ECE İNCEBIYIK

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

CAPSAICIN'İN YAĞ DOKU KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNE ETKİSİ

ECE İNCEBIYIK

DOKTORA

BURSA-2021

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2021

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

CAPSAICIN'İN YAĞ DOKU KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNE ETKİSİ

ECE İNCEBIYIK

(DOKTORA)

DANIŞMAN:
Prof. Dr. Hatice ERDOST

BURSA-2021

T.C.

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum

"Capsaicin'in Yağ Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler Üzerine Etkisi" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Ece İNCEBIYIK

Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU 12/11/2021

Adı Soyadı: Ece İNCEBIYIK

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu: Capsaicin'in Yağ Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler Üzerine Etkisi

ÖZELLİKLER	**UYGUNDUR**	**UYGUN DEĞİLDİR**	**AÇIKLAMA**
Tezin Boyutları	■	❑	
Dış Kapak Sayfası	■	❑	
İç Kapak Sayfası	■	❑	
Kabul Onay Sayfası	■	❑	
Sayfa Düzeni	■	❑	
İçindekiler Sayfası	■	❑	
Yazı Karakteri	■	❑	
Satır Aralıkları	■	❑	
Başlıklar	■	❑	
Sayfa Numaraları	■	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	❑	
Kaynaklar	■	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Hatice Erdost

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN II
KABUL ONAY III
İÇİNDEKİLER IV
TÜRKÇE ÖZET V
İNGİLİZCE ÖZET VI
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Kök Hücre 4
2.2. Kök Hücre Tipleri ve Farklılaşma Potansiyelleri 6
2.2.1. Totipotent Kök Hücreler 7
2.2.2. Pluripotent Kök Hücreler 7
2.2.3. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler 7
2.2.4. Multipotent Kök Hücreler 7
2.2.5. Oligopotent Kök Hücreler 8
2.2.6. Unipotent Kök Hücreler 8
2.3. Elde Edilme Kaynaklarına Göre Kök Hücre Sınıflandırması 8
2.3.1. Embriyonik Kök Hücreler 10
2.3.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler 10
2.3.2.1. Fetal Kök Hücreler 10
2.3.2.2. Göbek Kordonu Kök Hücreleri 10
2.3.2.3. Erişkin Kök Hücreleri 11
2.3.2.4. Kadavra Kök Hücreleri 12
2.4. MKH Fenotipik Karakterizasyonu 13
2.5. Capsaicin 15
3. GEREÇ ve YÖNTEM 17
3.1. Primer Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu 17
3.1.2. Hücre Sayımı 20
3.2. Pasaj 3 Hücrelerin Farklılaştırılması ve Farklılaşmanın Tanımlanması 19
3.2.1.Pasaj 3 Hücrelerin Osteoblastlara Farklılaştırılması ve Tanımlanması 21
3.2.2.Pasaj 3 Hücrelerin Kondroblastlara Farklılaştırılması ve Tanımlanması 22
3.2.3. Pasaj 3 Hücrelerin Adipositlere Farklılaştırılması ve Tanımlanması 21
3.3. Pasaj 3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Fenotipik Karakterizasyonu 21

3.4. Mezenkimal Kök Hücrelere Uygulanacak Capsaicin Dozlarının Hazırlanması ve Deney Planı 23
3.5. Capsaicin Uygulanan Mezenkimal Kök Hücrelerin Proliferasyonu ve Fenotipik Karakterizasyonu 24
3.6. MTT Testi 25
3.7. İstatistiksel Analiz 25
4. BULGULAR 26
4.1. Primer Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Mikrofotoğrafik Değerlendirme 26
4.2. Pasaj 3 Hücrelerinin Farklılaştırılması ve Tanımlanması 32
4.2.1. Pasaj 3 Hücrelerinin Osteoblastlara Farklılaştırılması ve Tanımlanması 32
4.2.2. Pasaj 3 Hücrelerinin Kondroblastlara Farklılaştırılması ve Tanımlanması 33
4.2.3. Pasaj 3 Hücrelerin Adipositlere Farklılaştırılması ve Tanımlanması 35
4.3. Pasaj 3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Fenotipik Karakterizasyonu 36
4.4. Capsaicin'in Mezenkimal Kök Hücre Mitotik Aktivitesi Üzerine Etkisi 38
4.5. Capsaicin'in Mezenkimal Kök Hücre Fenotipi Üzerine Etkileri 42
4.5.1. CD 90 Pozitif Yüzey İşaretleyici 42
4.5.2. CD 105 Pozitif Yüzey İşaretleyici 46
4.5.3. CD 45 Negatif Yüzey İşaretleyici 50
4.5.4. CD 11b Negatif Yüzey İşaretleyici 53
4.6. Capsaicin'in Mezenkimal Kök Hücreler Üzerine Etkisinin MTT ile Değerlendirilmesi 57
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 58
6. KAYNAKLAR 67
7. SİMGELER VE KISALTMALAR 79
8. TEŞEKKÜR 83
9. ÖZGEÇMİŞ 84

TÜRKÇE ÖZET

Canlı organ ve dokularda, kaynak hücre olarak uzun süre canlığını sürdüren, kendini yenileyebilen, farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşebilen, henüz farklılaşmamış hücreler kök hücre olarak tanımlanır. Erişkin memeli canlıdaki mezenkimal kök hücreler (MKH) kolaylıkla ve yüksek oranda bulunan multipotent kök hücrelerdir. Kırmızı acı biberin etken maddesi olan Capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-trans-6-nonenamide) (CAP), alkoloid yapıya sahiptir. Günümüz koşullarında farklı kullanım alanlarına sahip kırmızı acı biber, başlangıçta gıda katkı maddesi olarak kullanılmıştır. CAP'ın 19. yüzyıldan itibaren analjezik etkisinden yararlanılmaya başlanmıştır. Günümüzde araştırma ve ilaç sektöründe kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında; sıçan yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerine farklı doz ve sürelerde uygulanan Capsaicin'in, Ki-67 antikoru ile proliferasyonuna, kök hücre yüzey işaretleyicileri (cluster differentiation CD), CD90, CD105, CD45 ve CD11b ile fenotipik karakterizasyonuna ve MTT testi ile hücre sağ kalımına olası etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Mezenkimal kök hücre (MKH) izolasyonu sonucu elde edilen pasaj 3 hücrelerinin CD90 ve CD105 antikorları ile pozitif; CD11b ve CD45 antikorları ile negatif immunreaksiyonu tanımlandı. Aynı zamanda pasaj 3 hücrelerinin osteoblast, kondroblast ve adiposit hücrelerine farklılaştırmaları gerçekleştirildi. Daha sonra pasaj 3 MKH hücrelerine 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 μM CAP dozları 24 ve 48 saat süre ile uygulandı. Bu hücrelerin MKH özelliklerine CAP'ın etkisi; Ki-67, CD90, CD105, CD11b ve CD45 antikorlarının immunreaksiyonları ile değerlendirildi. CAP uygulamasının hücrelerdeki sağ kalım düzeyi ise MTT testi ile incelendi.

Sonuç olarak; yağ doku kökenli pasaj 3 mezenkimal kök hücrelerinde; 24 saat süre ile 5, 10 ve 25 μM CAP dozlarının mezenkimal kök hücre fenotipini değiştirmeden kök hücre proliferasyonunu ve kök hücre sağ kalımını arttırdığı saptandı. Ancak 24 ve 48 saatlik 50 μM ve üzeri uygulanan CAP dozlarının hücresel farklılaşmayı indüklediği, hücre canlılığı ve proliferasyonu azalttığı belirlendi.

İNGİLİZCE ÖZET

Stem cells are defined as the cells that have the ability to renew themselves, differentiate into other tissue cells and survive for a long time as source cells in living organ and tissues. Mesenchymal stem cells (MSCs) in adult mammals are multipotent stem cells that are readily and highly prevalent in mammals. Capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-trans-6-nonenamide), the active ingredient of red hot chili pepper, (CAP) has an alkaloid structure. Red hot chili pepper, which has different uses nowadays, was initially used as a food additive. CAP has been used for its analgesic effect since the 19th century. It is currently being utilized in research and pharmaceutical industry.

In this thesis study; the effect of CAP on cell proliferation using Ki-67 antibody, phenotypic characterization with stem cell surface markers, cluster differentiation, CD90, CD105, CD45 and CD11b, and on cell survival using MTT test in mesenchymal stem cells obtained from rat adipose tissue at different doses and times.

Positive immunoreaction of CD90 and CD105 and negative immunoreaction of CD11b and CD45 markers were determined in passage 3 cells that were obtained by mesenchymal stem cell (MSC) isolation. At the same time, differentiations of osteoblast, chondroblast and adipocyte in passage 3 cells were determined. Then, 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 μM CAP doses were applied to passage 3 MSC cells for 24 and 48 hours. The effect of CAP on MSC properties of these cells was evaluated by immunoreactions of Ki-67, CD90, CD105, CD11b and CD45 antibodies. Cellular survival upon CAP treatment was examined by MTT test.

As a result; in adipose tissue-derived passage 3 mesenchymal stem cells, it was determined that CAP at 5, 10 and 25 μM CAP doses for 24 hours increased stem cell proliferation and stem cell survival without affecting the mesenchymal stem cell phenotype. However, it was determined that CAP at doses of 50 μM and above applied for 24 and 48 hours induced cellular differentiation while decreasing cell viability and proliferation.

1. GİRİŞ

Kendi kendini yenileyebilen, canlı organ ve dokularda kaynak hücre olarak uzun süre yaşayabilen, vücudun ihtiyacı olduğunda farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşebilen henüz farklılaşmamış hücreler ‘’kök hücre’’ olarak tanımlanır (Can, 2008). Kök hücreler, üç germ yaprağına farklılaşma yeteneği gösterirler. Farklılaşma potansiyellerine göre; totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent kök hücreler olarak sınıflandırılır. Totipotent özellik gösteren tek kök hücre tipi, embriyonun gelişim sürecinde iç hücre kitlesindeki blastomer hücreleridir. Canlı bir organizmayı oluşturabilen en yüksek potansiyelde olan hücrelerdir. Pluripotent kök hücreler ise totipotent kök hücreler gibi tüm dokuları oluşturabilir, ancak tamamıyla canlı bir organizmayı oluşturamaz (Can, 2008; Caplan, 2017; Lakshmipathy & Verfaillie, 2005). Multipotent özellikte olan mezenkimal kök hücreler (MKH) ise erişkin bireylerin dokularında var olan, tek bir germ yaprağına ait ve birbirine yakın hücre gruplarına farklılaşabilen hücrelerdir (Caplan, 1991). Özellikle erişkin dokulardan izole edilen kök hücreler MKH karakterine sahip olup; kemik iliği, yağ dokusu, diş pulpası, merkezi sinir sistemi, deri epidermisi, sindirim kanalı, iskelet kası, kornea, retina, pankreas, karaciğer, kalp ve akciğer gibi çeşitli dokulardan izole edilebilmektedir (Zuk ve ark., 2001, 2002).

MKH, başta bağ doku kökenli hücreler olmak üzere çeşitli hücrelere farklılaşmaları, gelişme faktörleri sentezlemeleri, canlının doku ve organ rejenerasyonuna katkıda bulunmaları, *in vitro* ortamda kolaylıkla çoğaltılabilmeleri, hasarlı dokuya göç yetenekleri ve immun-supressor özellikleri nedeniyle birçok klinik uygulamada kullanım potansiyeline sahiptirler (Gimble, 2003).

Günümüzde *in vitro* ortamda üretilen kök hücreler doğrudan tedavi amaçlı olarak kas hastalıkları, iskemik kalp hasarı, miyokard enfarktüsü, otoimmun hastalıklar, enteropatiler, chron hastalığı, tendinit, osteoartrit, romatoid artrit, intervertebral disk dejenerasyonu, lumbal disk dejenerasyonu, akut ve kronik böbrek

yetmezlikleri gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Çerçi, & Erdost, 2019). Ayrıca hematopoietik kökenli MKH'lerin *in vivo* ve *in vitro* radyasyon hasarından da hücreleri koruyabildiği bildirilmiştir (Phinney, & Pittenger, 2017). 500 cGy radyasyona maruz kalan farelere kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin intravenöz yolla uygulanmasında; periferik kan sayımlarının kısmen geri kazanıldığı ve kemik iliği aşılamasının hücresel rejenerasyonu sağladığı belirtilmiştir (Wen ve ark., 2016). MKH'ler direk immun sistem hücrelerinin uyarılmasını sağlayarak inflamatuar hastalıklarda terapötik etkiler de göstermektedir (Wen ve ark., 2016). Webb ve Webb (2015) çalışmalarında; kedilerde kronik böbrek hasarında insanlara uygulanan benzer tedavi dozu olan 2×10^6 hücre/kg allogenik kök hücrenin serum fizyolojik içeriğinde 20 dakika süresince intravenöz transplantasyonunu uygulayarak plasebo grubuna göre kök hücre transplante edilen kedilerde hücrelerin yenilenmesi ve hasarın gerilemesi açısından etkinliğinin olumlu olduğunu belirtmişlerdir. MKH'lerin anti-katabolik, anti-enflamatuar ve immunmodülasyon özellikleri sayesinde osteoartrit ve romatoid artrit dejenerasyonları için terapötik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Richardson ve ark., 2016). Kök hücreler, büyüme faktörleri ve sinyal moleküllerine oldukça duyarlı olup hızla yanıt vererek TNF, Notch, Wnt ve Jak/Stat gibi sinyal yolaklarını etkin biçimde kullanırlar, bu özellikleri ile rejeneratif tıp alanında pek çok hastalık için kullanılabilirliği araştırma konusudur (Christ, Saul, Furth, & Andersson, 2013).

Capsaicin (CAP); kırmızı acı bibere acılığını veren alkaloid yapıda [N-vanillyl-8-methyl-alpha- nonenamid - C18H27NO3] bir bileşendir. Vanilloidlerin bağlandığı reseptörler vanilloid reseptör (VR) olarak tanımlanır. CAP'ın organizmada spesifik bir ligand olarak bağlandığı reseptör, vanilloid reseptör-1 (VR-1 / TRPV-1)'dir (Kim ve ark., 2004). CAP'ın karbonhidrat metabolizmasını ve karaciğer enzim aktivitesini arttırdığı lipid metabolizmasını uyararak, yağ dokudan lipitlerin mobilizasyonunu kolaylaştırdığı, oksijen tüketimini arttırdığı, solunumu başlangıçta arttırdığı sonra azalttığı, serum glikoz ve insulin seviyesini arttırdığı, karaciğer glikojeninde hızlı bir azalmayla birlikte serum trigliseridlerinde dereceli artış sağladığı, dolaşım sisteminin fonksiyonuna yardımcı olduğu ve bunun sonucunda metabolizma üzerine genel uyarıcı etki yaptığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Caterina ve ark., 1997; Bevan, 1999; Erdost, 2004; Diaz-Laviada,

2010). Ayrıca CAP'ın; pankreas, kolon, prostat, karaciğer, özofagus, deri, idrar kesesi, akciğer ve endotel hücreleri gibi birçok farklı kanser hücre hattında apoptozu indüklediği belirtilmiştir (Hsu, & Yen, 2007; D'Eliseo, Manzi, & Velotti, 2013; Chapa-Oliver & Mejía-Teniente, 2016). İnsan glioblastoma hücrelerinde (A172) apoptozun süreye ve doza bağlı olarak arttırdığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda, reaktif oksijen türevi (ROS) bileşenlerin inhibisyonu, eliminasyonu veya inaktivasyonuna bağlı olarak hücresel sağ-kalımın azalması ile apoptotik hücre ölümünün artmış olduğu saptanmıştır (Lee ve ark., 2000). *In vitro* uygulamalarda 200 μM ve üzerindeki CAP dozlarının; glioblastoma nöron kanser hücre hattında apoptozu başlatarak deoksiribonükleik asit (DNA) fragmantasyonu sonucu kalıcı hasar oluşturmaya başladığı belirtilmiştir (Lee ve ark., 2000). CAP'ın TRPV1 bağımlı veya TRPV1'den bağımsız mekanizmalar aracılığı ile kanser gelişimini baskıladığı görülmüştür (Skrzypski ve ark., 2014). Ayrıca CAP'ın *in vitro* uygulamasında insan adenorkarsinomlu pankreas hücre hatları olan AsPC-1 ve BxPC-3 hücrelerinde intrasellüler kalsiyum seviyesinin arttığı, lipid peroksidasyonunun bazal üretimini de azalttığı ve kanser hücrelerinin mitokondriyal potansiyelini değiştirerek; insan pankreatik adenokarsinom hücrelerinde apoptoz oluşturduğunu saptamışlardır (Skrzypski ve ark., 2014). Bir başka araştırmada (Güler, & Zık, 2018) CAP'ın ovaryum granüloza hücrelerinde *in vitro* ortamda proliferasyonu uyardığı ve ovaryumdaki folikül gelişimini arttırdığı bildirilmiştir. Mızrak ve ark., (2003) CAP'ın *in vitro* ortamda erişkin sıçan spermatogenik hücre hatlarında proliferasyona ve bu süreçte gözlenen apoptozise etkilerini inceleyerek, 200 μM dozda 24 saat CAP uygulamasının germ hücre hatları olan Gc-5spg ve Gc-6spg'da; spermatogonial germ hücrelerinde apoptotik hücreleri arttırdığını saptamışlardır (Mızrak ve ark., 2003).

Bu tez çalışmasında; yağ doku kökenli mezenkimal kök hücrelerine farklı doz ve sürelerde uygulanan CAP'ın; proliferasyon (Ki-67 antikoru ile), fenotipik karakterizasyon (CD90, CD105, CD45 ve CD11b kök hücre yüzey işaretleyicileri ile) ve MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi ile hücre sağ kalımına olası etkilerin değerlendirilmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

Kök hücreler, kendini yenileyebilen, canlının ihtiyacına göre farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşebilen hücreler olarak tanımlanır (Mooney, & Vandenburgh, 2008). Bir kök hücrenin tanımlayıcı iki temel özelliği; kendini yenilemesi ve erişkin hücre tiplerine farklılaşabilmesidir (Biehl, & Russell, 2009; Huang ve ark., 2013). Ayrıca farklılaşmamış olan kök hücreler; karakteristik özelliklerini koruyabilme, en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği yanında; tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yeteneğine de sahiptirler (Okarma; 1999). Kök hücrelerde, kendini yenileme programı hücre bölünmesi ile ilgili büyüme faktörleri (epidermal gelişme faktörü, insülin benzeri gelişme faktörü, hematapoetik hücresel gelişme faktörleri, fibroblast gelişme faktörü gibi) ve aralarındaki hemostaza bağlıdır. Hücrelerin farklılaşmaksızın çoğalmasını (kendini yenileme) uyaran aracılar proto-onkogenler ve hücrenin kendisini yenileyebilmesini sınırlayanlar ise tümör supresyonu oluşturan genlerdir. Hücrenin bu iç mekanizması dışarıdan gelen hücresel ve hücresel olmayan sinyallerle uyarılabilmektedir. Organ ve dokuların ihtiyaçlarına karşılık, kök hücreler bölünme programlarını kontrol edebilirler, organizmanın yaşına, çevresel faktörlere bağlı olarak bu süreç değişir. Örneğin; radyasyona maruz kalındığında hematopoietik kök hücreler, sürekli kendi kendini yenileyebilmektedir; ancak normal koşullarda latent kalmaktadırlar (Till, & Mc Culloch, 1961). Kök hücrenin kendini yenilemesi, kök hücre havuzunun yenilenmesini ifade etmektedir. Böylece kök hücre havuzunun tükenmemesi için her bölünme esnasında kök hücrelerin en az bir yedeği oluşur (Can, 2015). Kök hücrelerin kendi kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme yeteneğinin dört farklı olasılığı bulunmaktadır (Biehl, & Russell, 2009). Birincisi çok yönlü farklılaşabilme potansiyeline sahip hücreler bölünmeden veya farklılaşmadan latent evrede bekleyebilirler; böylelikle kök hücre havuzundaki yerlerini koruyabilmektedirler.

Kemik iliği kök hücreleri gibi dokudan bir sinyal bekleyen ve hematopoietik hücresel farklılaşmayı sağlayabilen hücreler örnekler arasındadır. İkincisi, iki yavru kök hücre olarak isimlendirilen hücrelerdir, bu hücrelerde simetrik bölünme gelişir ve kendi kendilerini yenileyebilen birebir benzer kök hücreler oluşur. Farklılaşma ile sonuçlanmaz ancak kök hücre havuzundaki sayıyı arttırırlar böylece kök hücrelerin kendini yedeklemesi sağlanır. Üçüncüsü ise asimetrik hücre bölünmesidir; bu bölünmede oluşan yeni iki hücreden biri ana kök hücrenin kopyasıdır ancak diğeri ileri özelleşmiş bir hücre olup, somatik veya progenitor hücre olarak isimlendirilir. Dördüncüsü ise, çevre asimetrisi olarak isimlendirilen çevresel etkiler ile kök hücreler bölünerek ana kök hücreden farklı iki hücreyi meydana getirirler (Biehl, & Russell, 2009).

Kök hücre farklılaşması, çok hücreli organizmaları oluşturmak için bir araya gelmiş hücrelerin, özgün bir yapı kazanmak ve özel görevleri üstlenmek üzere geçirdikleri bir dizi genetik, morfolojik ve fonksiyonel değişimdir (Huang ve ark., 2013). Kök hücre plastisitesi ise farklılaşma ve kaynak hücre olarak uzun süre yaşayabilme kapasitesidir (Okarma, 1999). Epigenetik mekanizmalar bir kök hücrenin progenitör hücre veya özelleşmiş bir hücre olarak kalabilmesine olanak sağlayan yapılardır. Farklılaşma mekanizmasında, epigenetik faktörler, pluripotens düzeyi Oct-4, Sox2 ve Nanog Homeobox protein kodlayan gen (Nanog) pluripotens düzeyi), DNA metilasyonu, sinyal iletim yolakları ve büyüme faktörleri etkilidir. Farklılaşma terimi her zaman ileri farklılaşma (transdifferensiasyon), geriye farklılaşma (dedifferensiasyon /uyarılmış pluripotent kök hücreler), yönlendirilmiş farklılaşma (*in vitro* ortamda indüksiyon) ve doğrudan farklılaşma (direkt differensiasyon) olarak ayrılmaktadır (Can, 2015 s.171; Matur, & Solmaz, 2011).

