Yaghobi R, Hadadi P, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell: A source for cell-based therapy. *Int J Organ Transplant Med*. 2012;3(1):32–9.
 68. Bronckaers A, Hilkens P, Martens W, Gervois P, Ratajczak J, Struys T, et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2014;143(2):181–96.
 69. Kwon HM, Hur SM, Park KY, Kim CK, Kim YM, Kim HS, et al. Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis. *Vascul Pharmacol* [Internet]. 2014;63(1):19–28.
 70. Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells*. 2019;37(7):855–64.
 71. Wu L, Leijten J, Van Blitterswijk CA, Karperien M. Fibroblast growth factor-1 is a mesenchymal stromal cell-secreted factor stimulating proliferation of osteoarthritic chondrocytes in co-culture. *Stem Cells Dev*. 2013;22(17):2356–67.
 72. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote In Vitro and In Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms. *Circ Res*. 2004;94(5):678–85.
 73. Imberti B, Morigi M, Tomasoni S, Rota C, Corna D, Longaretti L, et al. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell-mediated renal repair. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(11):2921–8.
 74. Dufourcq P, Descamps B, Tojais NF, Leroux L, Oses P, Daret D, et al. Secreted Frizzled-Related Protein-1 Enhances Mesenchymal Stem Cell Function in Angiogenesis and Contributes to Neovessel Maturation. *Stem Cells*. 2008;26(11):2991–3001.
 75. Mirotso M, Zhang Z, Deb A, Zhang L, Gneccchi M, Noiseux N, et al. Secreted

- frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(5):1643–8.
76. Block GJ, Ohkouchi S, Fung F, Frenkel J, Gregory C, Pochampally R, et al. Multipotent Stromal Cells Are Activated to Reduce Apoptosis in Part by Upregulation and Secretion of Stanniocalcin-1. *Stem Cells*. 2009;27(3):670–81.
 77. Baglio SR, Rooijers K, Koppers-Lalic D, Verweij FJ, Pérez Lanzón M, Zini N, et al. Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Res Ther [Internet]*. 2015;6(1):1–20.
 78. Kim YJ, Kim HK, Cho HK, Bae YC, Suh KT, Jung JS. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(6):867–76.
 79. Sun L, Cui M, Wang Z, Feng X, Mao J, Chen P, et al. Mesenchymal stem cells modified with angiopoietin-1 improve remodeling in a rat model of acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;357(3):779–84.
 80. Chen L, Xu Y, Zhao J, Zhang Z, Yang R, Xie J, et al. Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS One*. 2014;9(4).
 81. Ma T, Chen Y, Chen Y, Meng Q, Sun J, Shao L, et al. MicroRNA-132, Delivered by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes, Promote Angiogenesis in Myocardial Infarction. *Stem Cells Int [Internet]*. 2018;2018:1–11.
 82. Nicola M Di, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838–43.
 83. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human Leukocyte Antigen-G5 Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells Is Required to Suppress T Lymphocyte and Natural Killer Function and to Induce CD4 + CD25 high FOXP3 + Regulatory T Cells. *Stem Cells*. 2008;26(1):212–22.

84. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for Interferon- γ in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):386–98.
85. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004;103(12):4619–21.
86. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007;109(1):228–34.
87. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1 α . *J Cell Physiol*. 1996;166(3):585–92.
88. Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA. Intrapulmonary Delivery of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Survival and Attenuates Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Mice. *J Immunol*. 2007;179(3):1855–63.
89. Nasef A, Mazurier C, Bouchet S, François S, Chapel A, Thierry D, et al. Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunol*. 2008;253(1–2):16–22.
90. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009;15(1):42–9.
91. Miller SD. Zimmer Biomet Bone Marrow Aspiration.
92. Yandow SM, Van De Velde SK, Siebert J, Perkins SL. The Influence of Aspiration Volume on the Number of Osteoblastic Progenitors Obtained from Bone Marrow in Children. *J Pediatr Orthop*. 2019;39(7):382–6.
93. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(4):568–84.
94. Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cell: Use and perspective. *Hematol J*. 2003;4(2):92–6.
95. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause

- DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2006;8(4):315–7.
96. Nash ME, Fan X, Carroll WM, Gorelov A V., Barry FP, Shaw G, et al. Thermoresponsive Substrates used for the Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells and the Preservation of Immunophenotype. *Stem Cell Rev Reports*. 2013;9(2).
 97. Wu M, Zhang R, Zou Q, Chen Y, Zhou M, Li X, et al. Comparison of the Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Human Placenta and Umbilical Cord. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–9.
 98. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*. 2005;52(8):2521–9.
 99. Danišovič L, Varga I, Polák Š, Uličná M, Hlavačková L, Böhmer D, et al. Comparison of in vitro chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Gen Physiol Biophys*. 2009;28(1):56–62.
 100. Gasiūnienė M, Zentelytė A, Wojtas B, Baronaitė S, Krasovskaja N, Savickienė J, et al. DNA methyltransferases inhibitors effectively induce gene expression changes suggestive of cardiomyogenic differentiation of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells via chromatin remodeling. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13(3):469–81.
 101. Park J, Lee JH, Yoon BS, Jun EK, Lee G, Kim IY, et al. Additive effect of bFGF and selenium on expansion and paracrine action of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):1–17.
 102. Charbord P, Livne E, Gross G, Häupl T, Neves NM, Marie P, et al. Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Reappraisal Via the Genostem Experience. *Stem Cell Rev Reports*. 2011;7(1):32–42.
 103. Wang WG, Lou SQ, Ju XD, Xia K, Xia JH. In vitro chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells in monolayer culture: Activation by transfection with TGF- β 2. *Tissue Cell*. 2003;35(1):69–77.

104. Violini S, Ramelli P, Pisani LF, Gorni C, Mariani P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol.* 2009;10:1–10.
105. Delorme B, Ringe J, Pontikoglou C, Gaillard J, Langonné A, Sensebé L, et al. Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells.* 2009;27(5):1142–51.
106. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues. *Stem Cells.* 2008;26(7):1787–95.
107. Wang YX. Porcine tooth germ cell conditioned medium can induce odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2011;354–362.
108. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng.* 2006;12(10):2813–23.
109. Luo L, He Y, Wang X, Key B, Lee BH, Li H, et al. Potential roles of dental pulp stem cells in neural regeneration and repair. *Stem Cells Int.* 2018;2018.
110. Lu H, Wang F, Mei H, Wang S, Cheng L. Human adipose mesenchymal stem cells show more efficient angiogenesis promotion on endothelial colony-forming cells than umbilical cord and endometrium. *Stem Cells Int.* 2018;2018.
111. Wang X, Liu L, Mou S, Zhao H, Fang J, Xiang Y, et al. Investigation of platelet-rich plasma in increasing proliferation and migration of endometrial mesenchymal stem cells and improving pregnancy outcome of patients with thin endometrium. *J Cell Biochem.* 2019;120(5):7403–11.
112. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000;2(6):477–88.
113. Sabapathy V, Ravi S, Srivastava V, Srivastava A, Kumar S. Long-term cultured human term placenta-derived mesenchymal stem cells of maternal origin displays plasticity. *Stem Cells Int.* 2012;2012.
114. Oliveira MS. Placental-derived stem cells: Culture, differentiation and

- challenges. *World J Stem Cells*. 2015;7(4):769.
115. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res*. 2007;327(3):449–62.
 116. De Bari C, Dell’Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol*. 2003;160(6):909–18.
 117. Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E, Rupf T, Salvetter J, Schulz-Siegmund M, et al. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol*. 2008;17(11):925–32.
 118. Vishnubalaji R, Manikandan M, Al-Nbaheen M, Kadalmani B, Aldahmash A, Alajez NM. In vitro differentiation of human skin-derived multipotent stromal cells into putative endothelial-like cells. *BMC Dev Biol* [Internet]. 2012;12(1):7.
 119. Shi CM, Cheng TM. Differentiation of dermis-derived multipotent cells into insulin-producing pancreatic cells in vitro. *World J Gastroenterol*. 2004;10(17):2550–2.
 120. Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, et al. CD105(+) cells from Wharton’s jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med*. 2006;18(6):1089–96.
 121. Wu KH, Zhou B, Lu SH, Feng B, Yang SG, Du WT, et al. In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J Cell Biochem*. 2007;100(3):608–16.
 122. Bellows CG, Heersche JNM, Aubin JE. Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Dev Biol*. 1990;140(1):132–8.
 123. Liu F, Aubin JE, Malaval L. Expression of leukemia inhibitory factor (LIF)/interleukin-6 family cytokines and receptors during in vitro osteogenesis: Differential regulation by dexamethasone and LIF. *Bone*. 2002;31(1).
 124. Kemp KC, Hows J, Donaldson C. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leuk Lymphoma*. 2005;46(11):1531–44.

125. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* 1998;4(4):415–28.
126. An C, Cheng Y, Yuan Q, Li J. IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells. *Ann Biomed Eng.* 2010;38(4):1647–54.
127. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(12):885–96.
128. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem.* 1997;272(6):3406–10.
129. Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J.* 2004;18(9).
130. Liu Y, Jiang X, Zhang X, Chen R, Sun T, Fok KL, et al. Dedifferentiation-reprogrammed mesenchymal stem cells with improved therapeutic potential. *Stem Cells.* 2011;29(12):2077–89.
131. dos Santos Picanco LC, Ozela PF, de Fatima de Brito Brito M, Pinheiro AA, Padilha EC, Braga FS, et al. Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. *Curr Med Chem.* 2016;25(26).
132. Mroczko B, Groblewska M, Litman-Zawadzka A, Kornhuber J, Lewczuk P. Cellular receptors of amyloid β oligomers (A β O) in Alzheimer's disease. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences.* 2018.
133. Zheng JJ, Li WX, Liu JQ, Guo YC, Wang Q, Li GH, et al. Low expression of aging-related NRXN3 is associated with Alzheimer disease: A systematic review and meta-analysis. Vol. 97, *Medicine (United States).* 2018.
134. Avanzino L, Lagravinese G, Abbruzzese G, Pelosin E. Relationships between gait and emotion in Parkinson's disease: A narrative review. Vol. 65, *Gait and Posture.* 2018.
135. Kalia L V., Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet [Internet].* 2015;386(9996):896–912.
136. Osterhaus A, Groen J, Bildt M Van De, Martina B, Vos J, Egmond H Van. a -

- Synuclein in Lewy bodies Endogenous proviruses as “ mementos ”? *Nature*. 1997;388:839–40.
137. Stoker TB, Barker RA. Regenerative Therapies for Parkinson’s Disease: An Update. *BioDrugs*. 2018;
 138. Lassmann H. Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. Vol. 333, *Journal of the Neurological Sciences*. 2013.
 139. Kishore A, Kanaujia A, Nag S, Rostami AM, Kenyon LC, Shindler KS, et al. Different mechanisms of inflammation induced in virus and autoimmune-mediated models of multiple sclerosis in C57BL6 mice. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
 140. Xiao J, Yang R, Biswas S, Zhu Y, Qin X, Zhang M, et al. Neural Stem Cell-Based Regenerative Approaches for the Treatment of Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol*. 2018;55(4):3152–71.
 141. Lassmann H. The New Pathology of Multiple Sclerosis. *Mult Scler*. 2000;6(6):409–10.
 142. Pandey M, Rajamma U. Huntington’s disease: the coming of age. *J Genet [Internet]*. 2018;97(3):649–64.
 143. Heath PR, Kirby J, Shaw PJ. Investigating cell death mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis using transcriptomics. Vol. 7, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2013.
 144. Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. Vol. 17, *Nature Neuroscience*. 2014.
 145. Ryu HH, Jun MH, Min KJ, Jang DJ, Lee YS, Kim HK, et al. Autophagy regulates amyotrophic lateral sclerosis-linked fused in sarcoma-positive stress granules in neurons. *Neurobiol Aging*. 2014;35(12).
 146. Satoh J-I, Yamamoto Y, Kitano S, Takitani M, Asahina N, Kino Y. Molecular Network Analysis Suggests a Logical Hypothesis for the Pathological Role of C9orf72 in Amyotrophic Lateral Sclerosis/Frontotemporal Dementia. *J Cent Nerv Syst Dis*. 2014;6.
 147. Leal SS, Cardoso I, Valentine JS, Gomes CM. Calcium ions promote superoxide dismutase 1 (SOD1) aggregation into non-fibrillar amyloid: A link to toxic effects of calcium overload in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)? *J*