Canlılarda kök hücre farklılaşması ve kök hücre potansiyelinin değişim süreci boyunca sırasıyla ilk meydana gelen totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent kök hücrelerdir (Can, 2008).

2.2. Kök Hücre Tipleri ve Farklılaşma Potansiyelleri

2.2.1. Totipotent Kök Hücreler

Totipotent kök hücreler, embriyonik ve ekstra embriyonik dokular dahil olmak üzere, gelişmekte olan organizmanın tüm hücre tiplerini oluşturabilme özelliğine sahiptirler. Totipotent kök hücreler; embriyonik kök hücre (EKH) özelliğindedir (Evans, & Kaufman, 1981; Can, 2015). Totipotent kök hücreler plasental yapıları oluşturabilme özelliğini trofoektodermdeki dış hücre kitlesi ile sağlarken, tüm dokulara farklılaşabilme özelliğini ise iç hücre kitlesindeki hücreler ile sağlamaktadırlar. Böylelikle totipotent kök hücreler yeni bir canlıyı tek başına oluşturabilirler (Gimble, & Guilak, 2003).

2.2.2. Pluripotent Kök Hücreler

Pluripotent kök hücreler; canlıdaki tüm doku ve organlara farklılaşabilme özelliğine sahiptir. Vücudun kendisini onarmak için ihtiyaç duyduğu herhangi bir hücreyi veya dokuyu pluripotent kök hücreler üretebilirler. Bu özellikten dolayı pluripotent denir. Tüm kök hücrelere benzer olarak pluripotent kök hücreler de proliferasyon özelliği gösterir ve kendilerini rejenere edebilirler (Mannhardt ve ark., 2016). Zigot oluşumundan sonra implantasyondan birkaç gün önce embriyoların, iç hücre kitlesi sadece % 10-15 oranında pluripotent kök hücre içerir. Ancak pluripotent kök hücrelerin EKH'lerden farkı; plasental yapı ve trofoektoderm gibi yapıları oluşturamamasıdır (Can, 2015). İlk pluripotent hücre dizileri, fare ve insan germ hücre tümörlerinin farklılaşmamış bölümünden köken alan embriyonik karsinom hücre dizileridir (Finch, & Ephrussi, 1967).

2.2.3. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler

Uyarılmış pluripotent kök hücre (UPKH), terminolojik olarak pluripotent kapasitesi gösteren somatik (vücut) hücrelerine denir. Farklılaşmasını tamamlamış olan somatik hücrelerin geriye differensiasyonunu sağlamak amacıyla pluripotent özelliğe programlanması için; 24 farklı gen içerisinden pluripotent özelliği aktaran 4 adet gen saptanmştır (Takahashi ve Yamanaka, 2006). Böylece somatik hücrelerin bir dizi transkripsiyon faktörleri olan octamer transcription factor (Oct-4), sex determining region Y-box 2 (Sox 2), cellular myelocytomatosis transcription factor (c-Myc) ve kruppel-like factor 4 (Klf-4) genleri ile pluripotent özelliğe

programlanabildiği bildirilmekle birlikte; Oct-4, Sox 2, Nanog ve Lin28 gen panellerinide UPKH eldesinde kullanmışlardır (Yu ve ark., 2012). Epigenetik araştırmalar sonucunda elde edilen bulgularda UPKH'lerin telomeraz aktiviteleri, DNA metilasyon modelleri ve histon asetilasyon analizleri sonucunda EKH'lere benzer sonuçlar elde edilerek, bu hücrelerin pluripotent özellikleri saptanmıştır (Maherali ve ark., 2007).

UPKH'in izolasyonu ve eldesi için, somatik hücre kaynağı olarak seçilen hücreler genellikle fibroblast kökenli hücreler olmaktadır. Fare hücrelerinden UPKH'ler elde edilirken özellikle kaynak olarak kullanılan hücreler; dermal fibroblastlar, dermal papilla hücreleri, pankreas β hücreleri, ince barsak epitel hücreleri, B lenfositler ve mononükleer hücrelerdir (Maherali ve ark., 2007; Takahashi ve Yamanaka, 2006). İnsanlarda; dermal fibroblastlardan, adipoz dokudan, amniyotik sıvıdan izole edilen hücrelerden, CD34 pozitif hematopoietik kökenli kan hücrelerinden, MKH, embriyo kökenli fibroblastlardan ve oral mukoza hücrelerinden UPKH üretimi gerçekleştirilmiştir (Demirel ve ark., 2010; Takahashi ve ark., 2007, Takahashi ve Yamanaka, 2006). Hem EKH''ler hem de UPKH'ler terapötik potansiyeli, sonsuz proliferasyon yeteneği ile pluripotansiyel özelliği en fazla olan kök hücrelerdir ancak halen tedavi konusunda uygun olup olmadıkları, moleküler mekanizmanın iyi anlaşılması ile mümkün olacaktır. Bu nedenle bu hücrelerin pratikte kullanımında belirli sınırlamalar mevcuttur (Turinetto ve Orlando, 2017).

2.2.4. Multipotent Kök Hücreler

Erişkin bireylerin dokularında bulunan, tek bir germ yaprağına ait ve birbirine yakın hücre gruplarına farklılaşabilen hücreler multipotent kök hücre özelliğindeki mezenkimal kök hücreler (MKH) olup, embriyonik gelişmenin daha ileri evresine ait hücrelerdir. MKH'ler erişkin kök hücrelerine dönüşebilir ve özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler. Kemik iliğinde intrauterin hayatın 4. ayından itibaren tüm kan hücreleri ve embriyo gövdesinde 16. günden itibaren organa özgü çok fazla farklılaşabilen kök hücreler MKH'lerdir (Gimble, 2003; Morgani ve ark., 2013). Multipotent kök hücreler ilk olarak kemik iliğinden Friedenstein (1976) tarafından izole edilmiş ve Caplan (1991) tarafından da karakterize edilmiştir.

2.2.5. Oligopotent Kök Hücreler

Oligopotent hücreler; somatik hücrelerden elde edilen fakat her hücreye farklılaşamayan hücre grubudur. Vasküler kök hücreler gibi düz kas hücrelerine dönüşebilen hücreler ile lenfoid kök hücreler gibi tek bir kan hücresine dönüşebilen kök hücreler oligopotent karakterdeki kök hücrelerdir (Özer, 2017).

2.2.6. Unipotent Kök Hücreler

Unipotent kök hücreler; farklılaşmış hücrelerden oluşan erişkin dokularda bulunan ve bu dokularda yalnızca tek bir hücre tipine dönüşebilen, sınırsız bölünebilme potansiyeli olmayan kök hücrelerdir. Kas hücrelerinin bazalinde bulunan uydu hücreleri bir (miyojen kök hücreleri) unipotent kök hücredir. Ancak herhangi bir doku hasarında; yerleştiği dokunun onarımına destek olan hücrelerdir (Slack, 2000).

2.3. Elde Edilme Kaynaklarına Göre Kök Hücre Sınıflandırması

Kök hücreler; embriyonik kök hücrelerden ve embriyonik olmayan kök hücrelerden elde edilebilirler. Totipotent kök hücre ve pluripotent kök hücrelerin her ikisi de embriyonik kök hücre sınıfında yer almakta iken, uyarılmış pluripotent kök hücreler (UPKH), fetal kök hücreler, göbek kordonu kök hücreleri, erişkin kök hücreler ve kadavra kök hücreleri embriyonik olmayan kök hücreler olarak sınıflandırılır (Can, 2015; Çerçi, & Erdost, 2019).

2.3.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler; fertilizasyon sonucu oluşan zigotun bölünerek oluşturduğu blastosistten elde edilir. Blastosisti oluşturan blastomerler; *in vitro* laboratuvar ortamında çoğaltılabilmektedir (Thomson ve ark., 1998). Embriyonik kök hücreler, memeli embriyosunun totipotent hücrelerinden üretilebilir ve *in vitro* ortamda sınırsız bölünebilme kapasitesindeki farklılaşmamış hücrelerdir (Thomson ve ark., 1998).

Embriyonik kök hücrelerde yüksek telomeraz enzim aktivitesi bulunmaktadır. Telomerlerin; hücre çoğalması, hücre yaşlanmasının düzenlenmesi ve malign

hücrelerin sınırsız çoğalma kapasitesinin kontrol edilmesinde rolü bulunmaktadır. İnsan telomerleri, TTAGGG tekrarlanan DNA sekanslarından oluşan kromozomların uçlarında lokalize olan yapılardır (Harley, 1991). Telomeraz, germ hücre hattında ve embriyonik dokularda yüksek seviyelerde bulunur (Harley, 1991). Kromozomları bozulma, füzyon ve rekombinasyondan korumak için işlev görürler. Kritik derecede kısa telomerlere ulaşıldığında hücresel yaşlanma oluşur (Aragona ve ark., 2000; Hathcock, Chiang, & Hodes, 2005).

EKH'lerinin sahip olduğu yüksek telomeraz aktivitesi, öngörülemez hücresel farklılaşma ve teratom oluşturabilme potansiyeli de taşımaktadır (Can, 2008). Bundan dolayı; insan EKH'lerinin kullanımında etik kısıtlamalar bulunmaktadır. Ayrıca, EKH'nin izolasyonunda blastosiste müdahale edilmesi, insan kaynaklı çalışmaların yapılmasında etik ihlal sorunlarını ortaya çıkarmaktadır (Can, 2008).

2.3.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

2.3.2.1. Fetal Kök Hücreler

Canlılardaki potansiyel kök hücre kaynaklarından biri de fetusa ait hücrelerdir (FKH). Gebelikte düşük sonucu meydana gelen fetuslardan veya çeşitli fetal gelişim bozuklukları nedeniyle gebeliğe son verilip alınan fetuslardan elde FKH'ler edilebilmektedir. FKH, fetal kan, kemik iliği, karaciğer ve böbrek gibi fetal dokulardan izole edilebilirler. Ayrıca fetal kan kök hücreleri; kordon kanından ve erişkin kemik iliğinde bulunan kök hücrelerden daha hızlı çoğalabilen hematopoietik bir kök hücre kaynağıdır (O'Donoghue, 2004).

Fetal kök hücreler, embriyonik kök hücrelerden daha az etik sorun teşkil eder ve farklılaşma potansiyelleri erişkin kök hücrelerden daha fazladır. Hücre nakli ve gen terapisi için terapötik etkilidir (Fauza, 2004).

2.3.2.2. Göbek Kordonu Kök Hücreleri

Göbek kordonu içerisindeki kan; gelişen fetüsün yaşam desteğini oluşturur. Aynı zamanda göbek kordonu kökenli hücreler heterojen bir popülasyona sahip olup MKH taşırlar. Erişkin dokusundaki kemik iliğinden daha fazla oranda hematopoietik hücre ve mezenkimal kök hücre taşımaktadırlar. Erişkin doku kök hücreleri olan

göbek kordonu kök hücrelerinin embriyonik kök hücreler gibi Sox-2, Oct-4, Nanog, stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-3,4), T cell receptor alpha locus-1-60 (TRA-1-60) ve TRA-1-80 genlerini taşıdığı belirtilmiştir (Habich ve ark., 2006). Bu hücrelerin bir kısmı sinir hücrelerine, karaciğer epitel hücrelerine, pankreas beta hücrelerine ve endotel hücrelerine farklılaşabildiği gösterilmiştir (Can, 2015).

2.3.2.3. Erişkin Kök Hücreleri

Erişkin kök hücreler; kendini yenileyebilen, koloni oluşturarak çoğalan hücrelerdir. Bu hücrelerin canlı yapıdaki asıl rolü; dokulardaki hemostazisi korumaktır (Gurusamy, Alsayar, Rajasingh, & Rajasingh, 2018). Hücre ve dokuların zarar görmesi durumunda, yeni hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasını aktive edebilirler (Baghaei ve ark., 2017).

Erişkin kök hücreler; özel bir mikroçevre içerisinde yüksek telomeraz aktivitesine sahip oldukları halde, embriyonik kök hücreler ile karşılaştırıldıklarında çok daha kısıtlı telomeraz aktivitesi ve farklılaşma potansiyeline sahiptirler. Sınırlı sayıda progenitör hücre oluştururlar. Erişkin kök hücreler, mikro çevrelerindeki değişiklikler sonrasında proliferasyona uğrayarak, olgun ve dokuya özgü hücre tiplerine farklılaşabilirler (Barry, & Murphy, 2004).

Mezenkimal kök hücreler; erişkin kök hücre sınıfında olup multipotent farklılaşma özelliğine sahiptirler; uygun koşullarda *in vivo* ve *in vitro* ortamda asimetrik ve simetrik replikasyon ile kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme özelliğindeki hücrelerdir. İnsan ve hayvanlarda çoğu dokudan izole edilebilirler (Barry, & Murphy, 2004; Le Blanc ve ark.; 2008; Guercio ve ark.; 2015). İlk olarak kemik iliğinden hematopoietik kök hücreler izole edilmiştir (Friedenstein, 1976). Hücrelerin plastik yüzeye yapışma özelliği saptanarak başlangıçta stromal hücreler olarak tanımlanmış ve daha sonra mezenkimal kök hücre olarak isimlendirilmiştir (Caplan; 1991). Kemik iliği kökenli bu hücrelerin; plastik hücre kültür kabı yüzeyine yapışarak, fibroblastoid formda, yuvarlak koloniler halinde kültüre edildiği ve hücresel koloni oluşturan proliferatif üniteleri (Colony Forming Unit - CFU) meydana getirdiği saptanmıştır (Friedenstein, 1976).

MKH'ler *in vitro* olarak endodermal ve neuroektodermal farklılaşma potansiyeline de sahiptir (Wenisch ve ark., 2006). MKH kaynakları ise; kemik iliği, yağ dokusu (Zuk ve ark., 2001), göbek kordon kanı (Erices, Conget, & Minguell, 2000; Chen, Mou, Du & Xiang, 2015) sinoviyal sıvı (De Bari, Dell'Accio, F., Tylzanowski, & Luyten, 2001), dental pulpa (Miura ve ark., 2003) gibi dokulardır. Dokudaki yangı ve hasar sırasında hızlıca göç edebilen MKH'ler; doku yenilenmesinde kök hücre havuzunu oluşturduğu düşünüldüğünden, bütün erişkin dokularda oldukça önemli bir göreve sahiptir (Gurusamy ve ark., 2018). Bu hücreler, en yakınındaki hücreleri etkileyen, gelişme faktörleri ve sitokinlerin büyük bir kısmını sentezleyebilirler (González, Gonzalez-Rey, Rico, Büscher, & Delgado, 2009). Bu sebeple, MKH'ler otokrin ve bulundukları ortama parakrin etkili biyoaktif faktörler salgılamaktadırlar (Caplan & Dennis, 2006).

Yağ doku kökenli MKH'ler, doku mühendisliği, rejeneratif tıp için ideal bir MKH kaynağı oluşturmakta olup insandan ilk olarak 2001 yılında identifiye edilmiştir (Zuk ve ark., 2001). Bu hücreler, lipoaspirattan izole edilebilen, *in vitro* ortamda; osteojenik, adipojenik, miyojenik ve kondrojenik yönde faklılaşma potansiyelindeki kök hücrelerdir. 2004 yılında uluslararası düzeyde yapılan toplantıda (Fat Applied Technology Society) yağ doku kökenli MKH'in genel olarak tanımlanmasında Adipose Stem Cell ve ''ASC'' kısaltmasının kullanımı kabul görmüştür (Bunnell, Flaat, Gagliardi, Patel, & Ripoll, 2008).

2.3.2.4. Kadavra Kök Hücreleri

Kadavra kök hücrelerinden elde edilen kök hücrelerin çoğalma hızlarının postmortem sonrası canlıların yaşıyla ters orantılı olduğu bildirilmiştir (Sağsöz ve Ketani, 2008). İnsan kadavralarından elde edilen beyin hücreleri ile olgunlaşmamış nöral kök hücrelerinin izole edildiği rapor edilmiştir (López, 2001). Atlarda ise postmortem ilk 72 saate kadar süspansör ligamentin çekirdeklerinden kök hücre izolasyonu yapılarak; osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma, CD90, CD73, CD105 pozitif kök hücre yüzey işaretleyicilerini taşıması CD45 işaretleyicilerini taşımaması ile mezenkimal kök hücre oldukları tanımlanmıştır (Khir ve ark., 2015). Ayrıca bir ana nükleer transkripsiyonel regülatör olan Oct-4 ve embriyonik kök hücrelere spesifik antijen 1 (SSEA-1); kadavra atların

ligamentlerinden elde edilen bu kök hücrelerde eksprese edilmiştir. Bu gen ekspresyonları özellikle farklılaşmamış kök hücrelerde, pluripotent özellikteki hücrelerle ilişkili genlerdir ve kök hücre yenilenmesini sürdürmede önemli bir rol aldığı bildirilmiştir (Khir ve ark., 2015). Başka bir çalışmada kadavra vasküler dokuları, insan kadavra mezenkimal kök hücrelerinin (hC-MSC) alternatif bir kaynağı olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, canlı ve fonksiyonel iskelet miyojenik hücrelerinin insanlardan, ölümden 17 gün sonrasına kadar ve farelerden ise 14 gün sonrasına kadar elde edilebileceği de gösterilmiştir (Valente ve ark., 2014). Kadavra kök hücrelerinin uzun süreli iskemi, anoksi, donma ve dehidrasyon yaralanmalarını etkili bir şekilde tedavi edilebileceği saptanmıştır (Valente ve ark., 2014).

2.4. MKH Fenotipik Karakterizasyonu

Farklı erişkin doku kaynaklarından izole edilen MKH'ler, biyolojik olarak eşdeğer olmayabileceği gibi kendini yenileme, çoğalma, farklılaşma ve gen ekspresyon özellikleri yanında değişkenlik gösterebileceği bildirilmektedir. Çeşitli doku kaynaklarından izole edilerek kültüre edilen kök hücrelerdeki biyolojik farklılıkları tanımlayabilmek için bu kök hücrelerin karakterizasyon analizleri yapılarak, hücreye özgü yüzey proteini olan yüzey işaretleyicileri (Cluster Differentiation (CD) ile tanımlanırlar (Huang ve ark., 2013). Uluslararası Hücre ve Gen Tedavileri Topluluğu (ISCT) tarafından oluşturulan minimal standartlara göre; belirli hücresel yüzey belirteçleri taşıması ve taşımaması açısından pozitif ya da negatif olarak değerlendirilmektedir (Dominici ve ark., 2006).

İnsan yağ dokusu CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD49e, CD54, CD55, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166 ve STRO-1 gibi MKH yüzey işaretleyicileri açısından pozitif gen ekspresyonu taşımakta iken; CD14, CD19 (B4), CD34, CD45, CD16, CD56, CD61, CD62E, CD104, CD106, CD31 ve CD144 için negatif gen ekspresyonu ile ifade edilmektedir (Huang ve ark., 2013). Atların yağ dokusundan elde edilen MKH'lerin CD29, CD90, CD105 ve CD73 yönünden immun pozitif iken; CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 alpha, CD19 için immun negatif gen ekspresyonuna sahiptir (Dominici ve ark., 2006).

Bir hücrenin MKH olup olmadığının belirlenmesi için özellikle osteojenik, kondrojenik ve adipojenik yönde farklılaşıp farklılaşmadığı dokulara özgü genlerin varlığı kontrol edilmelidir (Zołocińska, 2018). Yağ hücrelerine farklılaştırılan hücrelerin identifikasyonu için Peroxisome proliferator- activated receptor gamma (PPARG), adiponectin (ADIPOQ) ve CEBPA ekspresyonları, osteojenik farklılaştırılan hücrelerin identifikasyonu için runt-related transcription factor 2 (RUNX2), collagen type I alpha 1 chain (COL1A1), enzyme called tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP) ALPL, integrin-binding sialoprotein (IBSP), bone gamma-carboxyglutamate protein (BGLAP) ekspresyonları ile kondrojenik farklılaştırılan hücrelerin identifikasyonu için collagen type II alpha I chain (COL2A1), aggrecan protein (ACAN), Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP), SRY-Box transcription factor 9 (SOX9) gen ekspresyonları incelenebilir (Zołocińska, 2018).

At ve köpek türlerinde yağ doku kökenli MKH'lerin çok yönlü farklılaşma kapasitesi; klinik uygulamalar için pratik kullanıma olanak sunmaktadır. Köpek ve attan izole edilen yağ dokusu orjinli kök hücreler *in vitro* ortamda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik yönde farklılaşabilmektedir. MKH'lerin farklılaşma potansiyeli özel histolojik boyama yöntemleri kullanılarak saptanabilir. Yağ hücrelerine farklılaştırılan hücrelerde, lipid damlacıkları Oil Red O ve Sudan Black boyama yöntemi (Taha & Hedayati, 2010; Yoshimura ve ark., 2007); kondrojenik hücre farklılaşması Alcian Blue (Murata ve ark., 2014) veya Toluidin Blue boyama tekniği (Solchaga, 2011); osteojenik yöne farklılaşmanın kontrolü ise Alizarin Red ve Von Kossa boyama tekniği ile gösterilebilir (Im, Shin, & Lee, 2005; Sakaguchi ve ark., 2005).

Spesifik besiyerleri kullanılarak kemik iliği ve yağ doku kökenli MKH'ler adipositlere, kondrositlere, osteoblastlara farklılaştırılabilmelerinin yanısıra tenositlere, miyositlere (Toma ve ark., 2002), astrositlere, nöronlara (Chen ve ark., 2016), hepatositlere (Ji ve ark., 2012) ve pankreas β adacık hücrelerine (Chen, Jiang & Yang, 2004) farklılaştırılabilmektedirler (Zołocińska, 2018).

2.5. Capsaicin

Capsaicin (CAP) acı biberin etken maddesi olarak tanımlanan, trans- 8-metil-N-vanilil-6-nonenamide ($C_{18}H_{27}NO_3$) kuvvetli alkoloid yapıda bir bileşendir (Diaz-Laviada & Rodriguez-Henche, 2014).

Acı biberin etken maddesi olan CAP'ın moleküler ağırlığı 305,40 g / mol'dür. CAP; alkolde ve yağda çözünmekte olup saf haldeyken lipofilik, renksiz, kokusuz, beyaz, acı ve yakıcı özellikte bir alkoloiddir (Srinivasan, 2016). Acı biber içeriğindeki primer etken madde CAP'dır, ayrıca bunu dihidrocapsaisin, nordihidrocapsaisin, homodihidrocapsaisin ve homocapsaisin izlemektedir (Walpole ve ark., 1996). CAP ve dihidrocapsaisin, acı biberde CAP'ın yaklaşık % 90 'ını oluşturur (Kobata ve ark., 1999). CAP, vanilloid reseptörü olarak bilinen ve özellikle canlı yapısında senzorik nöronlarda bulunan bir transient receptor potential vanilloid 1'e (TRPV1) bağlanır (Cortright, & Szallasi, 2004). TRPV-1, 838 amino asitten oluşur ve moleküler ağırlığı 95 kilodalton (kDa) olup insan ile sıçanlarda tanımlanmıştır (Caterina ve ark., 1997). Ayrıca, TRPV-1 beyinde, idrar kesesinde, böbreklerde, bağırsaklarda, keratinositlerinde, glial hücrelerde, karaciğerde ve polimorfonükleer granülositlerde, mast hücrelerinde ve makrofajlarda saptanmıştır (Tominaga & Tominaga, 2005). TRPV1; sodyum ve kalsiyum iyonlarının geçişine izin veren spesifik olmayan bir katyon kanalı ile birleşir, plazma zarında ve hücre içi kalsiyum seviyelerini düzenleyen endoplazmik retikulumda bulunur (Liu ve ark., 2003). TRPV1, CAP tarafından oluşturulan ısıya duyarlı bir alt birim içerir. CAP'ın TRPV1'e bağlanması, hücre içi kalsiyumu artırır, substans P ve kalsiyum gen ilişkili peptid gibi nöropeptitlerin salınımını tetikler. CAP ve duyusal nöronlar arasındaki temas, lokalize bir ısı üretir. CAP lokal olarak deriye uygulandığında, substans P'nin azalmasına neden olduğundan duyusal nöronların duyarsızlaştırılmasından dolayı analjezik etki yaratır (Bevan, 1999). Bu mekanizma, yeni sentetik ligandların geliştirilmesini amaçlayan çalışmalar için bir temel oluşturmuştur (Jhamandas, Yaksh, Harty, Szolcsanyi, & Go, 1984; Szolcsanyi ve ark., 1999).

CAP, özellikle gastrointestinal, kardiovasküler, ürogenital, sinir, dolaşım, solunum olmak üzere pek çok sistemin histo-fizyolojileri üzerine anti kanserojenik, anti-enflamatuar ve anti-oksidan etkilere sahiptir (Erdost, 2004; Özer, 2005;

Özgüden Akkoç, 2007; Tütüncü, 2009; Zık ve ark., 2010; Ilhan, & Erdost, 2013; Peker, 2015;). Hücresel apoptoz mekanizması, çok hücreli organizmaların gelişimi ve hemostazisi sırasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesi için önemlidir. CAP, Caspase-3'ün (CASP-3) aktivasyonu, kinazın fosforilasyonu yoluyla mitojen aktive edilmiş protein kinazları modüle ederek apoptoz mekanizmasını indükler (Park ve ark., 2014). CAP ile tetiklenen hücre ölümünde adenozinmonofosfat bağımlı protein kinaz (AMPK) ve otofajinin de etkili olduğu bildirilmektedir (Diaz-Laviada, & Rodriguez-Henche, 2014). Capsaicin'in hücre membranındaki; TRPV1/TRPV6 Vanilloid reseptörlerinin uyarımı sonucunda kalsiyumun (Ca^{+2}) hücre içerisinde yükselmesi, mitokondrial hasar ve sitokrom C'nin uyarımı ile Caspase aktivasyonuyla apoptoza sebep olabilmektedir (Chapa-Oliver & Mejía-Teniente, 2016). Koenzim Q antagonistinin aktivasyonu ile elektron transferinin blokajı, ROS aktivasyonu ile hücrenin mitokondrial permeabilitesindeki artış sonucunda apoptoz gerçekleşmektedir. Koenzim Q antagonistinin aktive olması sonrası nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazların plazma membranında inhibisyonu ile pro-oksidatif ve ekstramitokondrial ROS jenerasyonununda artışı sonrası DNA hasarını meydana getirerek apoptoz oluşturabilmektedir. Ayrıca CAP; Sirtuin-1 yolağını baskılayarak p53 fosforilasyonu/asetilasyonu aracılığıyla anti-kanser aktivasyonu da oluşturabilmektedir (Chapa Oliver ve ark., 2016). CAP'ın antikanser mekanizmaları, apoptoz aktivasyonunu, hücre büyümesini durdurmayı, anjiyogenez ve metastazı inhibe etmeyi kapsar. CAP, anti-tümörijenik / tümör baskılayıcı sinyal yolu ve ilgili transkripsiyon faktörlerini uyarır (Chapa Oliver ve ark., 2016). CAP'ın tek başına veya diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde yüksek malign tümörlere karşı antikanser aktivitesi bulunmaktadır (Lin ve ark., 2013). CAP'ın kanser hücrelerinde apoptozu indükleme mekanizması tamamen açıklığa kavuşturulmamıştır. Ancak CAP'ın yüksek dozlarının hücre içi kalsiyum artışına, ROS artışına, mitokondriyal membran geçiş potansiyelinin bozulmasına, Nuclear Factor Kappa B (NFkappaB) ve Signal Transducer and Activator Of Transcription (STATS) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna sebep olduğu araştırmalar ile gösterilmiştir (Shin ve ark., 2008; Diaz-Laviada, & Rodriguez-Henche, 2014). Ayrıca, CAP'ın farelerde indüklenen birçok tümörün büyümesini azaltarak antitümör aktivitesini *in vivo* ortamda gösterdiği bildirilmektedir (Shin ve ark., 2008; Diaz-

Laviada, 2010; Diaz-Laviada, & Rodriguez-Henche, 2014; Peker, 2015;). CAP'ın; anti-tümöral etkileri için; son zamanlarda kolon adenokarsinomasında, hepatoselüler karsinomunda, prostat, pankreas, meme kanserinde ve benzer kanserojenik patolojik hücre proliferasyonu ile birçok malign hücre dizisinde apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Bley, Boorman, Mohammad, McKenzie, & Babbar, 2012; Diaz-Laviada, & Rodriguez-Henche, 2014; Skrzypski ve ark., 2014).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Primer Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

Çalışmada, Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden alınan 250-300 g canlı ağırlıktaki standart diyetle beslenen 12-14 haftalık 10 adet Sprague Dawley ırkı erkek sıçan kullanıldı. Mezenkimal kök hücre izolasyonu Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmadaki tüm uygulamalar Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar No: 2017 - 12 / 01). Sıçanlara Xylazine (10 mg/kg) (Basilazin % 2, Bavet, Türkiye) ve Ketamine (50 mg/kg) (Alfamine % 10, Bavet, Türkiye) anestezisi uygulanarak servikal dislokasyon ile ötenazi gerçekleştirildi. Asepsi ve antisepsi koşullarına uygun olarak sıçanlar % 70 alkol ile sterilize edilerek ardından deri altı ve inguinal yağ doku örnekleri toplandı. Her bir deney hayvanından yaklaşık 1,5 g yağ dokusu alınarak steril ve kuru petri kaplarına transfer edildi. Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) (BSS-1006, Millipore, Almanya) solüsyonu ile 50 ml'lik steril falkonlara (14-959-49A, Fischer Scientific, ABD) aktarıldı ve hücre kültür laboratuvarına getirildi. Falkonların kapakları laminar flow (EN-12469-2000, Tellstar, Almanya) içerisinde açılarak yağ doku steril iğne ucu ile steril DPBS içeren 50 ml'lik falkonlara konuldu. Ardından 60 mm^2 steril petriler içerisinde (430166, Corning, ABD) DPBS ile yağ dokusu tekrar yıkandı. 100 mm^2'lik kuru ve steril petri kaplarına (430167, Corning, ABD) aktarılarak yağ dokunun mins işlemi gerçekleştirildi.

Non enzimatik izolasyon tekniği kullanılarak (Nancy ve ark, 2012); 100 mm^2'lik petrilere alınan yağ dokusuna, 2 adet steril bisturi ucu ile mins işlemi uygulandı. Kuru petriler içerisinde mins edilmiş yağ doku, hücre kültür aşaması için T25 plastik hücre kültür flasklarına ekildi. Ekim aşamasından önce T25 flasklara steril bir dental iğne ucu ile her bir flaskın iç yüzeyine eşit aralıklar oluşturacak şekilde çizikler uygulandı. Hücre kültür kaplarındaki çizik hattına eşit aralıklarla mins edilmiş yağ doku parçaları farklı bir steril dental iğne ucu ile yerleştirildi (Çerçi, & Erdost, 2021).

Toplamda yaklaşık 15 g yağ dokusundan 30 adet T25 (CLS3289, Sigma, Almanya) flaska yağ doku eksplant kültürü uygulandı. Stok olarak hazırlanan besiyeri 50 ml'lik falkon tüplere bölünerek 1 hafta boyunca kullanıma hazır halde +4°C'de saklandı. Kök hücre besiyeri için 44 ml Rat-MSCs Growth Medium (RAXMD-03011-440, Cyagen, ABD) içerisine; 5 ml % 10 Fetal Bovine Serum (FBS) (TMS-013-B, Gibco, USA), 0,5 ml Penicilline-Streptomycine (100X) (TMS-AB2-C, Gibco, İngiltere) antibiyotik solüsyonu ve 0,5 ml L-Glutamin (200 mM) (G7513, Gibco, ABD) eklendi. Hazırlanan 50 ml'lik taze besiyerleri ve +4°C'de saklandı. Hücre ekim aşamasından sonra (% 5 CO_2, % 96 nemli ortamda, 37 °C standart MKH kültür ortamında) T25 flasklara kök hücre besiyerinden 5'er ml eklenerek karbondioksitli etüvde (MCO-5M-PA, Panasonic, Japonya) inkubasyona bırakıldı. Her üç günde bir eski besiyeri uzaklaştırılarak taze besiyeri eklendi. % 70 konfluense ulaşan flaskların subkültürü için eski besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra DPBS ile yıkandı. Elde edilen primer hücre kültür hattı 24., 48., 72. saatlerde ve konfluens oluşumu görülene kadar invert mikroskopta (Nikon eclipse 80i, Japonya, Mikroskop-Ds Kamera Kontrol Ünitesi DS-L) değerlendirilerek hücre popülasyonunun çoğalması sonucu % 70 oranında konfluense ulaşan hücreler tekrar subkültüre edildi. Primer kültürün ilk aşaması pasaj 0 (P0) sonrasında pasaj 1 (P1), pasaj 2 (P2) ve pasaj 3 (P3) olarak tanımlandı.

Pasajlama aşaması (hücrelerin subkültürü); T25 flasklarda 2 ml ve T75 flasklarda ise 4 ml hacimde % 0,25 Tripsin-Edta (P10-019100, PAN-Biotech, Almanya) solüsyon kullanılarak hücreler kaldırıldı. Plastik yüzeye tutunarak çoğalan adhezif hücreleri plastik hücre kültürü kabı yüzeyinden kaldırmak için yaklaşık 5 dakika etüvde tutuldu ve hücrelerin flask yüzeyindeki hareketliliği invert mikroskop ile kontrol edildi. Her bir flaska Tripsin-Edta solüsyonunun iki katı oranında, steril besiyeri ilave edilerek; tripsin aktivasyonu nötralize edildi. Ardından, hücre ve besiyeri içeren solüsyon 15 ml konik satrifüj tüplerine (339650, Thermo Scientific, Nunc, ABD) aktarıldı; ardından 25° C'de, 1000 rpm, 5 dakika santrifüj (Nüve, Türkiye) edilerek, tüplerdeki süpernatant atıldı. Hücre peletinin üzerine 5 ml taze besiyerinden eklendi ve hücre sayım aşamasına geçildi. Her subkültür aşamasında aynı işlemler uygulandı.

3.1.2. Hücre Sayımı

Canlı hücre sayımı için steril bir ependorf tüp içerisine 100 µl hücre süspansiyonu ve 100 µl trypan blue karşımı (1:1 oranda) hazırlandı. Süspansiyondan 10'ar µl thoma lamının her iki tarafına aktarıldı ve lamel ile kapatıldı. Hücre sayımı; invert mikroskop altında 20'lik objektif ile 16 büyük kare içindeki total hücre sayımı gerçekleştirildi. Hücre/ml = (Hücre Sayısı × Dilüsyon Katsayısı) × 10^4 çalışma faktörü ile total hücre sayısı bulundu.

Önerilen oranda hücreler, T25 ile T75 (05-539-104, Fischer Scientific, USA) flasklara ekildi ve çoğaltıldı (Tablo 1). Bu işlemler; hücrelerin P1, P2 ve P3 fazlarında hücreler % 70 konfluense ulaştığında tekrarlandı.

Tablo 1. Plastik hücre kültür kaplarının hücre sayısı ve besiyeri miktarı (ml).

	Plastik Hücre Kültür Kabı Yüzey Alanı (mm^2)	**Tripsin/EDTA miktarı (ml)**	**Başlangıç Hücre Ekimi Oranı**	**Besiyeri miktarı (ml)**
75 cm^2 kültür flaskı	7500	3-4	$5,6x10^6$	12
25 cm^2 kültür flaskı	2500	1	$1,8x10^6$	5
100 mm^2 Petri kabı	7854	3-4	$13,25x10^6$	20
60 mm^2 Petri kabı	2827	2	$7,20x10^6$	10
35 mm^2 Petri kabı	962	1	$3,0x10^6$	2-3
6 kuyucuklu kültür kabı	962	0,5	$7,2x10^5$	2-3
24 kuyucuklu kültür kabı	200	0,2-0,5	$4x10^4$	0,5-1
96 kuyucuklu kültür kabı	30	0,1	$2\ x10^4$	0,1-0,2

(https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html)

3.2. Pasaj 3 Hücrelerin Farklılaştırılması ve Farklılaşmanın Tanımlanması

3.2.1. Pasaj 3 Hücrelerin Osteoblastlara Farklılaştırılması ve Tanımlanması

Plastik hücre kültür kaplarındaki (24 kuyucuklu) her kuyucuğa 6×10^4 hücre/kuyucuk ve 0,5 ml/kuyucuk standart besiyeri eklenerek karbondioksitli etüvde inkubasyona bırakıldı. Hücreler % 80 konfluense ulaştıklarında, eski besiyeri

uzaklaştırıldı ve osteojenik farklılaştırma için herbir kuyucuğa osteojenik farklılaştırmaya spesifik besiyeri MSCgo™ Osteogenesis XF (05-440-1B, Biological Industries, İsrail) eklendi. Bu amaçla 21 gün süresince; 10 kuyucuk osteojenik farklılaştırma besiyeri ile 5 kuyucuk negatif kontrol olarak standart besiyeri olan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ile inkübe edildi. Her üç gün de bir taze besiyeri eklendi (Im, Shin, & Lee, 2005).

Alizarin Red (% 2) boyama solusyonu (ARS) (Sanger ve ark, 1964); 2 gr Alizarin Red (3674210, Merck, Almanya) 100 ml bidistile su içeriğinde çözdürülerek hazırlandı ve ardından boya solusyonu 0,45 µ'luk steril bir şırınga filtresi ile süzüldü. Alizarin Red boya solüsyonunun pH'sı 4,25'e ayarlandı. Boyama aşamasında; hücreler bir kez DPBS ile yıkanarak % 70 etanol ile 1 saat fikzasyon yapıldı, ardından daha sonra 3 kez bidistile su ile yıkandı ve 1 ml % 2 ARS eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Devamında enjektör iğnesinin ucu ile dikkatlice boya solüsyonu aspire edilerek hücrelerin kurumaması için herbir kuyucuğa 1ml bidistile su eklendi (1 ml / 24 kuyucuk). Kalsiyum kümülasyonu içeren osteositler ve kalsiyum kümülasyonu invert mikroskopta değerlendirildi.

3.2.2. Pasaj 3 Hücrelerin Kondroblastlara Farklılaştırılması ve Tanımlanması

Pasaj 3 MKH'ler hücre kültürü kaplarının (96 kuyucuklu) herbir kuyucuğuna $1x10^6$ hücre ekilerek ve 100 µl/kuyucuk besiyeri eklenerek inkube edildi. Hücreler % 80 konfluense ulaştıklarında, eski besiyeri uzaklaştırıldı ve kondrojenik farklılaştırma için herbir kuyucuğa kondrojenik farklılaştırmaya spesifik besiyeri MSCgo™ Chondrogenic XF Medium ve MSCgo™ Chondrogenic XF Supplement Mix (05 – 220 - 1B ve 05 - 221-1D, Biological Industries, İsrail), (200 µl / kuyucuk) karışımı eklendi. Bu amaçla 21 gün süresince; 10 kuyucuk kondrojenik farklılaştırma besiyeri ile 5 kuyucuk negatif kontrol olarak standart besiyeri olan DMEM ile inkübe edildi. Her üç gün de bir taze besiyeri eklendi (Murata ve ark, 2014).

21 gün sonra hücreler % 1 Alcian Blue Solüsyonu (Luna, 1968) için; 0,2 gr Alcian Blue 8GX (261943, Sigma, USA) ve 20 ml 0,1 N Hidroklorür (HCI) ile çözdürülerek 0,45 µ şırınga filtresi ile süzüldü. Boyama aşamasında; eski besiyeri içeriği uzaklaştırıldı ve ardından hücreler DPBS ile yıkandı. Oda sıcaklığında 60

dakika süresince % 10 formalin ile hücreler tespit edilerek bisdistile su ile yıkandı. Her kuyucuğa 200 µl % 1 Alcian Blue solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında gece boyunca inkübe edildi. Her kuyucuk 0,1 N HCI ile 2 kez yıkandı, daha sonra her kuyucuğa bidistile su eklenerek kondrojenik farklılaşma ve negatif kontrol invert mikroskop altında değerlendirildi.

3.2.3. Pasaj 3 Hücrelerin Adipositlere Farklılaştırılması ve Tanımlanması

Pasaj 3 MKH'ler hücre kültür kabındaki (24 kuyucuklu) her bir kuyucuğa $6x10^4$ hücre ve 0,5 ml standart besiyeri ortamı eklenerek inkube edildi. Hücrelere % 80 konfluens sonrası; MSCgo™ Adipogenic Differentiation Basal Medium, MSCgo™ Adipogenic SF, XF Supplement Mix I ve MSCgo™ Adipogenic SF, XF Supplement Mix II karışımından oluşan adipojenik farklılaştırma besiyeri (05-330-1B, 05-331-1-01 ve 05-332-1-15, Biological Industries, İsrail) eklendi. Bu amaçla 21 gün süresince; 10 kuyucuk adipojenik farklılaştırma besiyeri ile 5 kuyucuk negatif kontrol olarak standart besiyeri olan DMEM ile inkübe edildi. Adipojenik ortam üç günde bir taze besiyeri ile değiştirilerek 15 gün boyunca adipojenik besiyeri ile hücreler inkübe edildi (Ghorbani, Jalali, & Varedi, 2014).

Adipogenezis ve hücre içi lipid damlacıklarının tespiti için Oil Red O boyama tekniği (Grimstone, & Skaer, 1972) uygulandı. Boya solüsyonu için; 0,35 gr Oil Red O (1052300025, Merck, Almanya) 100 ml 2-propanol içerisinde çözdürülerek, oda sıcaklığında 4 ml bidistile su ile karıştırılarak, 0,45 µ'luk steril bir şırınga filtresi ile süzüldü. Boyama aşamasında; her kuyucuk bir kez DPBS ile yıkanarak, oda sıcaklığında 1 saat süresince formol kalsiyum ile hücreler tespit edildi ardından DPBS ile yıkandı. Oil Red O solüsyonundan her kuyucuğa 1 ml eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Oil Red O solusyonu, iğne ile dikkatlice aspire edildi ve hücrelerin kurumaması için her kuyucuğa bidistile su ilave edilerek ve hücrelerdeki pozitif boyanma ve negatif kontrol invert mikroskop ile incelendi.

3.3. Pasaj 3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Fenotipik Karakterizasyonu

Yağ doku kaynaklı P3 hücreleri, MKH standardizasyonu ve fenotipik karakterizasyonun saptanması amacıyla CD90, CD105 immunpozitif ve CD11b, CD45 immunnegatif yüzey işaretleyicileri ile identifiye edildi. Laminar flow içerisinde; hücre kültür kaplarının (24 kuyucuklu) her bir kuyucuğuna sterilize edilen

(FN-400, Nüve, Türkiye) cam lameller ince uçlu steril bir pens ile yerleştirildi. Hücre kültür kabındaki her kuyucuğa 0,5 ml FBS eklendikten sonra 30 dakika etüvde bekletildi ve FBS uzaklaştırıldı. Ardından hücre kültür kaplarındaki her kuyucuğa 4×10^4 hücre ekildi ve taze besiyeri eklenerek inkube edildi. Bu amaçla, herbir CD yüzey işaretleyici için primer antikorun eklendiği 4 kuyucuk pozitif kontrol, primer antikorun eklenmediği 4 kuyucuk negatif kontrol olarak takip edildi.