- Biol Chem. 2013;288(35).
148. Sreedharan J, Brown RH. Amyotrophic lateral sclerosis: Problems and prospects. *Ann Neurol*. 2013;74(3).
 149. Nishimura AL, Shum C, Scotter EL, Abdelgany A, Sardone V, Wright J, et al. Allele-specific knockdown of ALS-associated mutant TDP-43 in neural stem cells derived from induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2014;9(3).
 150. Kabashi E, Lin L, Tradewell ML, Dion PA, Bercier V, Bourguoin P, et al. Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Hum Mol Genet*. 2009;19(4).
 151. Bilican B, Serio A, Barmada SJ, Nishimura AL, Sullivan GJ, Carrasco M, et al. Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(15).
 152. Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, et al. Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med*. 2012;4(145).
 153. Shojaei F, Rahmati S, Banitalebi Dehkordi M. A review on different methods to increase the efficiency of mesenchymal stem cell-based wound therapy. *Wound Repair Regen*. 2019;27(6):661–71.
 154. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, et al. Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-inflammatory Protein TSG-6. *Cell Stem Cell*. 2009;5(1).
 155. Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): Controversies, myths, and changing paradigms. Vol. 17, *Molecular Therapy*. 2009.
 156. Jinfeng L, Yunliang W, Xinshan L, Yutong W, Shanshan W, Peng X, et al. Therapeutic Effects of CUR-Activated Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on 1-Methyl-4-phenylpyridine-Induced Parkinson's Disease Cell Model. *Biomed Res Int*. 2016;2016:9140541.
 157. Salem AM, Ahmed HH, Atta HM, Ghazy MA, Aglan HA. Potential of bone marrow mesenchymal stem cells in management of Alzheimer's disease in

- female rats. *Cell Biol Int*. 2014;38(12).
158. Bali P, Lahiri D, Banik A, Nehru B, Anand A. Potential for Stem Cells Therapy in Alzheimer's Disease: Do Neurotrophic Factors Play Critical Role? *Curr Alzheimer Res*. 2016;14(2):208–20.
 159. Wei Y, Xie Z, Bi J, Zhu Z. Anti-inflammatory effects of bone marrow mesenchymal stem cells on mice with alzheimer's disease. *Exp Ther Med*. 2018;16(6).
 160. Huang P, Freeman WD, Edenfield BH, Brott TG, Meschia JF, Zubair AC. Safety and Efficacy of Intraventricular Delivery of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Hemorrhagic Stroke Model. *Sci Rep*. 2019;9(1).
 161. Lekishvili T, Hesketh S, Brazier MW, Brown DR. Mouse galectin-1 inhibits the toxicity of glutamate by modifying NR1 NMDA receptor expression. *Eur J Neurosci*. 2006;24(11).
 162. Goodarzi P, Aghayan HR, Larijani B, Soleimani M, Dehpour AR, Sahebjam M, et al. Stem cell-based approach for the treatment of Parkinson's disease. *Med J Islam Repub Iran*. 2015;29.
 163. Kitada M, Dezawa M. Parkinson's disease and mesenchymal stem cells: Potential for cell-based therapy. *Parkinson's Disease*. 2012.
 164. Park BN, Kim JH, Lee K, Park SH, An YS. Improved dopamine transporter binding activity after bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of Parkinson's disease: small animal positron emission tomography study with F-18 FP-CIT. *Eur Radiol*. 2015;25(5).
 165. Venkataramana NK, Kumar SKV, Balaraju S, Radhakrishnan RC, Bansal A, Dixit A, et al. Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl Res [Internet]*. 2010;155(2):62–70.
 166. Venkataramana NK, Pal R, Rao SAV, Naik AL, Jan M, Nair R, et al. Bilateral transplantation of allogenic adult human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the subventricular zone of Parkinson's disease: A pilot clinical study. *Stem Cells Int*. 2012;2012.
 167. Yamout B, Hourani R, Salti H, Barada W, El-Hajj T, Al-Kutoubi A, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple

- sclerosis: A pilot study. *J Neuroimmunol.* 2010;227(1–2).
168. Martino G, Franklin RJM, Van Evercooren AB, Kerr DA. Stem cell transplantation in multiple sclerosis: Current status and future prospects. Vol. 6, *Nature Reviews Neurology.* 2010.
 169. Uccelli A, Laroni A, Brundin L, Clanet M, Fernandez O, Nabavi SM, et al. MEsenchymal StEm cells for Multiple Sclerosis (MESEMS): A randomized, double blind, cross-over phase I/II clinical trial with autologous mesenchymal stem cells for the therapy of multiple sclerosis. *Trials.* 2019;20(1).
 170. Syková E, Rychmach P, Drahorádová I, Konrádová Š, Růžičková K, Voříšek I, et al. Transplantation of mesenchymal stromal cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: Results of phase I/IIa clinical trial. *Cell Transplant.* 2017;26(4).
 171. Nabavi SM, Arab L, Jarooghi N, Bolurieh T, Abbasi F, Mardpour S, et al. Safety, feasibility of intravenous and intrathecal injection of autologous bone marrow derived mesenchymal stromal cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: An open label phase I clinical trial. *Cell J.* 2019;20(4).
 172. Oh K-W, Moon C, Kim HY, Oh S, Park J, Lee JH, et al. Phase I Trial of Repeated Intrathecal Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(6).
 173. Kalladka D, Muir KW. Brain repair: Cell therapy in stroke. Vol. 7, *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications.* 2014.
 174. Hong SQ, Zhang HT, You J, Zhang MY, Cai YQ, Jiang XD, et al. Comparison of transdifferentiated and untransdifferentiated human umbilical mesenchymal stem cells in rats after traumatic brain injury. *Neurochem Res.* 2011;36(12).
 175. Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M, Amar AP, Brawanski A, et al. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery.* 2003;53(3).
 176. Yan ZJ, Zhang P, Hu YQ, Zhang HT, Hong SQ, Zhou HL, et al. Neural stem-like cells derived from human amnion tissue are effective in treating traumatic brain injury in rat. *Neurochem Res.* 2013;38(5).
 177. Nagai A, Kim WK, Lee HJ, Jeong HS, Kim KS, Hong SH, et al. Multilineage potential of stable human mesenchymal stem cell line derived from fetal

- marrow. *PLoS One*. 2007;2(12).
178. Yoo SW, Kim SS, Lee SY, Lee HS, Kim HS, Lee YD, et al. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. *Exp Mol Med*. 2008;40(4).
 179. Maltman DJ, Hardy SA, Przyborski SA. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. Vol. 59, *Neurochemistry International*. 2011.
 180. Budoni M, Fierabracci A, Luciano R, Petrini S, Di Ciommo V, Muraca M. The immunosuppressive effect of mesenchymal stromal cells on B lymphocytes is mediated by membrane vesicles. *Cell Transplant*. 2013;22(2).
 181. Hawryluk GWJ, Mothe A, Wang J, Wang S, Tator C, Fehlings MG. An in vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury. *Stem Cells Dev*. 2012;21(12).
 182. Kemp K, Hares K, Mallam E, Heesom KJ, Scolding N, Wilkins A. Mesenchymal stem cell-secreted superoxide dismutase promotes cerebellar neuronal survival. *J Neurochem*. 2010;114(6).
 183. Chen YT, Sun CK, Lin YC, Chang LT, Chen YL, Tsai TH, et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Protects Kidneys against Ischemia-Reperfusion Injury through Suppressing Oxidative Stress and Inflammatory Reaction. *J Transl Med*. 2011;9.
 184. Kim HS, Choi DY, Yun SJ, Choi SM, Kang JW, Jung JW, et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J Proteome Res*. 2012;11(2).
 185. Tomasoni S, Longaretti L, Rota C, Morigi M, Conti S, Gotti E, et al. Transfer of growth factor receptor mRNA via exosomes unravels the regenerative effect of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2013;22(5).
 186. Arboleda D, Forostyak S, Jendelova P, Marekova D, Amemori T, Pivonkova H, et al. Transplantation of predifferentiated adipose-derived stromal cells for the treatment of spinal cord injury. *Cell Mol Neurobiol*. 2011;31(7).
 187. Lu D, Li Y, Wang L, Chen J, Mahmood A, Chopp M. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury.