Plastik hücre kültür kabındeki her kuyucukta bulunan besiyeri 24 saat sonra uzaklaştırıldı ve hücreler 200 µl PBS ile yıkandı. Hücrelere 1 saat boyunca % 4 paraformaldehit solusyonu ile (1.04005.100, Merck, Almanya) fikzasyon uygulandı, ardından 3 kez 5 dakika süresince PBS ile yıkandı. 15 dakika süreyle % 0,1 Triton X-100 (T8787, Sigma, USA) ile kuru buz üzerinde inkubasyon yapılarak permeabilizasyon aşaması tamamlandı. Ardından tekrar hücreler 3 kez 5 dakika boyunca PBS ile yıkandı. Hücrelere 10 dakika % 4 hidrojen peroksit (H_2O_2) uygulanarak 3 kez 5 dakika süresince PBS ile yıkama gerçekleştirildi. Blocking aşamasında; immunohistokimyasal kit içeriğindeki (Thermo Scientific™, TP-125-HL, USA) blocking solüsyon 1 saat oda ısısında uygulandı. Pozitif fenotipik yüzey işaretleyicileri olan CD90 (1:700, ab225, Abcam, İngiltere) ve CD105 (1:100, ab156756, Abcam, İngiltere) ile negatif yüzey işaretleyicileri olan CD45 (1:200, ab8879, Abcam, İngiltere) ve CD11b (1:200, ab10558, Abcam, İngiltere) antikorları ile +4 °C'de 18 saat boyunca primer inkubasyona bırakıldı. Takiben hücreler PBS ile 3 kez 5 dakika yıkanarak, streptavidin solüsyonu (Thermo Scientific™, TP-125-HL, USA) 30 dakika oda ısısında uygulandı. Hücreler, 3 kez 5 dakika boyunca PBS ile yıkanarak Streptavidin solüsyonunda oda ısısında 30 dakika inkube edildi. Tekrardan hücreler 3 kez 5 dakika süresince PBS ile yıkandı. Ardından 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (ab6428, Abcam, İngiltere) kromojen ile hücrelerdeki spesifik protein işaretlenerek distile su ile yıkandı. Çekirdek boyaması için Harris Hematoksilen 1 dakika uygulandı ve preparatlar araştırma mikroskobunda (Nikon Eclipse 80i, Japonya) incelenerek; beş mikroskobik alanda her bir grup için 500 hücre 20X'lik objektifte sayıldı.

3.4. Mezenkimal Kök Hücrelere Uygulanacak Capsaicin Dozlarının Hazırlanması ve Deney Planı

Çalışmamızda *in vitro* ortamda mezenkimal kök hücrelere uygulanan CAP dozları sırasıyla; 0 µM kontrol A, 0 µM kontrol B, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM'dır. 1 mM CAP stok solüsyonu hazırlığı için 0,0003 g CAP, DMSO ile dilüe edilerek eppendorf tüp içerisine karıştırarak hazırlandı ve -20° C'de saklandı. 1 mM CAP stok solüsyonundan 7 farklı doz grubu için 15 ml besiyeri içerisine alınan CAP solusyon hacimleri sırasıyla Tablo 2'de gösterilmektedir.

Deneysel uygulamalara göre hücre kültür kaplarına (24 kuyucuklu) ekilen mezenkimal kök hücreleri; DMEM içeren (kontrol A), dimetil sülfoksit içeren (DMSO) (Taşıt madde içeren; kontrol B) ve farklı doz CAP uygulamaları grupları olmak üzere üç ana gruba ayrıldı.

Tablo 2. Deney ve kontrol gruplarındaki mezenkimal kök hücrelere uygulanan Capsaicin dozları

I.	Kontrol A DMEM içeren hücre kontrol besiyeri; CAP stok solüsyondan eklenmedi.
II.	Kontrol B DMSO taşıt maddesi içeren besiyeri; CAP stok solüsyondan eklenmedi.
III.	5 µM CAP besiyeri hazırlığı için stok solüsyondan 75 µL,
IV.	10 µM CAP besiyeri hazırlığı için stok solüsyondan 150 µL,
V.	25 µM CAP besiyeri hazırlığı için stok solüsyondan 375 µL,
VI.	50 µM CAP besiyeri hazırlığı için stok solüsyondan 750 µL,
VII.	100 µM CAP besiyeri hazırlığı için stok solüsyondan 1500 µL,
VIII.	150 µM CAP besiyeri hazırlığı için stok solüsyondan 2500 µL CAP eklendi.

3.5. Capsaicin Uygulanan Mezenkimal Kök Hücrelerin Proliferasyonu ve Fenotipik Karakterizasyonu

Deney ve kontrol gruplarındaki MKH'lerin proliferasyonun belirlenmesi için Ki-67 (MA5-14520, Thermo Fischer Scientific, USA) ekspresyonu; fenotipik karakterizasyon için CD90 (ab225 Abcam, İngiltere), CD 105 (ab156756, Abcam, İngiltere), CD45 (ab10558, Abcam, İngiltere) ve CD11b (ab8879, Abcam, İngiltere) ekspresyonlarına bakılarak immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirmeler yapıldı. CAP'ın 24 ve 48 saatlik sürelerdeki inkubasyonları için her bir CD yüzey işaretleyicinin değerlendirilmesi aşamasında hücreler dört adet primer antikorun eklendiği pozitif ve dört adet primer antikorun eklenmediği negatif kontroller ile inkube edildi. Deney gruplarının herbiri için 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarındaki dört kuyucuğa 4×10^4 mezenkimal kök hücre ekilerek ve taze besiyeri ile 24 saat boyunca inkubasyona bırakılan hücrelerin cam lamellere tutunma durumları kontrol edildi. Hücre kültür kabındaki kuyucuklara sırasıyla 0 µM CAP Kontrol A, 0 µM CAP içeren Kontrol B ile 5, 10, 25, 50, 100 ve 150 µM konsantrasyonlarda CAP içeren taze besiyerleri eklendi. 24 ve 48 saat bitiminde deneyler sonlandırıldı. Hücrelerin 24 ve 48 saat sonra invert mikroskop altında morfolojik durumları incelendi ve besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücreler, PBS ile 2 kez 5 dakika yıkandı. Daha sonra hücreler % 4 paraformaldehit ile 1 saat boyunca fikze edilerek ve immunohistokimyasal boyama prosedürü uygulandı. Üç kez 5 dakika süresince PBS ile yıkama sonrasında 15 dakika boyunca permeabilizasyon amacıyla % 0,1 TritonX-100 ile kuru buz üzerinde inkubasyon yapıldı. Devamında 3 kez 5 dakikalık PBS ile yıkama yapılarak hücrelere 10 dakika süre ile % 4 H_2O_2 uygulandı. Ardından 3 kez 5 dakikalık PBS ile yıkama, blocking aşaması 1 saat süre ile oda ısısında gerçekleştirildi. Primer antikor Ki-67; 1:200, CD90; 1:700, CD105; 1:100, CD45; 1:200 ve CD11b; 1:200 dilüsyon oranında eklenerek +4 °C'de 18 saat boyunca inkubasyon uygulandı. Ardından 3 kez 5 dakika boyunca PBS ile yıkanan hücreler sekonder antikor solusyonu (Thermo Scientific™, TP-125-HL, USA) ile 30 dakika oda ısısında inkubasyona bırakıldı. Takiben 3 kez 5 dakika PBS ile hücreler tekrar yıkandı. DAB kromojen (ab6428, Abcam, İngiltere) ile hücreler işaretlenen hücreler 3 kez 5 dakika süre ile distile suyla yıkandı. Çekirdek boyaması için, Harris Hematoksilen uygulanarak preparatlar araştırma mikroskobunda incelendi.

Mikroskopta 20X'lik büyütmede tüm deney ve kontrol grupları için 500'er hücre sayıldı.

3.6. MTT Testi

Tüm kontrol ve deney gruplarına MTT testi uygulamak için; 96 kuyucuklu plastik hücre kültürü kaplarındaki 30 kuyucuğa 2×10^3 hücre ekildi. MTT testi için; pozitif kontrol olarak 2 kuyucuğa DMEM, 2 kuyucuğa DMSO eklendi, negatif kontrol için 2 kuyucuğa Triton-X 100 eklendi, 24 ve 48 saatlik deney grupları için ikişer kuyucuğa sırasıyla 5, 10, 25, 50, 100, 150 µM CAP içeren besiyerlerinden eklendi. 24 ve 48 saatlik CAP inkubasyonu sonrası deneyler sonlandırılarak hücreler 4 saat boyunca 37 ° C'de 0,5 mg/ml'lik 20 µl MTT (M5655, Sigma, ABD) eklenerek inkübasyona bırakıldı. Hücre sedimentasyonu bozulmaksızın süpernatant uzaklaştırıldı. Hücrelerdeki mavi formazan kristalleri birikimi dikkate alınarak hücresel canlılık değerlendirildi. Formazan kristallerinin çözünmesi için SDS çözeltisinden (1.3760.0100, Merck, Almanya) her bir kuyucuğa 100 µl eklendi. Etüvde 10 dakikalık inkübasyon sonrası 570 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazı ile absorbans değerler ölçüldü ve hücre canlılığı değerlendirildi (Coradeghini ve ark., 2010).

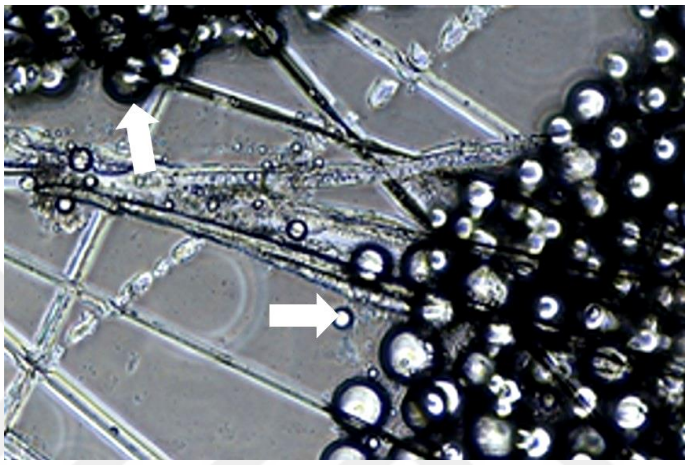
3.7. İstatistiksel Analiz

Deney ve kontrol gruplarındaki hücrelerde proliferasyon için Ki-67, fenotipik karakterizasyon ile MKH özellikleri için CD90, CD105, CD11b ve CD45 immun reaksiyonları ve MTT testinin istatistiki anlamdaki farklılıkları Kruskal Wallis ve gruplar arası farklılıklar ise Man Whitney U testi ile saptandı. Aynı zamanda 24 ve 48 saat süreli CAP inkubasyonunun zaman yönünden grup içi farklılıklarını saptamak için two paired sample t-testi kullanıldı. İstatistiki analizler IBM SPSS 23 programında değerlendirilerek istatiksel anlamlılık $P < 0,05$ ve $P < 0,001$ düzeyinde tanımlandı.

4. BULGULAR

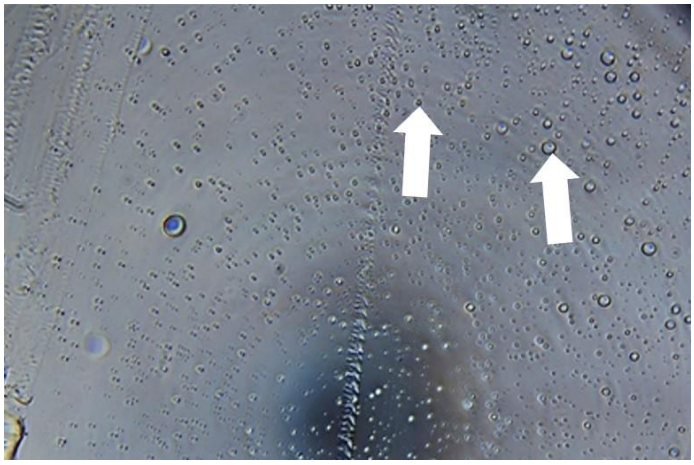
4.1. Primer Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Mikrofotoğrafik Değerlendirme

Primer hücre izolasyonunun 24 saatlik bulgularında yağ dokudan uzaklaşarak, flask yüzeyindeki çizgilere tutunan ve göç fazında olan vakuoler formdaki hücreler saptandı (Şekil 1).



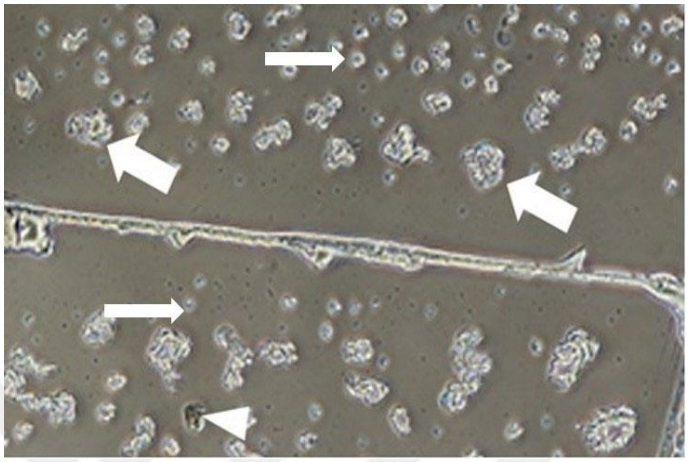
Şekil 1. Primer hücre izolasyonu aşamasının ilk 24 saatinde yağ dokudan uzaklaşarak çizgilere tutunan ve göç fazında olan vakuoler formdaki hücreler (oklar), (X10).

Primer hücre izolasyonunun 48 saatlik bulgularında; vakuoler yapıdaki göç fazı hücrelerinde artış ve büyüme belirlendi (Şekil 2).



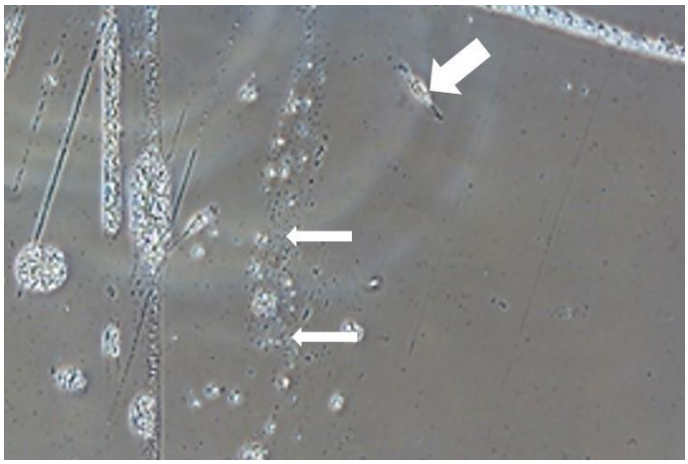
Şekil 2. Primer hücre izolasyonunun 48 saatlik bulgularında vakuoler formdaki göç fazı hücrelerinde artış ve büyüme (oklar), (X10).

Primer hücre kültür izolasyonunun 72 saatlik bulgularında ise; çok sayıda gelişmekte olan büyük göç fazı hücreleri ile tam gelişmemiş küçük göç fazı hücreleri, ölü bağ doku hücreleri ve eritrosit hücrelerine benzer heterojen bir hücre popülasyonu gözlendi (Şekil 3).



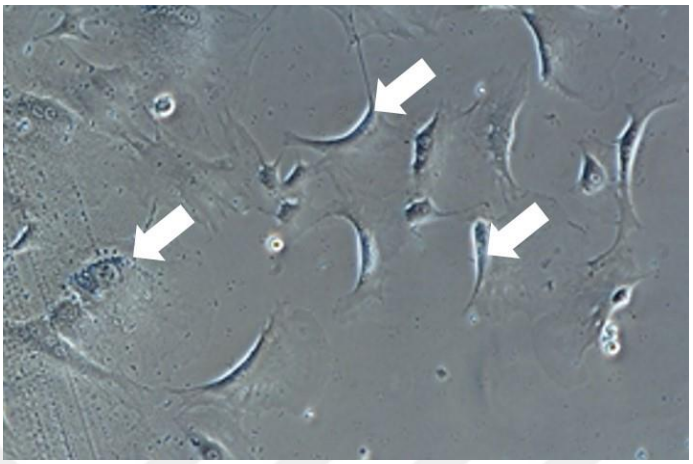
Şekil 3. Primer hücre izolasyonunun 72 saatlik bulgularında; artan küçük göç fazı hücreleri (ince oklar) ile büyük göç fazı hücreleri (kalın oklar) ve ölü hücresel yapılar (ok başı), (x10).

Primer hücre izolasyonunun 5. gününde; küçük göç fazı hücrelerinin arttığı; büyük göç fazı hücrelerinin ise uzantılar oluşturararak fibroblastoid hücre formuna dönüşmeye başladıkları ilk kez gözlendi (Şekil 4).

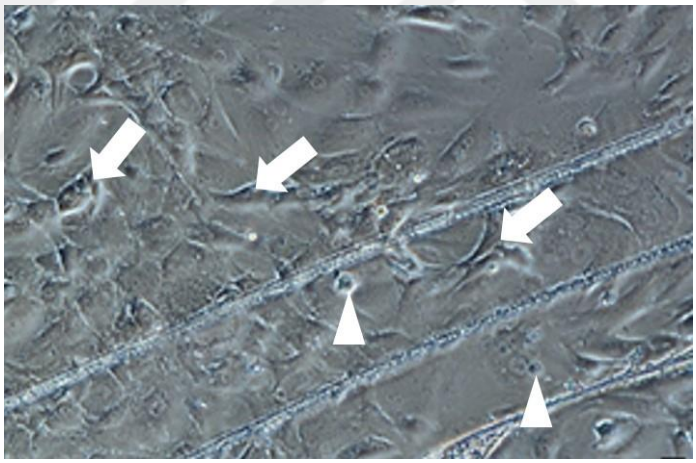


Şekil 4. Primer hücre izolasyonunun 5. gününde; küçük göç fazı hücreleri (ince oklar), fibroblastoid hücre formu (kalın ok), (x10).

Primer hücre izolasyonunun 6. gününde; heterojen hücre popülasyonu görünümünün devam ettiği saptandı. Aynı zamanda fibroblastoid formdaki hücrelerin arttığı ve fibroblastoid hücre evresine geçiş gözlendi. (Şekil 5-6).

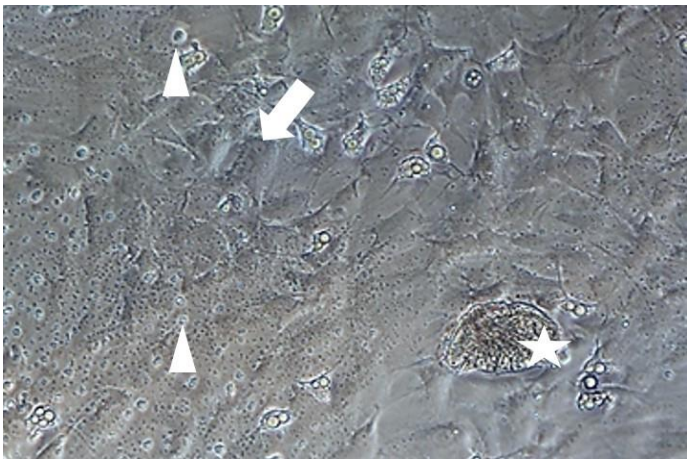


Şekil 5. Primer hücre izolasyonunun 6. gününde göç fazındaki hücrelerin fibroblastoid hücre gelişim fazına geçiş (oklar), (x10).



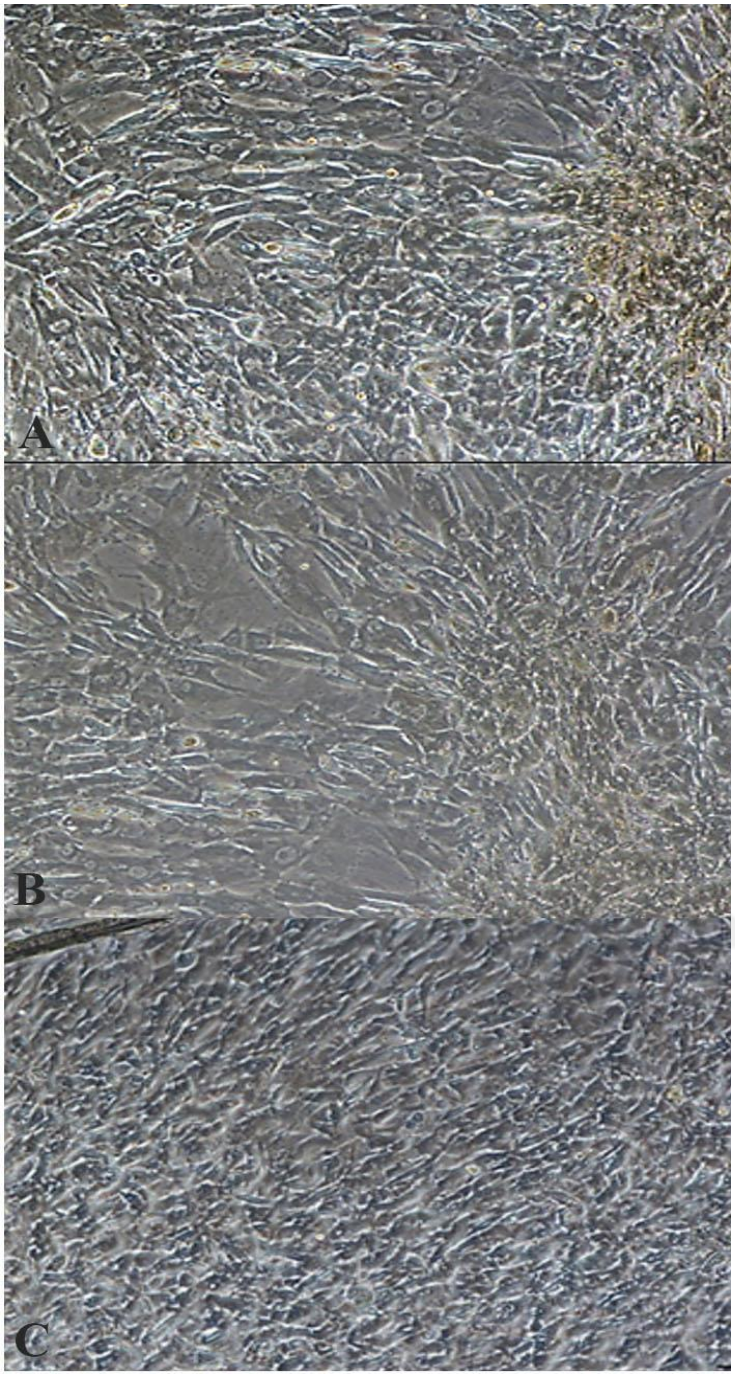
Şekil 6. Primer hücre izolasyonunun 6. günü fibroblastoid hücreleri (kalın oklar) ile göç fazı hücreleri (ok başları) içeren heterojen hücre popülasyonu (X10).

Primer hücre izolasyonunun 7. gününde fibroblastoid hücreler yaklaşık % 70 oranında artarak, ilk kez konfluense ulaştı ve hücre kültürü Pasaj 0 olarak tanımlandı (Şekil 7).

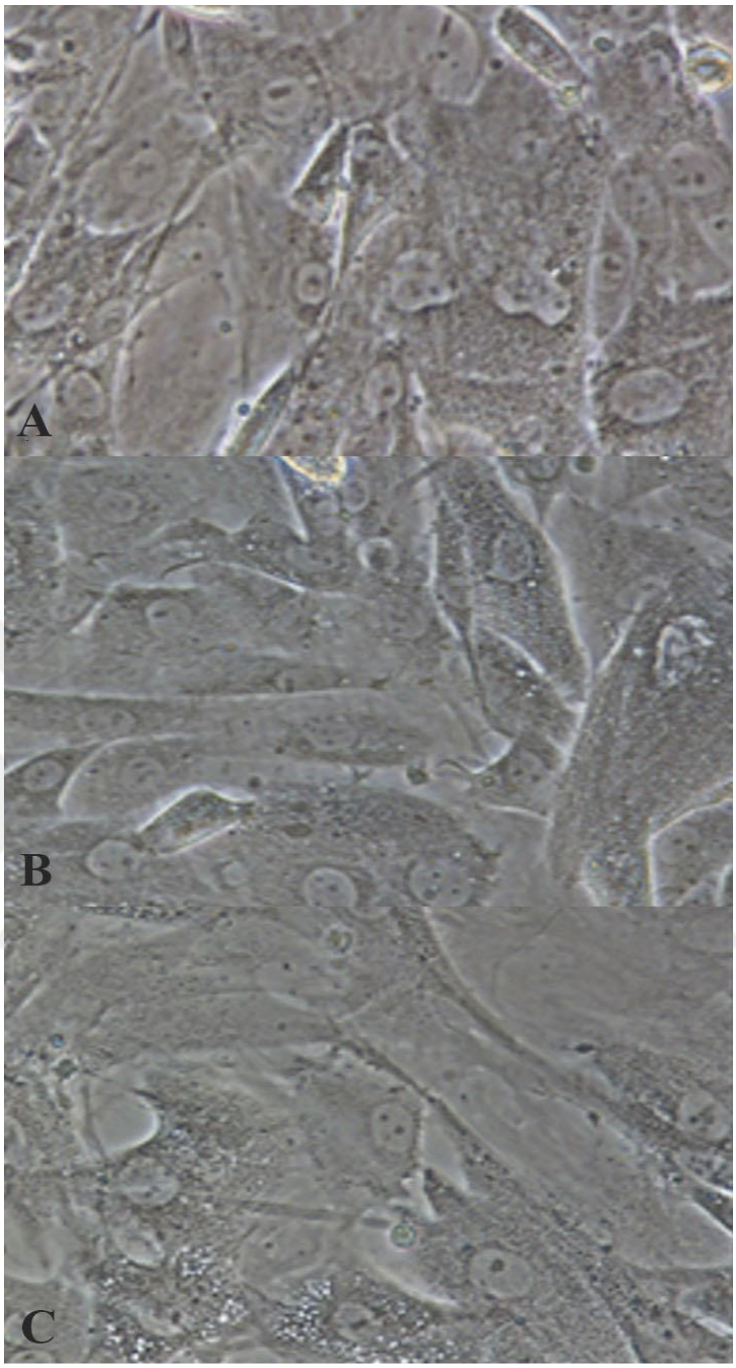


Şekil 7. Primer hücre izolasyonunun 7. günde konfluens aşaması; heterojen formda hücre popülasyonunu oluşturan fibroblastoid hücreler (kalın ok), göç fazı hücreleri (ok başları), hücre artıkları (yıldız), (X10).

Pasaj 0 sonrasında fibroblastoid hücre hattı aynı koşullarda çoğaltılarak, 12. gün pasaj 1, 16. gün pasaj 2 ve 21. gün pasaj 3 hücreleri %70 konfluense ulaştı (Şekil 8- 9).



Şekil 8. A) Hücre kültürü pasaj 1, B) Pasaj 2 ve C) Pasaj 3 aşamasındaki yaklaşık % 70 konfluense ulaşan homojen fibroblastoid hücresel popülasyon (X10).

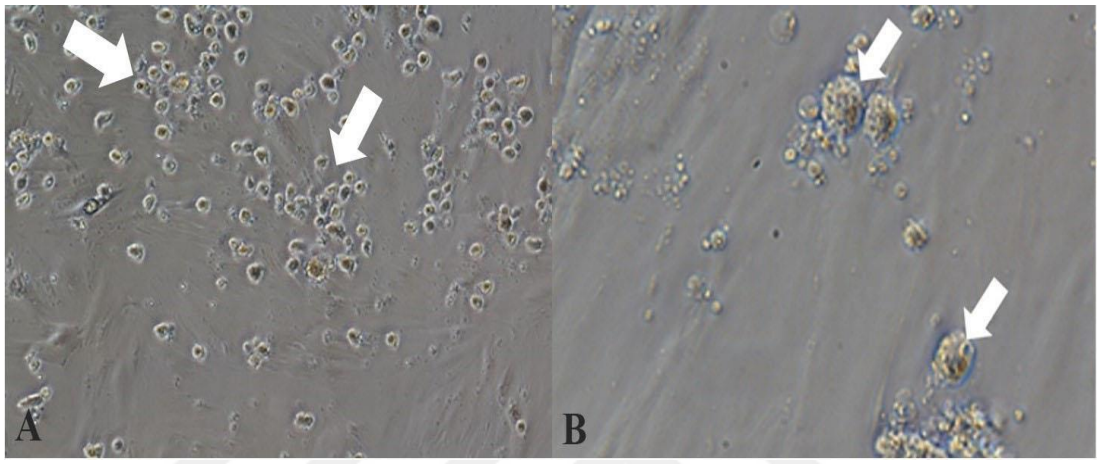


Şekil 9. A) Hücre kültürü pasaj 1, B) Pasaj 2 ve C) Pasaj 3 aşamasındaki yaklaşık % 70 konfluense ulaşan homojen fibroblastoid hücresel popülasyon (X40).

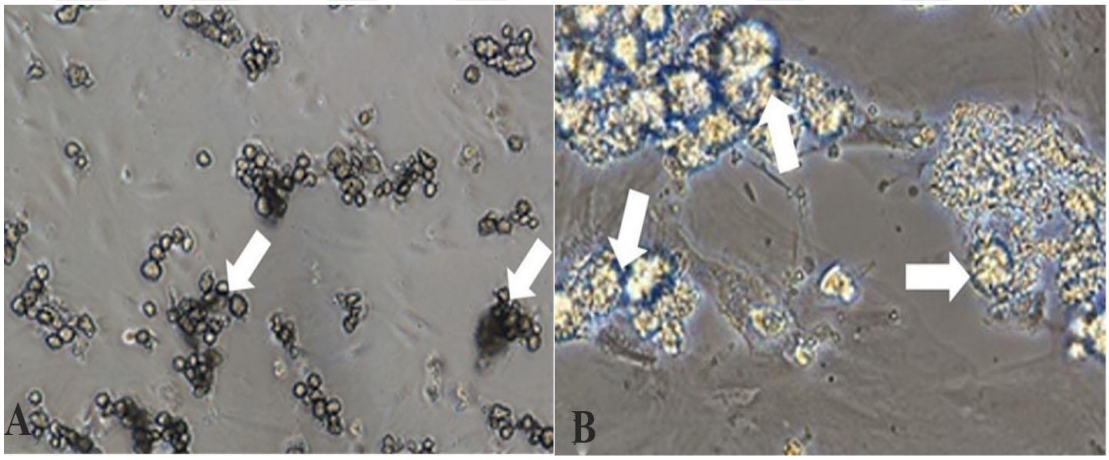
4.2. Pasaj 3 Hücrelerinin Farklılaştırılması ve Tanımlanması

4.2.1. Pasaj 3 Hücrelerinin Osteoblastlara Farklılaştırılması ve Tanımlanması

Osteoblastlara farklılaştırılan fibroblastoid formdaki pasaj 3 hücrelerinin; 3. günde yassı formdan oval forma dönüşen hücre popülasyonu oluşturduğu belirlendi (Şekil 10). Aynı zamanda 3. günde farklılaşan hücrelerde koloni oluşumu ile hücrelerin birbirlerine yaklaştığı gözlendi (Şekil 10).



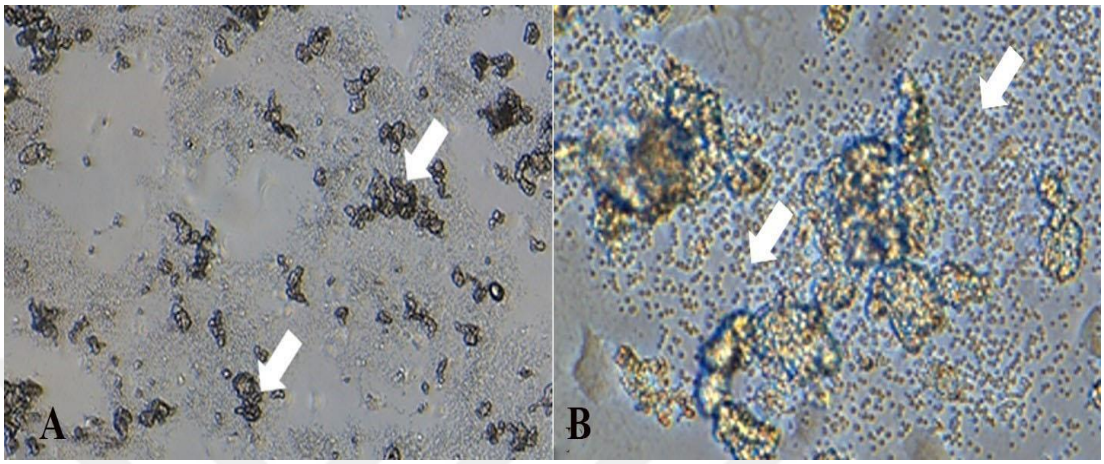
Şekil 10. Osteoblastlara farklılaştırılan pasaj 3 hücrelerinin 3. günü A) Oval forma dönüşüm (oklar), (X10). B) Koloni oluşumu (oklar), (X40).



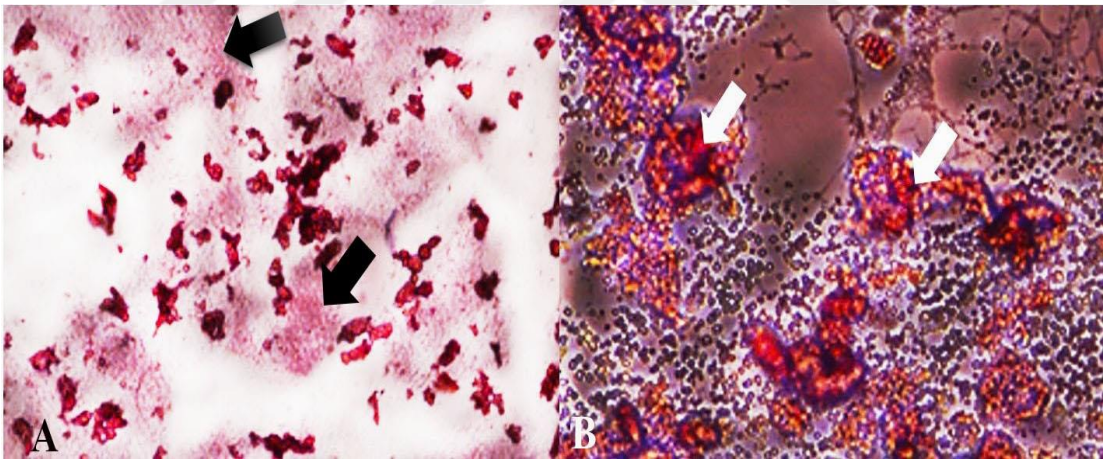
Şekil 11. Osteoblastlara farklılaştırılan pasaj 3 hücrelerinin 8. günü A) Birbirine yaklaşan hücreler (oklar), (X10); ve B) Farklılaşan hücre kümeleri (oklar), (X40).

Hücre popülasyonundaki fibroblastoid formun 8. günde yaklaşık % 70 oranında azaldığı, hücrelerin birbirlerine yaklaştığı ve olası osteoblast yönündeki farklılaşmanın da belirgin düzeyde arttığı saptandı (Şekil 11).

Hücre içi ve hücre dışı matriks nodüllerinin 21. günde arttığı ve extrasellüler kalsiyum mineralizasyonun oluştuğu görüldü (Şekil 12). Alizarin Red boyama yöntemi ile kırmızı renkteki osteoblast hücreleri 21. günde identifiye edildi ve ekstrasellüler mineralizasyon alanları da açık pembe renkte saptandı (Şekil 13).



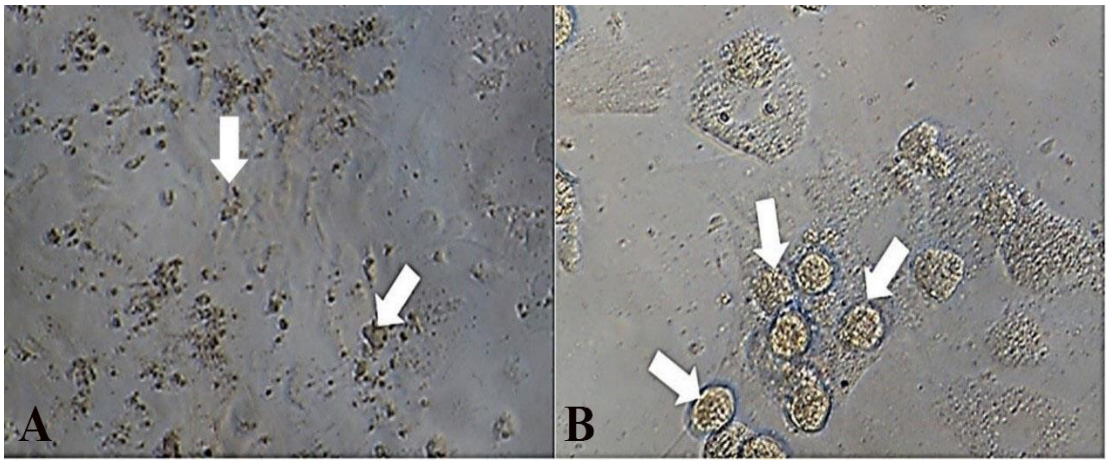
Şekil 12. Osteoblastlara farklılaştırılan pasaj 3 hücrelerinin 21. günü A) Osteoblast formuna farklılaşma esnasındaki hücre içi ve hücre dışı matriks nodülleri (oklar) (X10); B) Ekstrasellüler kalsiyum mineralizasyonu (oklar) (X40).



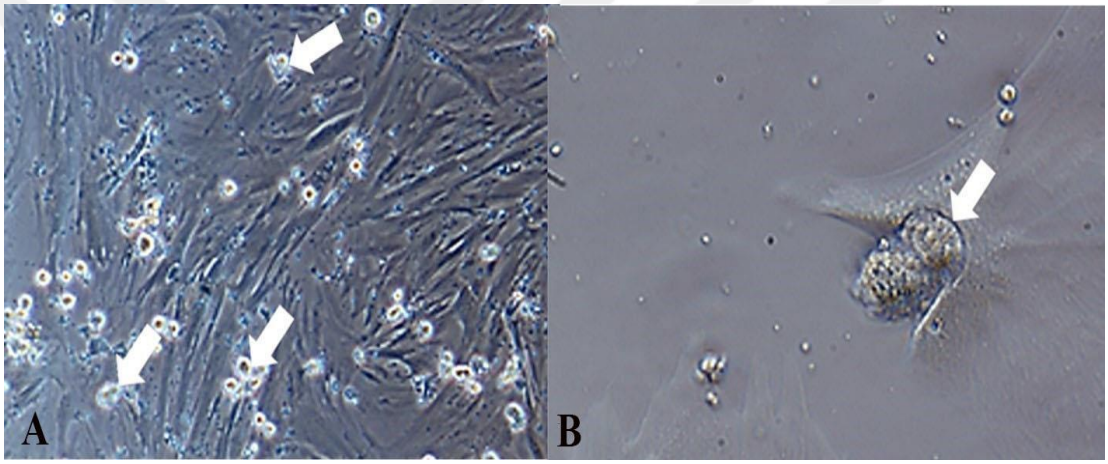
Şekil 13. Osteoblastlara farklılaştırılan pasaj 3 hücrelerinin 21. gününde A) Alizarin Red ile boyanan açık pembe renkli mineralizasyon alanları (oklar), (X10); B) Alizarin Red ile kırmızı renkte boyanan osteoblast hücreleri (oklar), (X40).

4.2.2. Pasaj 3 Hücrelerinin Kondroblastlara Farklılaştırılması ve Tanımlanması

Fibroblastoid yapı 3. günde azalmaya başlayarak ve sferoidal formda kondroblastoid farklılaşmanın oluştuğu saptandı. Hücre kültür flaskına yapışmadan çoğalan sferoidal hücreler gözlendi (Şekil 14).

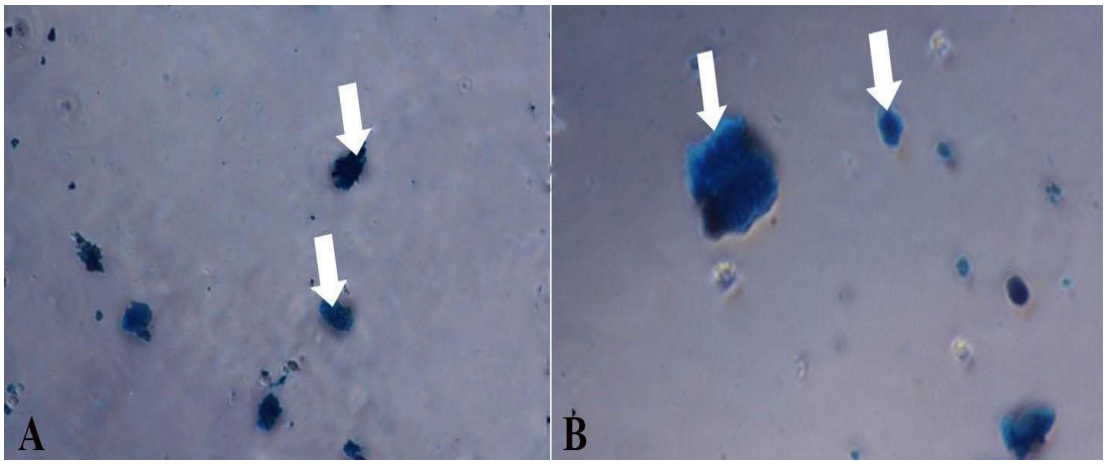


Şekil 14. Kondroblastlara farklılaştırılan pasaj 3 hücrelerinin 3. günü A) Sferoidal formda kondroblastoid yönde farklılaşan hücreler (oklar), (X10); B) Sferoidal formda kondroblastlara farklılaşmaya başlayan hücreler (oklar), (x40).



Şekil 15. Kondroblastlara farklılaştırılan pasaj 3 hücrelerinin 14. günü A) Sferoidal formdaki hücreler (oklar), (x10); B) Gelişmekte olan sferoidal formdaki hücrelerin kondroblastlara farklılaşması (ok), (x40).

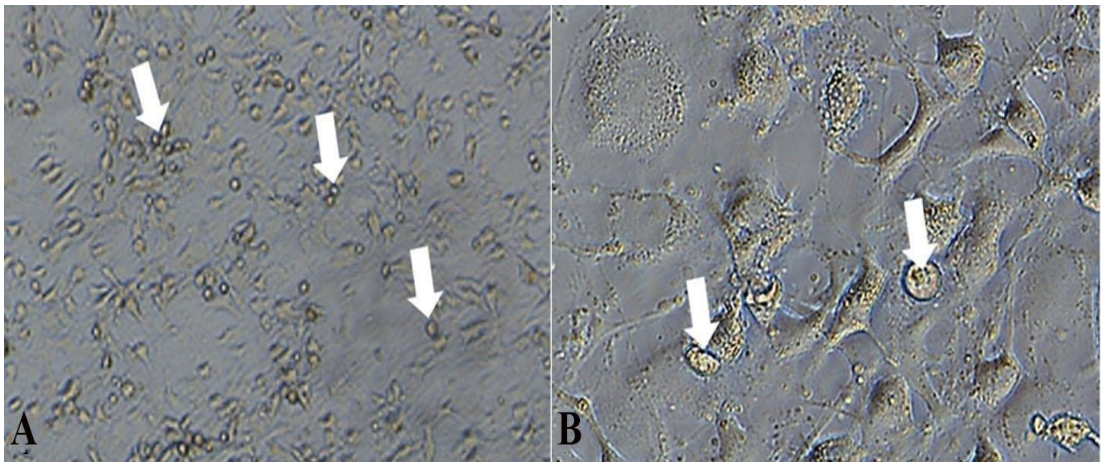
Hücresel farklılaşmanın; 14. gününde sferoidal formdaki yapının geliştiği ve kondroblast hücrelerini oluşturmaya başladığı gözlendi (Şekil 15). 28. günde kondroblast yönünde farklılaşan, çoğalan sferoidal hücrelerin tanımlanması için Alcian Blue boyama yöntemi uygulandı. Kondroblast oluşumuna katılan proteoglikanların mavi renkte reaksiyon verdiği görüldü (Şekil 16).