- J Neurotrauma. 2001;18(8).
188. Mahmood A, Lu D, Wang L, Chopp M. Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2002;19(12).
 189. Bhang SH, Lee YE, Cho SW, Shim JW, Lee SH, Choi CY, et al. Basic fibroblast growth factor promotes bone marrow stromal cell transplantation-mediated neural regeneration in traumatic brain injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;359(1).
 190. Liu Y, Yi XC, Guo G, Long QF, Wang XA, Zhong J, et al. Basic fibroblast growth factor increases the transplantation-mediated therapeutic effect of bone mesenchymal stem cells following traumatic brain injury. *Mol Med Rep*. 2014;9(1):333–9.
 191. Gordon D, Scolding NJ. Human mesenchymal stem cell culture for neural transplantation. *Methods Mol Biol*. 2009;549.
 192. Raedt R, Pinxteren J, Van Dycke A, Waeytens A, Craeye D, Timmermans F, et al. Differentiation assays of bone marrow-derived Multipotent Adult Progenitor Cell (MAPC)-like cells towards neural cells cannot depend on morphology and a limited set of neural markers. *Exp Neurol*. 2007;203(2).
 193. Caldwell MA, He X, Wilkie N, Pollack S, Marshall G, Wafford KA, et al. Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nat Biotechnol*. 2001;19(5).
 194. Johansson PA, Cappello S, Götz M. Stem cells niches during development—lessons from the cerebral cortex. Vol. 20, *Current Opinion in Neurobiology*. 2010.
 195. Moreno Davila H. Molecular and functional diversity of voltage-gated calcium channels. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;868.
 196. Hermann A, Liebau S, Gastl R, Fickert S, Habisch HJ, Fiedler J, et al. Comparative analysis of neuroectodermal differentiation capacity of human bone marrow stromal cells using various conversion protocols. *J Neurosci Res*. 2006;83(8).
 197. Gustafsson E, Andsberg G, Darsalia V, Mohapel P, Mandel RJ, Kirik D, et al. Anterograde delivery of brain-derived neurotrophic factor to striatum via nigral

transduction of recombinant adeno-associated virus increases neuronal death but promotes neurogenic response following stroke. *Eur J Neurosci.* 2003;17(12).

198. Montzka K, Lassonczyk N, Tschöke B, Neuss S, Führmann T, Franzen R, et al. Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: Misleading marker gene expression. *BMC Neurosci.* 2009;10.
199. Hayashi T, Wakao S, Kitada M, Ose T, Watabe H, Kuroda Y, et al. Autologous mesenchymal stem cell-derived dopaminergic neurons function in parkinsonian macaques. *J Clin Invest.* 2013;123(1).
200. Park J, Lee N, Lee J, Choe EK, Kim MK, Lee J, et al. Small molecule-based lineage switch of human adipose-derived stem cells into neural stem cells and functional GABAergic neurons. *Sci Rep.* 2017;7(1).
201. Lindsay SL, Barnett SC. Are nestin-positive mesenchymal stromal cells a better source of cells for CNS repair? *Neurochem Int.* 2017;106.
202. Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo J-M, Moonen G, Rogister B. Plasticity of Cultured Mesenchymal Stem Cells: Switch from Nestin-Positive to Excitable Neuron-Like Phenotype. *Stem Cells.* 2005;23(3).
203. DiMarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. Vol. 4, *Frontiers in Immunology.* 2013.
204. Khoo MLM, Tao H, Meedeniya ACB, Mackay-Sim A, Ma DDF. Transplantation of neuronal-primed human bone marrow mesenchymal stem cells in Hemiparkinsonian rodents. *PLoS One.* 2011;6(5).

9. EKLER



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Bilimsel Araştırma Projeleri Daire Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 86770134-604.02.02-E.61957
Konu : Proje Kabul

19/11/2019

Sayın, Dr. Öğr. Üyesi Nihal KARAKAŞ

Proje Adı: İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerinin Fonksiyonel Nöronlara Farklılaştırılması

Yürütücüsü olduğunuz, yukarıda adı geçen “2019-14” numaralı projenizin Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından incelenerek desteklenmesine karar verilmiştir.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. B. Ufuk ŞAKUL
Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı
Başkan V.

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Bayram Ufuk Sakul tarafından 19.11.2019 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağımızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 9E2C162AXD kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacak Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacak Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.44527
Konu : Etik Kurulu Kararı

09/10/2018

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nihal KARAKAŞ

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “İnsan mezenkimal kök hücrelerinin fonksiyonel nöron hücrelerine farklılaştırılması” isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Ek:
-Karar Formu (2 sayfa)

**Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 09.10.2018 tarihinde e-imzalanmıştır.
Evrakımızı <https://cbys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 9D409087X1 kodu ile doğrulayabilirsiniz.**

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacak Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacak Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

| | | | | | |
|--------------------------|---|--|--|---|--|
| BAŞVURU BİLGİLERİ | ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI | İnsan mezenkimal kök hücrelerinin fonksiyonel nöron hücrelerine farklılaştırılması | | | |
| | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI | Dr. Öğr. Üyesi Nihal KARAKAŞ | | | |
| | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI | Tıbbi Biyoloji | | | |
| | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ | İstanbul | | | |
| | DESTEKLEYİCİ | - | | | |
| | ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER | TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> | ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/> | ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/> | ULUSLARARASI <input type="checkbox"/> |