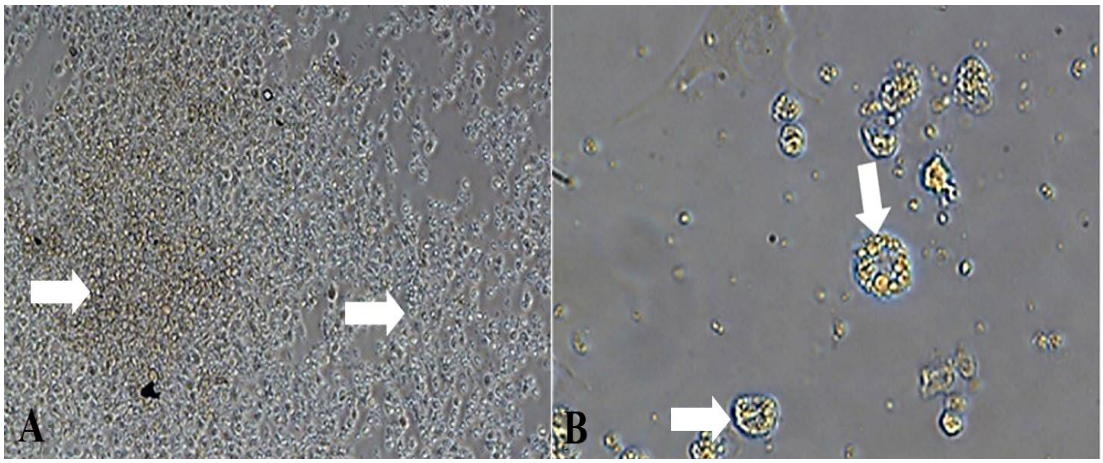
Şekil 16. Kondroblastlara farklılaşan pasaj 3 hücrelerinin 28. günü Alcian Blue boyama yöntemi ile tanımlanan kondroblast hücreleri (oklar), A (X10); B (X40).

4.2.3. Pasaj 3 Hücrelerin Adipositlere Farklılaştırılması ve Tanımlanması

Fibroblastoid yapıdaki hücrelerin; 1. günde küçük vakuoler formda hücreler oluşturmaya başladığı belirlendi (Şekil 17). Vakuoler formdaki hücrelerin 6. günde, hücreler arası uzantılar ve bağlantılar oluşturduğu yoğun oranda arttığı saptandı (Şekil 18). Farklılaşmaya başlayan hücrelerin vakuoler formdaki yağ damlacıklarına dönüştüğü ve yağ damlacıklarının 6. günde daha çok belirginleştiği gözlendi (Şekil 18).

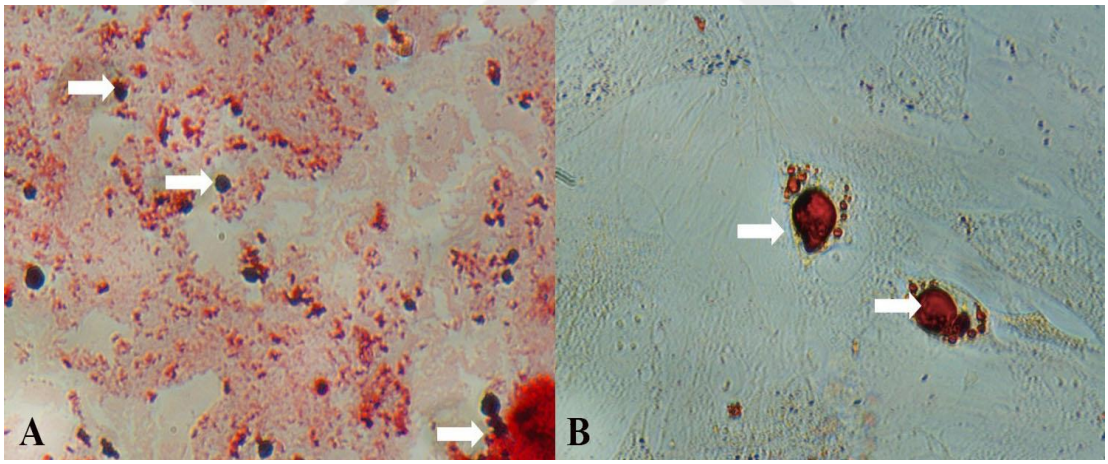


Şekil 17. Adipositlere farklılaştırılan pasaj 3 hücrelerinin 1. günü**; v**akuoler forma dönüşüm (oklar) A) (X10); B) (X40).



Şekil 18. Adipositlere farklılaştırılan pasaj 3 hücrelerinin 6. günü, vakuoler hücrelerde artış (oklar); A) (X10); B) (X40).

Yağ hücrelerindeki farklılaşma aşamasına giren hücre sayısı 12. günde belirgin artış gösterdi ve vakuoler yapılara dönüşerek farklılaşan hücreler Oil red O boyama tekniği ile kırmızı renkte boyanarak adiposit hücreler olarak tanımlandı (Şekil 19 A-B).

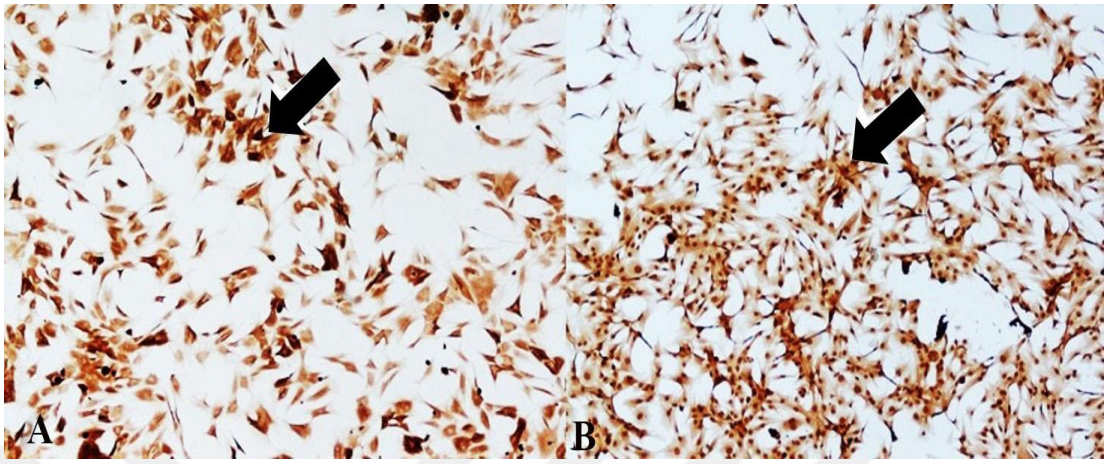


Şekil 19. Adipositlere farklılaştırılan pasaj 3 hücrelerinin 12. günü; Oil red O boyama tekniği uygulanan adipojenik yönde farklılaşan hücreler (oklar) A) (X10); B) (X40).

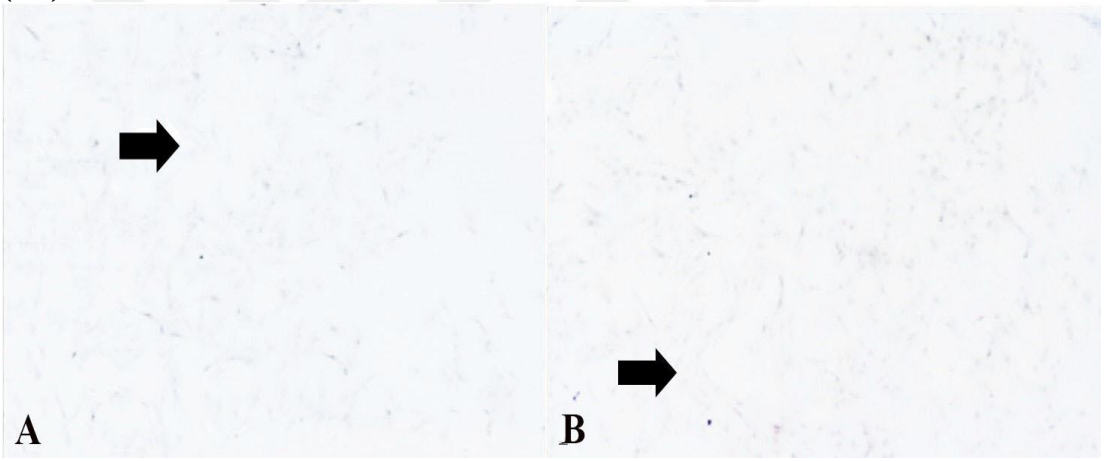
4.3. Pasaj 3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Fenotipik Karakterizasyonu

Fenotipik karakterizasyonun tanımlanması için; CD90, CD105, CD45 ve CD11b antikorları kullanılarak immunohistokimyasal yöntem uygulandı. Pasaj 3 hücreleri CD90 (Şekil 20 A) ve CD105 ile pozitif immunreaksiyon (Şekil 20 B); CD45 (Şekil 21 A) ve CD11b ile negatif immunreaksiyon gösterdi (Şekil 21 B).

Böylece çalışmada izolasyonunu yaparak kullandığımız pasaj 3 hücrelerin; mezenkimal kök hücre özelliğine sahip olduğu saptandı.



Şekil 20. Pasaj 3 hücrelerinde fenotipik karakterizasyonun tanımlanması A) CD90 immunpozitif reaksiyon (oklar), (X4); B) CD105 immunpozitif reaksiyon (oklar), (X4).



Şekil 21. Pasaj 3 hücrelerinde fenotipik karakterizasyonun tanımlanması A) CD45 immunnegatif reaksiyon (ok), (X4); B) CD11b immunnegatif reaksiyon (ok), (X4).

4.4. Capsaicin'in Mezenkimal Kök Hücre Mitotik Aktivitesi Üzerine Etkisi

Farklı doz ve sürelerdeki CAP uygulanan MKH'lerde Ki-67 antikorunun immunreaksiyonu ile hücre proliferasyonu değerlendirildi; böylece hücrelerdeki mitotik aktivite saptandı (Tablo1) (Şekil 22-24).

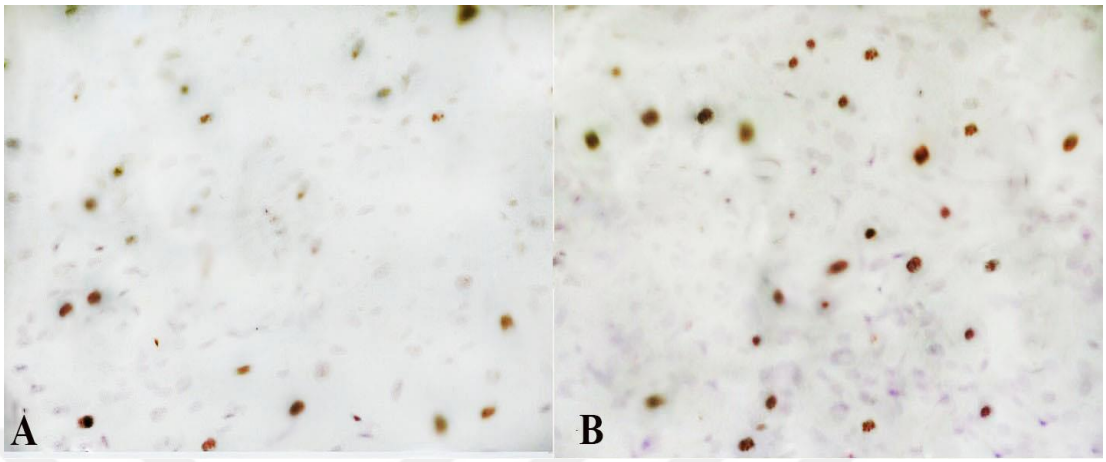
Tablo 1. Farklı doz ve sürelerde CAP uygulanan MKH'lerde Ki-67 immunpozitif hücrelerin (%) ortalama ± SE değerleri.

	Kontrol A	**Kontrol B**	**5 µM CAP**	**10 µM CAP**	**25 µM CAP**	**50 µM CAP**	**100 µM CAP**	**150 µM CAP**
24 saat	56,80±1,15[a]	57,60±1.07[a]	65,80±1,59*[a]	73,6±2,78*[a]	82,0±5,42*[a]	60,0±2,72[a]	53,40±1,69[a]	29,60±4,51*[a]
48 saat	56,00±1,61[a]	53,80±0,73[a]	51,80±0,58[a]	55,20±1,39[b]	50,0±0,70*[b]	30,60±1,36*[b]	21,80±2,85*[b]	17,40±1,69*[a]

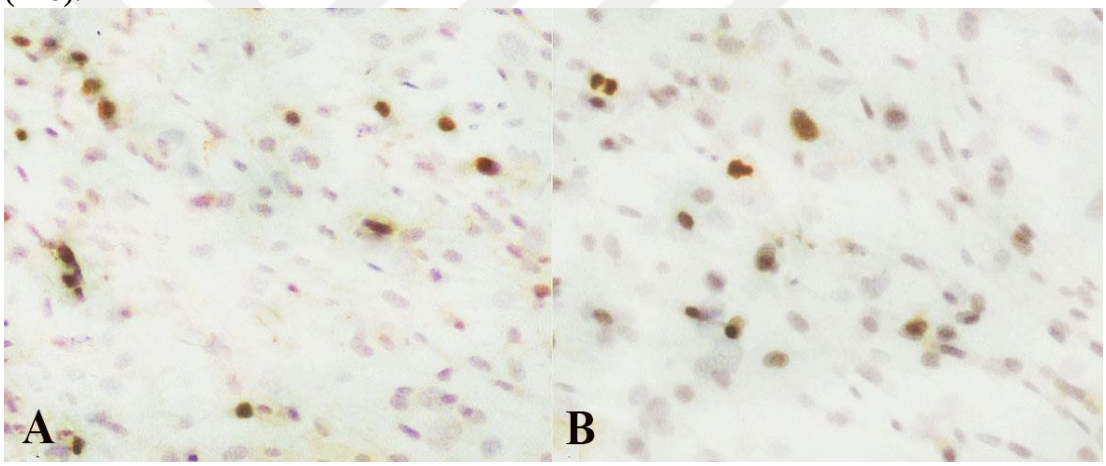
Aynı satırdaki gruplar arasında istatistiki farklılık (*) P < 0,05 ile gösterilmektedir.
Aynı sütundaki gruplar arasında istatistiki farklılık (a, b) P < 0,05 ile gösterilmektedir.

Deney ve kontrol gruplarında CAP'ın hücre proliferasyonuna etkileri Ki-67 immunreaksiyonu ile değerlendirildiğinde (Tablo 1); 24 ve 48 saat süreli kontrol A ve kontrol B gruplarında istatiksel önem olmadığı gözlendi (P1=0,242, P2=0,072; P > 0,05) ancak 5, 10 ve 25 µM CAP dozlarında hücre proliferasyonun belirgin anlamda arttığı (P1=0,001, P2=0,001, P3=0,001; P < 0,05) ancak 48 saatlik uygulamada azaldığı saptandı (P1=0,001; P < 0,05). Ayrıca Ki-67 immunpozitif reaksiyonunun 24 saatlik 100 ve 150 µM CAP dozlarında, 48 saatlik 25 µM CAP ve üzerindeki tüm dozlarda istatiksel anlamda azaldığı saptandı (P1=0,001, P2=0,001, P3=0.074; P < 0,05).

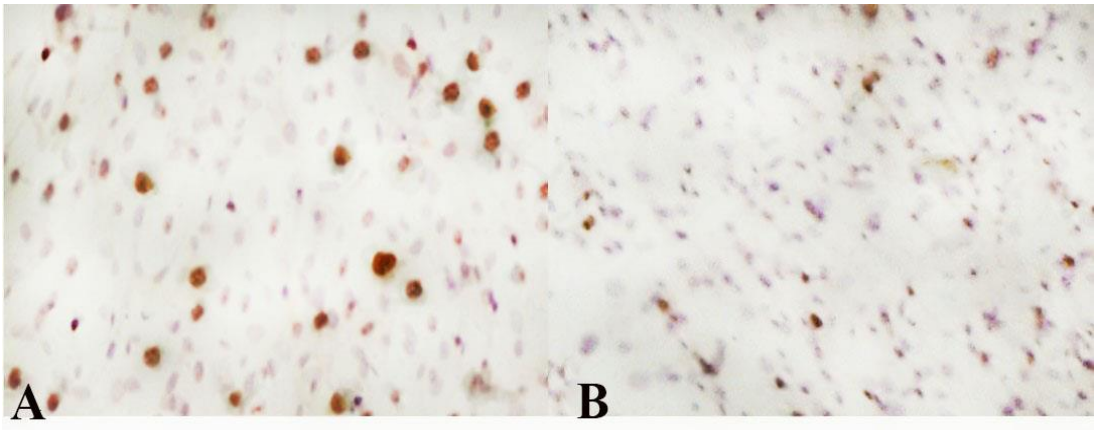
Deney ve kontrol gruplarının 24 saatlik uygulaması değerlendirildiğinde pozitif Ki-67 immunreaksiyonunun kontrol A, kontrol B ile karşılaştırılınca 5, 10, 25 µM CAP dozlarında istatistiki öneminin arttığı ancak 50 ve 100 µM CAP ile azaldığı belirlendi (P1=0,012, P2=0,009, P3-P4=0,009). 48 saatlik uygulamada ise 25 µM CAP ve üzerindeki tüm dozlarda istatistiki anlamın azaldığı saptandı (P1=0,021, P2=0,009, P3=0,009, P4=0,009; P < 0,05). Aynı sütundaki grupların 24 ve 48 saatlik CAP uygulaması sonrasındaki Ki-67 immunreaksiyonu değerlendirildiğinde; doz ve süreye bağlı olarak 48 saatlik deney gruplarında proliferasyonun azaldığı gözlendi (Tablo 1).



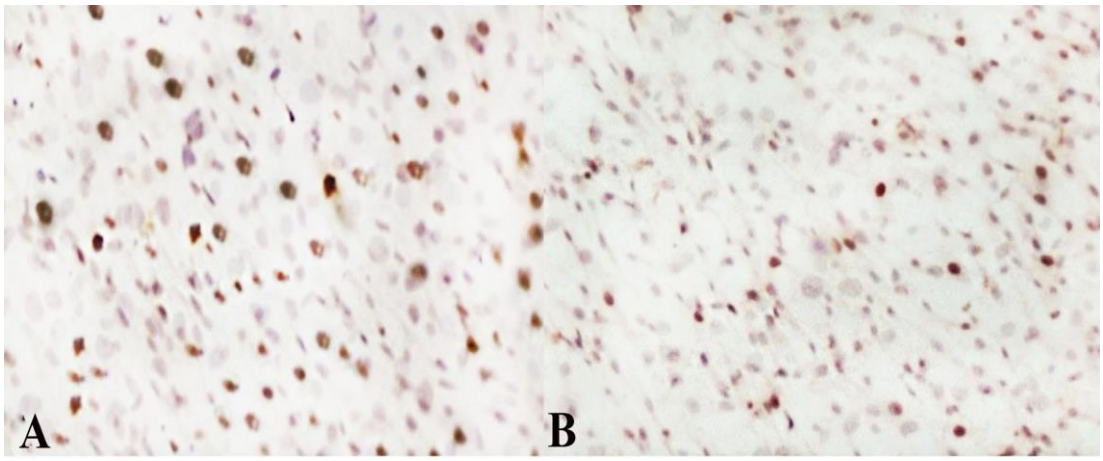
Şekil 22. Kontrol A grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik Ki-67 immunpozitif reaksiyon (x20).



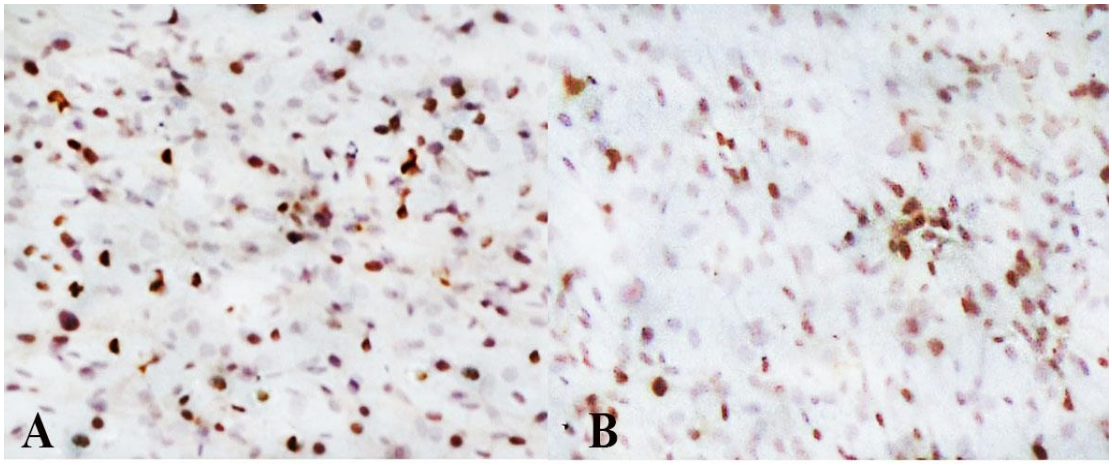
Şekil 23. Kontrol B grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik Ki-67 immunpozitif reaksiyon (x20).



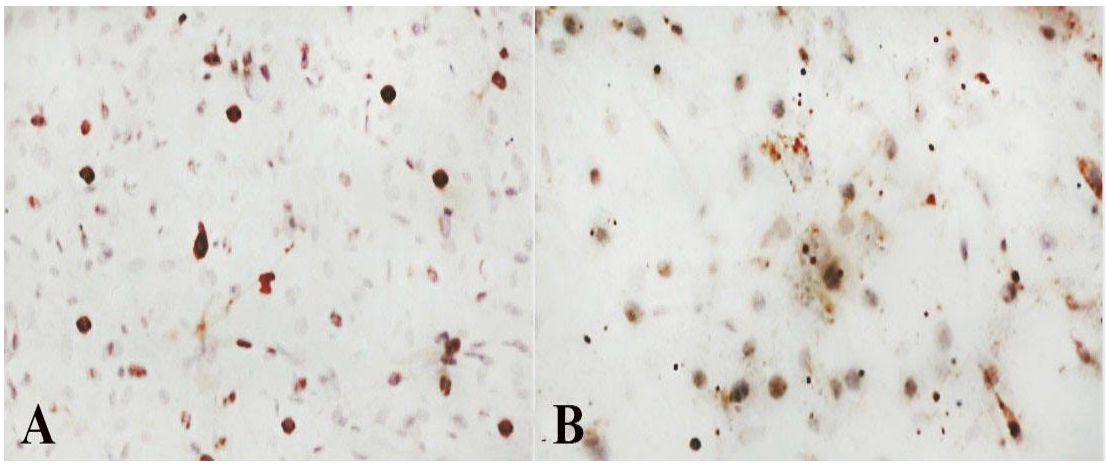
Şekil 24. 5µM CAP grubu A) 24 ve B) 48 saatlik Ki-67 immunpozitif reaksiyon (x20).



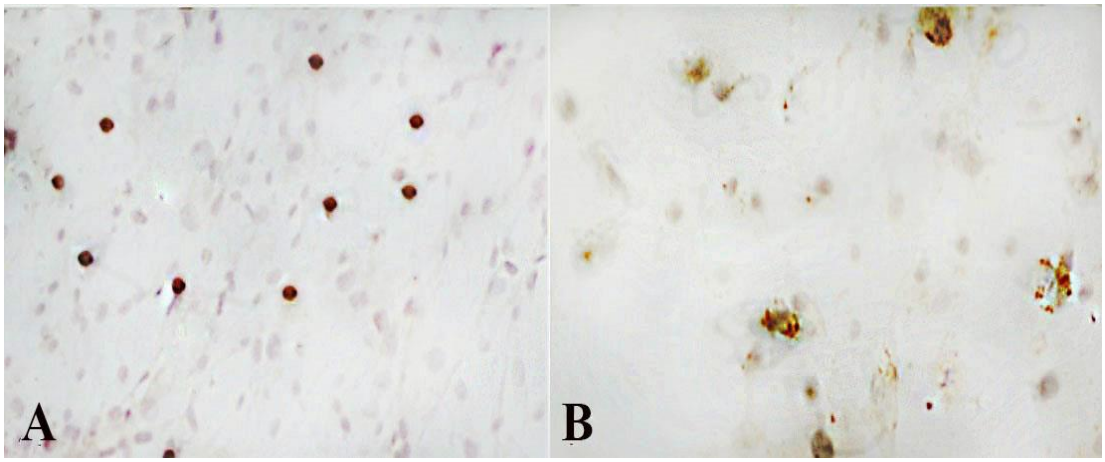
Şekil 25. 10µM CAP grubu A) 24 ve B) 48 saatlik Ki-67 immunpozitif reaksiyon (x20).



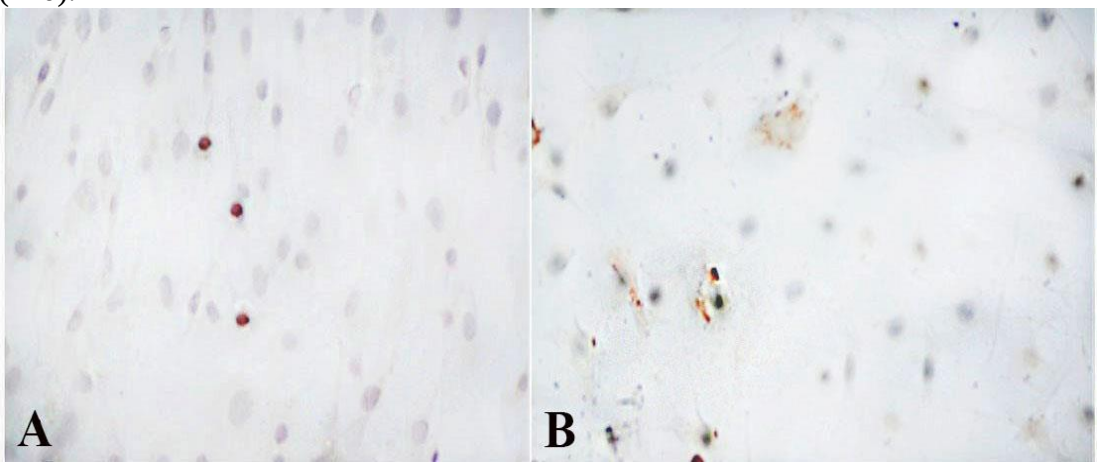
Şekil 26. 25µM CAP grubu A) 24 ve B) 48 saatlik Ki-67 immunpozitif reaksiyon (x20).



Şekil 27. 50µM CAP grubu A) 24 ve B) 48 saatlik Ki-67 immunpozitif reaksiyon (x20).



Şekil 28. 100µM CAP grubu A) 24 ve B) 48 saatlik Ki-67 immunpozitif reaksiyon (x20).



Şekil 29. 150µM CAP grubu A) 24 ve B) 48 saatlik Ki-67 immunpozitif reaksiyon (x20).

Kontrol grupları ile deney gruplarından 5, 10 ve 25 µM CAP uygulama dozlarında kök hücre gelişiminin olumlu yönde desteklendiğini ancak 25 µM'dan daha yüksek dozlarda ise hücrelerde farklılaşmanın başladığını belirledik (Şekil 24-26). Ayrıca 48 saatlik 50 µM CAP ile 24 ve 48 saatlik 100 ve 150 µM CAP dozlarında; hücre sitoplazmasının küçüldüğü, sitoplazmik uzantıların daha belirgin hale geldiği, hücre membranı, nukleus ve sitoplazmadaki apoptotik partiküllerin görüldüğünü saptadık (Şekil 28-29).

4.5. Capsaicin'in Mezenkimal Kök Hücre Fenotipi Üzerine Etkileri

Bu deney basamağında elde edilen kök hücrelerin; Capsaicin uygulaması sonucunda CD90, CD105, CD11b ve CD45 antikorları aracılığıyla MKH özellikleri kontrol edildi.

4.5.1. CD90 Pozitif Yüzey İşaretleyici

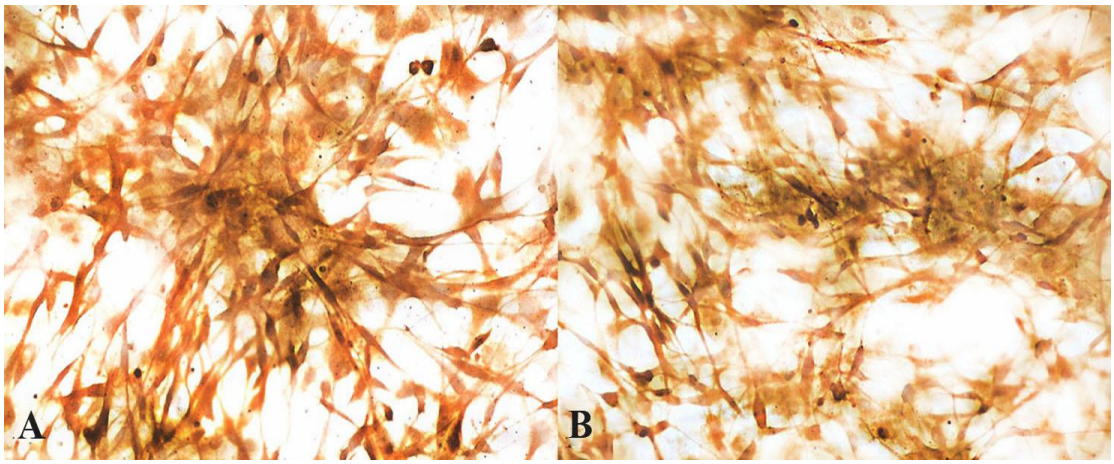
Farklı doz ve sürelerde CAP uygulanan MKH'lerde, kök hücre karakterizasyonunun CD90 antikoru üzerine etkisi saptandı (Tablo 2) (Şekil 30-37).

Tablo 2. Farklı doz ve sürelerde CAP uygulanan MKH'lerde CD90 immunoreaksiyonunun (%) ortalama ± SE değerleri.

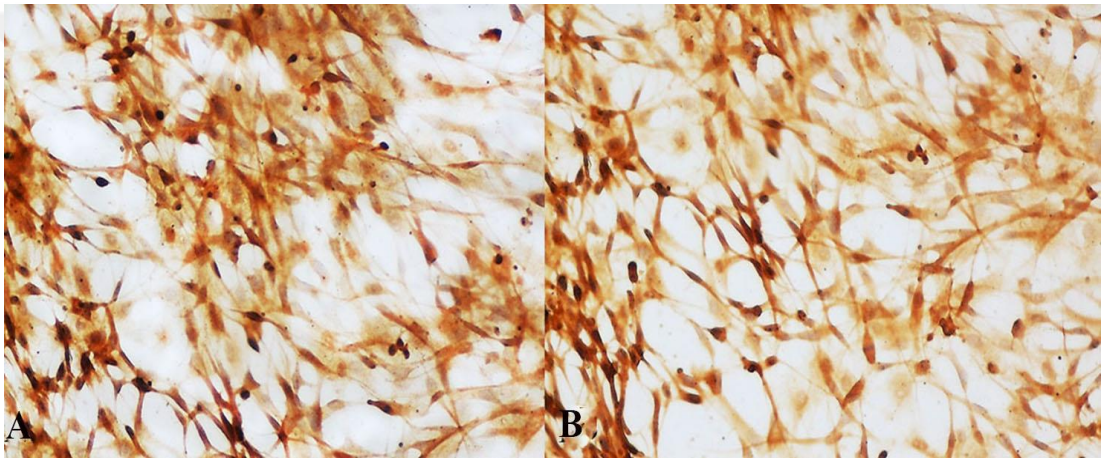
	Kontrol A	**Kontrol B**	**5 µM CAP**	**10 µM CAP**	**25 µM CAP**	**50 µM CAP**	**100 µM CAP**	**150 µM CAP**
24 saat	92,4±1,40[a]	91,20±1,77[a]	91,6±1,32[a]	90,8±0,86[a]	92,40±1,63[a]	82,8±1,65*[a]	72,6±0,92*[a]	71,0±0,54*[a]
48 saat	87,0±0,83[a]	87,40±1,40[a]	88,20±0,37[a]	88,20±0,37[a]	88,0±0,44[b]	72,6 ±1,24*[b]	71,0±0,70*[a]	66,60±1,20*[a]

Aynı satırdaki gruplar arasında istatistiki farklılık (*) P < 0,05 ile gösterilmektedir.
Aynı sütundaki gruplar arasında istatistiki farklılık (a, b) P < 0,05 ile gösterilmektedir.

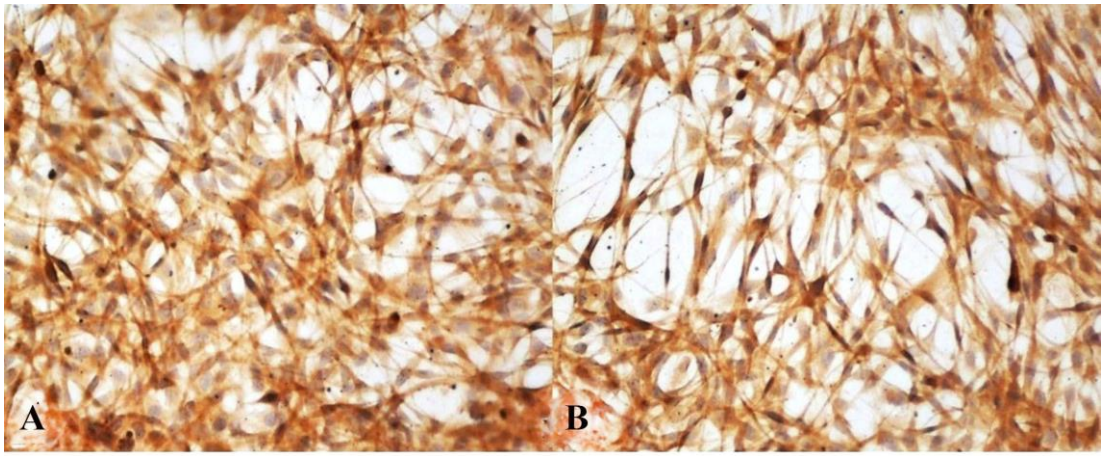
Deney ve kontrol gruplarına ait hücreler CD90 yüzey işaretleyicisi yönünden karşılaştırıldığında (Tablo 2); hem 24 hem de 48 saatlik uygulamalarda kontrol A, kontrol B ile 5, 10 ve 25 µM CAP dozları karşılaştırıldığında istatistiki bir farklılık gözlenmedi (P1=0,244, P2=0,395, P3=0,070, P4=0,395; P5=0,233, P6=0,233; P < 0,05). Ayrıca 24 ve 48 saatlik uygulamada 50 µM CAP üzerindeki dozlarda CD90 yüzey işaretleyicisinin istatistiki önem gösterecek şekilde azaldığı belirlendi (P1=0,027; P2-P6=0,009, P < 0,05). Sütunlar arasındaki grupların 24 ve 48 saatlik CAP uygulamalarının doz ve süreye bağlı değerlendirmesinde; 48 saatlik deney gruplarında CD90 immunreaksiyonunun azaldığı gözlendi (Tablo 2).



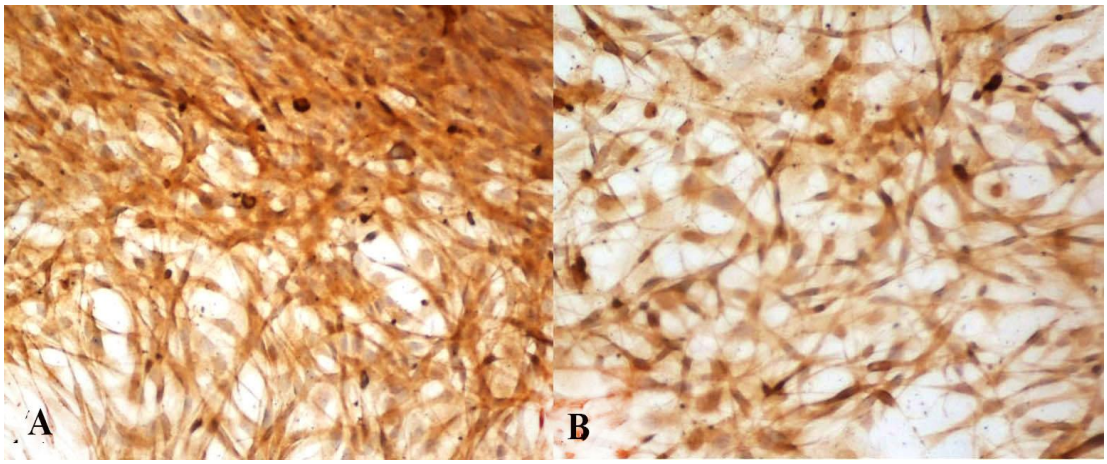
Şekil 30. Kontrol A grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD90 immunpozitif reaksiyon (x20).



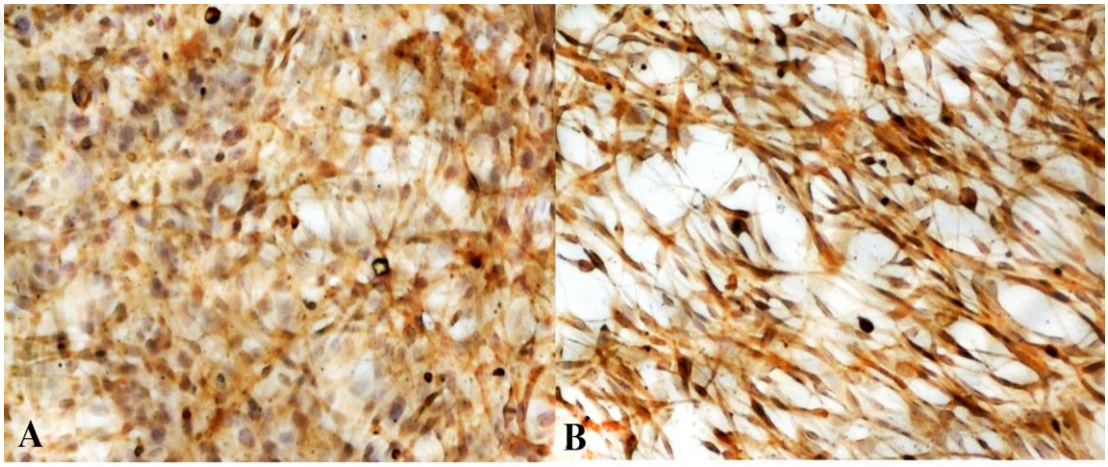
Şekil 31. Kontrol B grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD90 immunpozitif reaksiyon (x20).



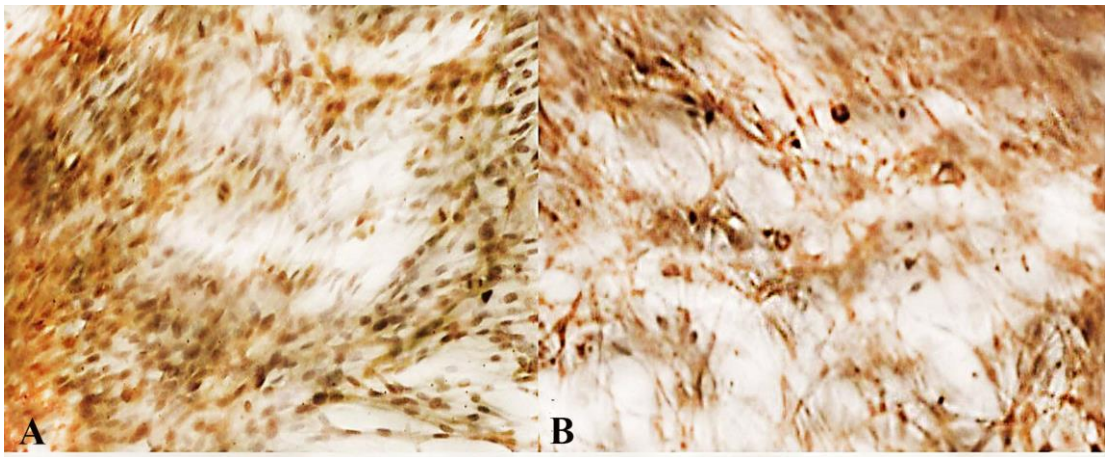
Şekil 32. 5µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD90 immunpozitif reaksiyon (x20).



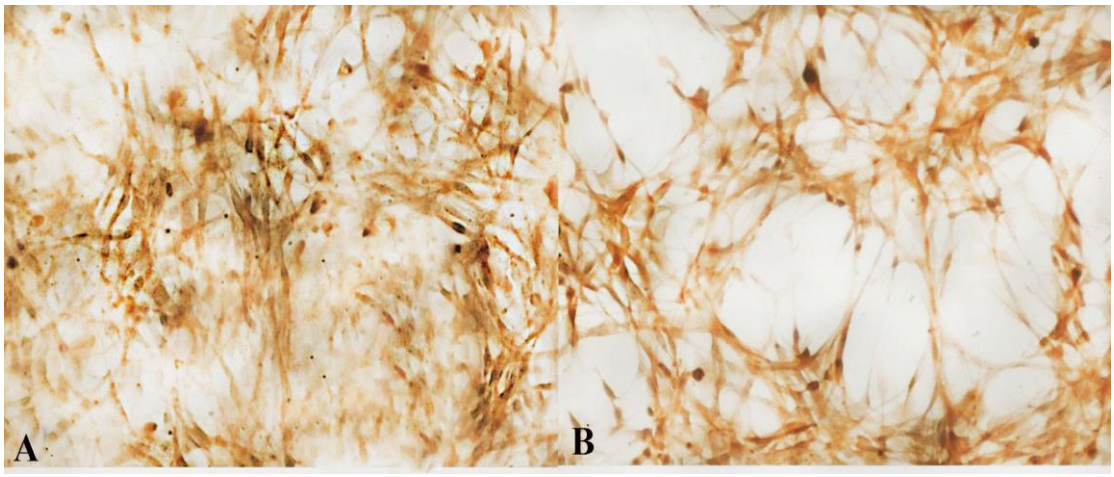
Şekil 33. 10µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD90 immunpozitif reaksiyon (x20).



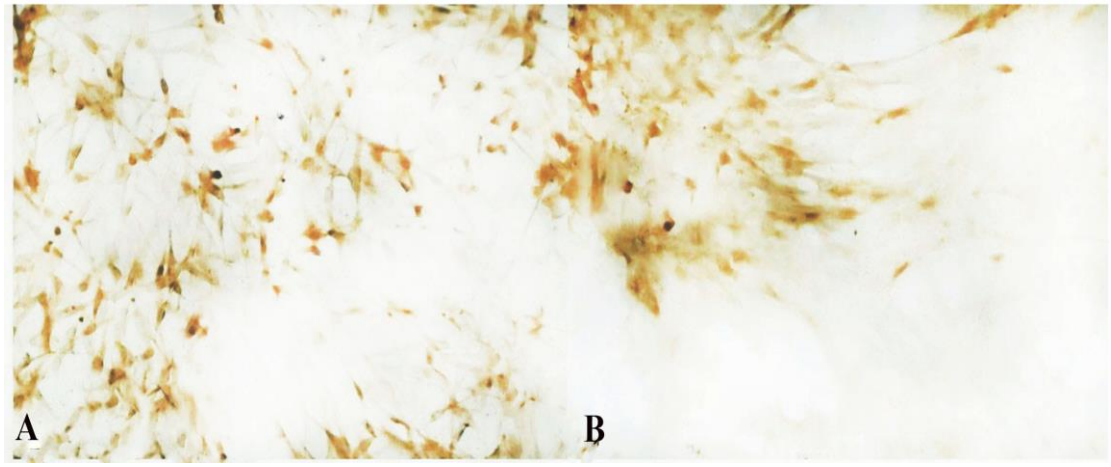
Şekil 34. 25µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD90 immunpozitif reaksiyon (x20).