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

| Değerlendirilen Belgeler | Belge Adı | Tarihi | Versiyon Numarası | Dili |
|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------|--|---|
| | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI | | | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
| BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU | | | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> | |
| Karar No: 555 | | Tarih: 05/10/2018 | | |

* :Toplantıda Bulunma



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-772.02-E.58330
Konu : Etik Kurulu Kararı

26/10/2020

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nihal KARAKAŞ

Üniversitemizin Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 05/10/2018 tarihli 555 karar no ile onay verilen "İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerinin Fonksiyonel Nöron Hücrelerine Farklılaştırılması" isimli çalışmanızın başlığını "İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerinin Fonksiyonel Nöronlara Farklılaştırılması" olarak değiştirilmesi isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Dr. Öğr Üyesi Mahmut TOKAÇ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Dr. Öğr. Üyc. Mahmut TOKAÇ tarafından 26.10.2020 tarihinde e-imzalanmıştır.
Evrakımızı <https://cbys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden F69766A4X3 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacak Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacak Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

| | | | |
|-------------------|---------------------|---------------------|--------|
| Adı | Nurşah | Soyadı | ÖZTUNÇ |
| Doğum Yeri | | Doğum Tarihi | |
| Uyruğu | Türkiye Cumhuriyeti | TC Kimlik No | |
| E-mail | | Tel | |

Eğitim Düzeyi

| | Mezun Olduğu Kurumun Adı | Mezuniyet Yılı |
|-------------------------|---|-----------------------|
| Doktora/Uzmanlık | | |
| Yüksek Lisans | İstanbul Medipol Üniversitesi | 2021 |
| Lisans | Fatih Üniversitesi | 2015 |
| Lise | Yabancı Dil Ağırlıklı Rıfat Canayakın Lisesi | 2008 |

İş Deneyimi

| Görevi | Kurum | Süre |
|-----------------------|---|-------------|
| Laboratuvar Teknikeri | İstanbul Medipol Üniversitesi, TÜSEB 2020-CV-01-8975 | 7 ay |
| Laboratuvar Teknikeri | İstanbul Medipol Üniversitesi, TÜSEB 2019-TA-02-3561 | 9 ay |
| Araştırmacı | İstanbul Medipol Üniversitesi, BAP 2019/14 | 12 ay |

| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama | Konuşma | Yazma |
|------------------------|-------------------------|----------------|--------------|
| İngilizce | İyi | İyi | İyi |

Bilgisayar Bilgisi

| Program | Kullanım becerisi |
|------------------|-------------------|
| Microsoft Office | İyi |

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer

Uluslararası Yayınlar

1. N. Karakaş, S. Bay, N. Türkel, **N. Öztunç**, M. Öncül, H. Bilgen, K. Shah, F. Şahin, G. Öztürk, “Neurons from human mesenchymal stem cells display both spontaneous and stimuli responsive activity”. *Plos One*, 15(5): e0228510, 2020.

Ulusal Yayınlar

1. N. Karakaş, M. E. Okur, **N. Öztunç**, D. Ç. Polat, A. E. Karadağ, “Laurocerasus officinalis Roem. fruit extract induces cell death through caspase mediated apoptosis in gastric cancer cell lines”. *Turk J Biochem*, 1–9, 2021.
2. M. E. Okur, N. Karakaş, A. E. Karadağ, **N. Öztunç**, İ. S. Tosyalı, F. Demirci, “Evaluation of in vitro anti-cancer effects of Styphnolobium japonicum root extract in human colon (HT-9), brain (U-87), and prostate (PC-3) cancer cell lines”. *İstanbul J Pharm*, 50 (2): 103-110, 2020.
3. N. Karakaş, M. E. Okur, **N. Öztunç**, A. E. Karadağ, Ş. Kültür, B. Demirci, “Tilia tomentosa moench çiçeklerinin uçucu bileşenlerinin ve çeşitli in vitro biyolojik aktivitelerinin incelenmesi”. *Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg*, 12(2):220-29, 2019.

Ulusal Bildiriler ve Sözlü Sunumlar

1. **Nurşah Öztunç**, Nihal Karakaş, “İnsan Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerinden Fonksiyonel Nöronların Eldesi”, Sözlü Sunum, 16. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2019.

Sertifikalar

1. “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası”, Sertifika No: İMÜDHK VIII 2016/57C, İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi, 2016.