Şekil 35. 50µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD90 immunpozitif reaksiyon (x20).



Şekil 36. 100 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD90 immunpozitif reaksiyon (x20).



Şekil 37. 150µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD90 immunpozitif reaksiyon (x20).

4.5.2. CD105 Pozitif Yüzey İşaretleyici

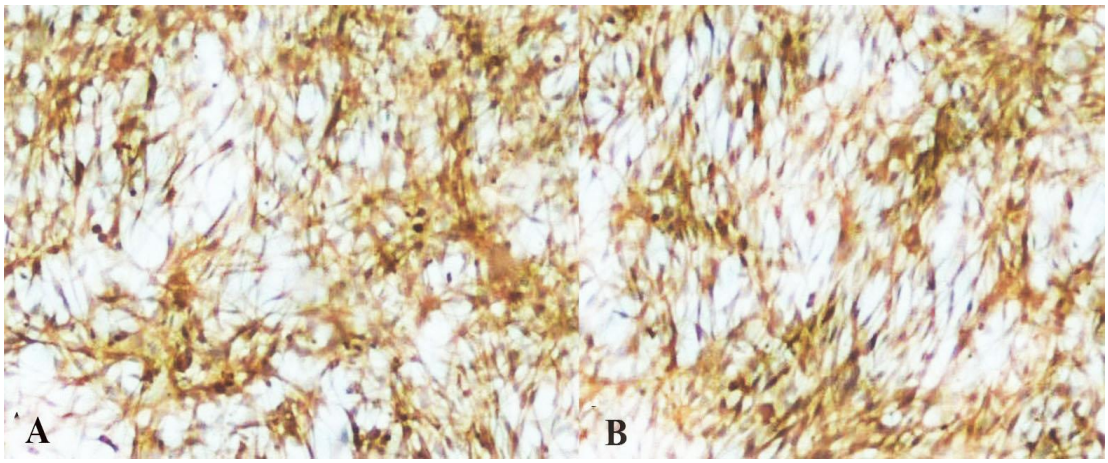
Farklı doz ve sürelerde CAP uygulanan MKH'lerde, kök hücre karakterizasyonunun CD105 antikoru üzerine etkisi saptandı (Tablo 3), (Şekil 38-45).

Tablo 3. Farklı doz ve sürelerde CAP uygulanan MKH'lerde CD105 immunreaksiyonunun (%) ortalama ± SE değerleri.

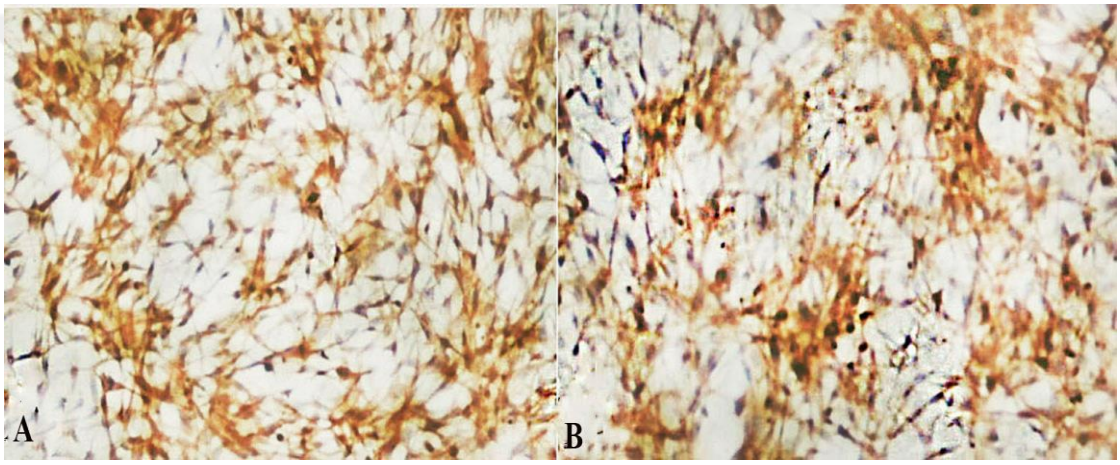
	Kontrol A	**Kontrol B**	**5 µM CAP**	**10 µM CAP**	**25 µM CAP**	**50 µM CAP**	**100 µM CAP**	**150 µM CAP**
24 saat	43,40±3,41[a]	50,80±1,93 [a]	54,0±0,94 [a]	61,40±0,50* [a]	64,60±1,56* [a]	60,40±1,40 *[a]	52,0±0,54 [a]	43,8 ± 3,26 [a]
48 saat	51,80±1,69 [a]	49,80±1,11 [a]	51,2±0,86 [a]	50,2±1,74 [b]	50,2±1,74 [b]	40.6±1.80* [b]	22.20±0,58** [b]	14,20±2,61** [b]

Aynı satırdaki gruplar arasında istatistiki farklılık (*) P < 0,05 ve (**) P < 0,001 ile gösterilmektedir.
Aynı sütundaki gruplar arasında istatistiki farklılık (a, b) P < 0,05 ile gösterilmektedir.

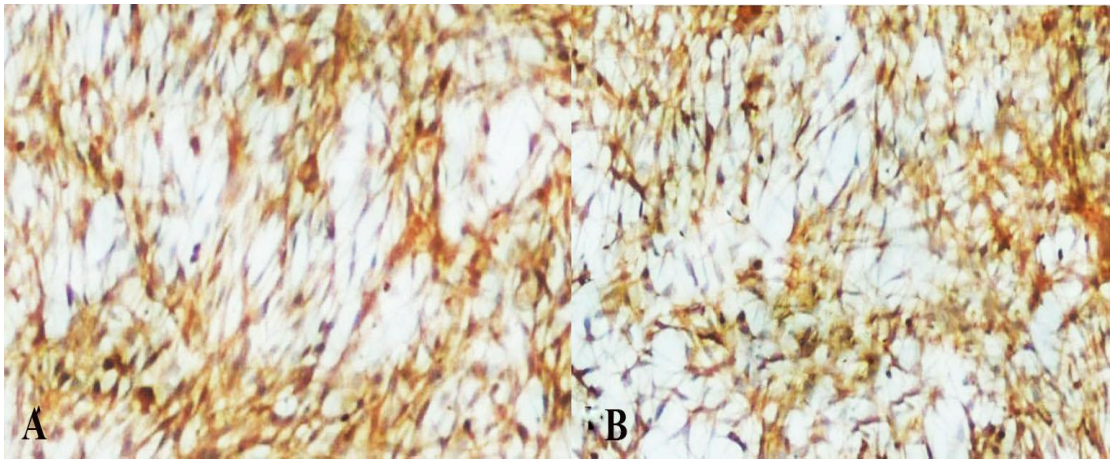
Deney ve kontrol gruplarına ait hücrelerin CD105 antikoruna verdiği immunreaksiyon değerlendirildiğinde; 24 saatlik sürede kontrol A, kontrol B ile 10, 25 ve 50 µM CAP dozlarındaki gruplar karşılaştırıldığında istatistiki anlamda önemli olup reaksiyonun arttığı saptandı (P1=0,009, P2=0,008, P3=0,012; P < 0,05). Ayrıca 24 saatlik uygulamada kontrol A, kontrol B ile 5, 100 ve 150µM CAP uygulamaları karşılaştırıldığında istatistiki anlamda farklılık saptanmadı (P1=0,136, P2=0,115, P3=0,834). 48 saatlik uygulamada ise kontrol A, kontrol B ile 5, 10 ve 25 µM CAP uygulama dozları karşılaştırıldığında CD105 artışı yönünden istatistiki anlamda bir farklılık gözlenmezken (P1=1,0, P2=1,0, P3=1,0); 50µM CAP ve üzerindeki dozlarda CD105 immunreaksiyonun istatistiksel düzeyde önemli olduğu ve azaldığı belirlendi (P1=0,001, P2=0,000, P3=0,000; P < 0,001). Sütunlar arasındaki grupların 24 ve 48 saatlik CAP uygulamalarının doz ve süreye bağlı değerlendirmesinde; 48 saatlik deney gruplarında CD105 immunreaksiyonunun azaldığı gözlendi (Tablo 3).



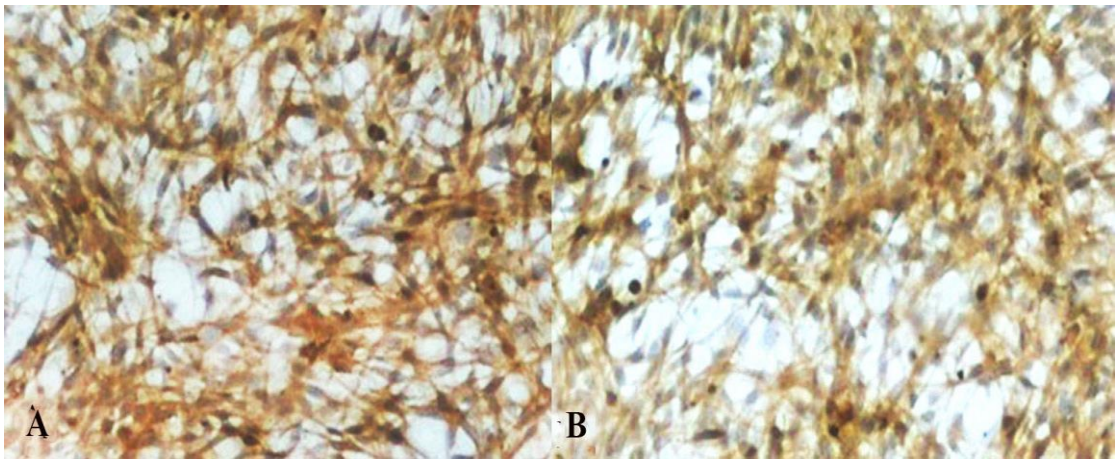
Şekil 38. Kontrol A grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD105 immunpozitif reaksiyon (x20).



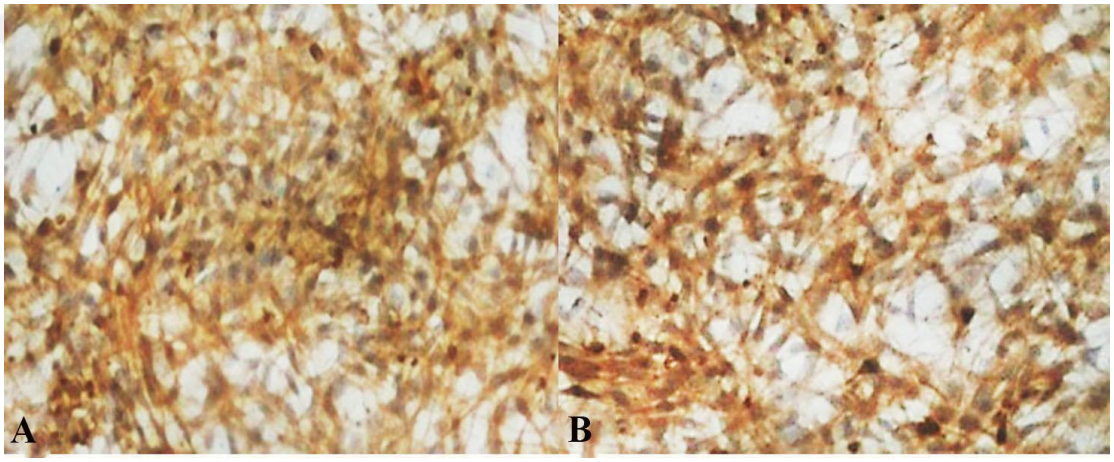
Şekil 39. Kontrol B grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD105 immunpozitif reaksiyon (x20).



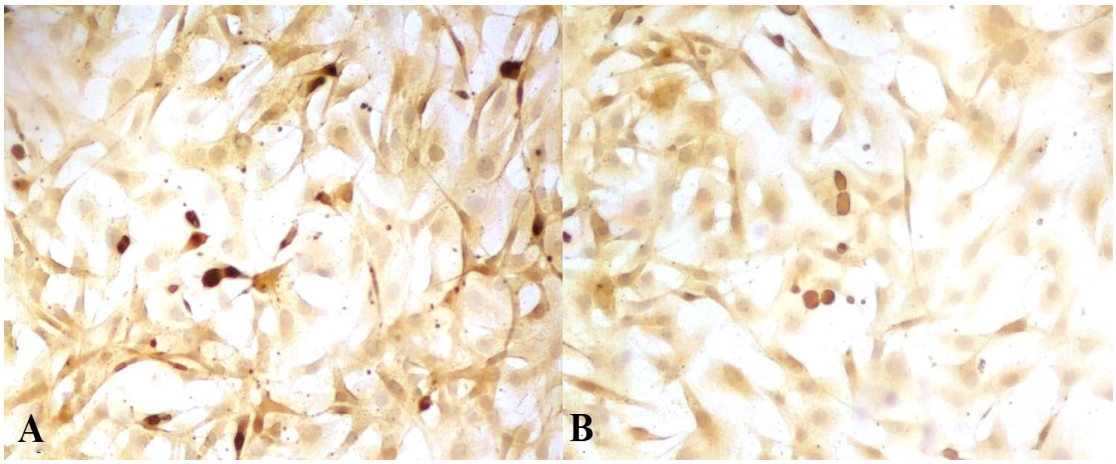
Şekil 40. 5 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD105 immunpozitif reaksiyon (x20).



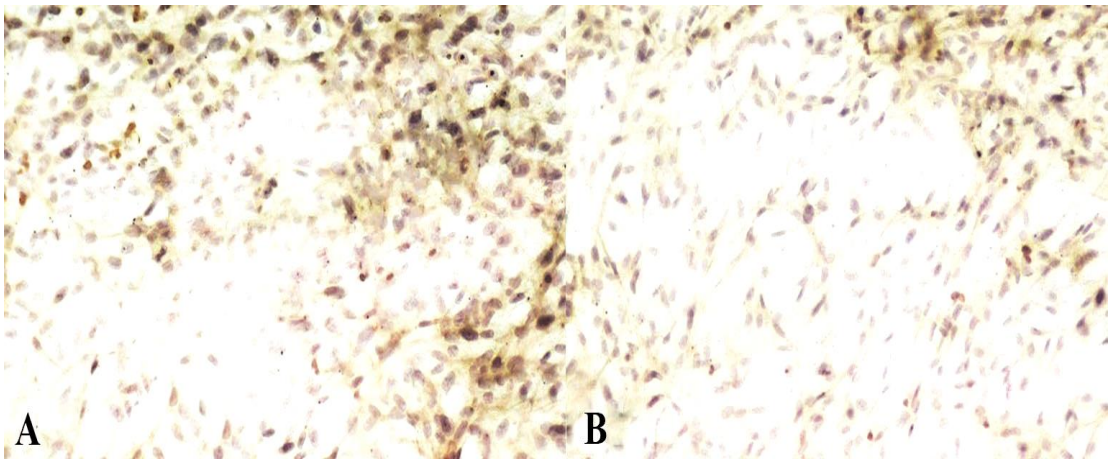
Şekil 41. 10 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD105 immunpozitif reaksiyon (x20).



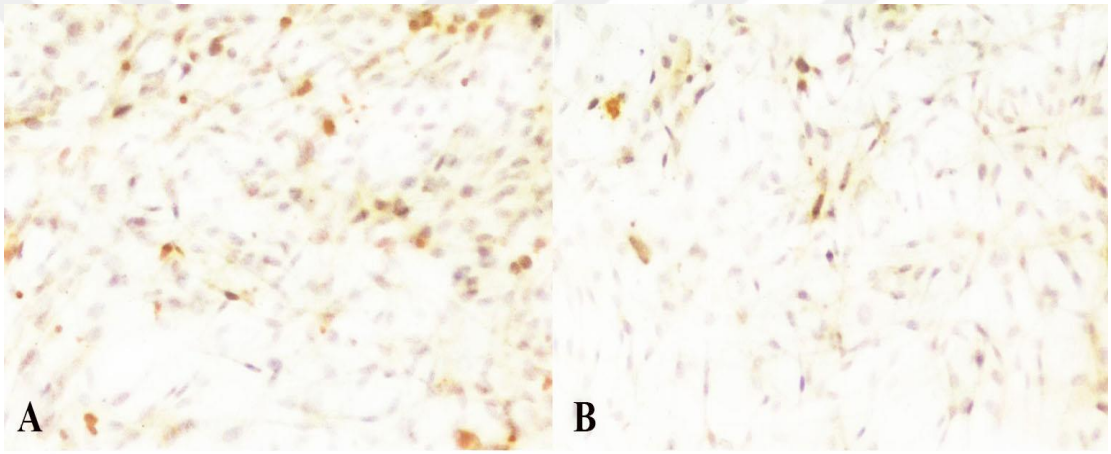
Şekil 42. 25 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD105 immunpozitif reaksiyon (x20).



Şekil 43. 50 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD105 immunpozitif reaksiyon (x20).



Şekil 44. 100 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD105 immunpozitif reaksiyon (x20).



Şekil 45. 150 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD105 immunpozitif reaksiyon (x20).

4.5.3. CD45 Negatif Yüzey İşaretleyici

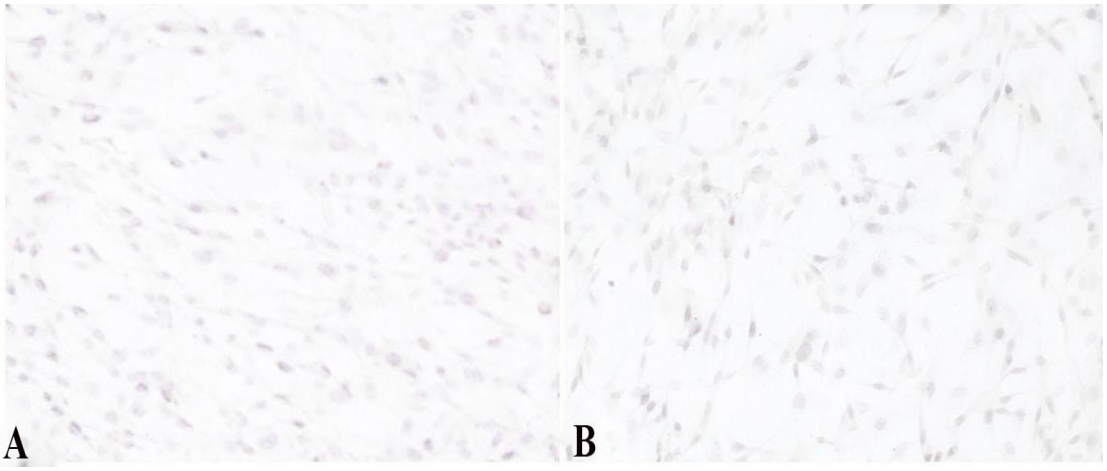
Farklı doz ve sürelerdeki CAP uygulanan MKH'lerde kök hücre karakterizasyonunun CD45 antikoru üzerine etkisi saptandı (Tablo 4), (Şekil 46-53).

Tablo 4. Farklı doz ve sürelerde CAP uygulanan MKH'lerde CD45 immunreaksiyonunun (%) ortalama ± SE değerleri.

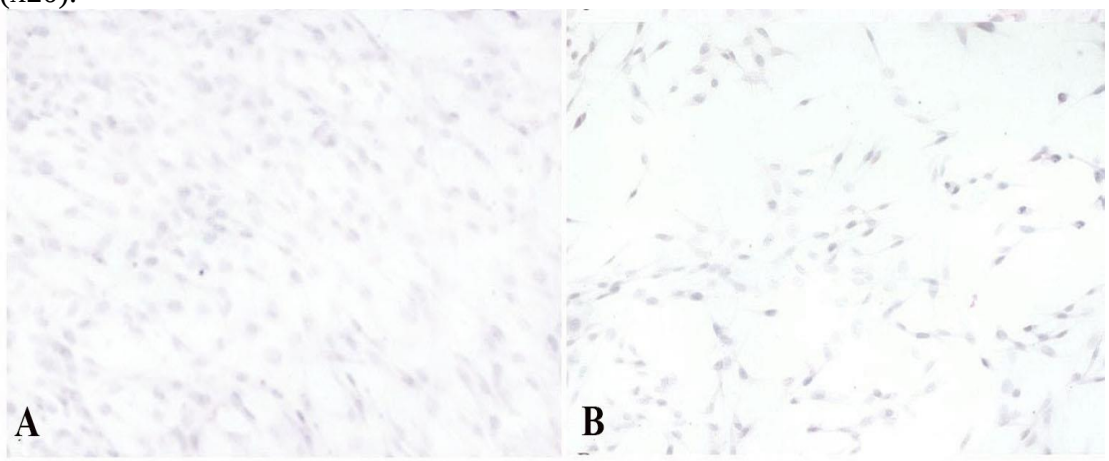
	Kontrol A	**Kontrol B**	**5 µM CAP**	**10 µM CAP**	**25 µM CAP**	**50 µM CAP**	**100 µM CAP**	**150 µM CAP**
24 saat	1,2±0,20[a]	1,1±0,20 [a]	1,3±0,30 [a]	1,4±0,24 [a]	2,0±0,54 [a]	4,0±0,89** [a]	6,4±0,74** [a]	10,0±1,22** [a]
48 saat	1,2±0,20 [a]	1,2±0,20 [a]	2,2±0,37 [a]	4,0±1,26 [a]	8,6±0,87*[b]	20,40 ±2,08* [b]	27,20±1,01* [b]	27,60±1,43* [b]

Aynı satırdaki gruplar arasında istatistiki farklılık (*) P < 0,05 ve (**) P < 0,001 ile gösterilmektedir.
Aynı sütundaki gruplar arasında istatistiki farklılık (a, b) P < 0,05 ile gösterilmektedir.

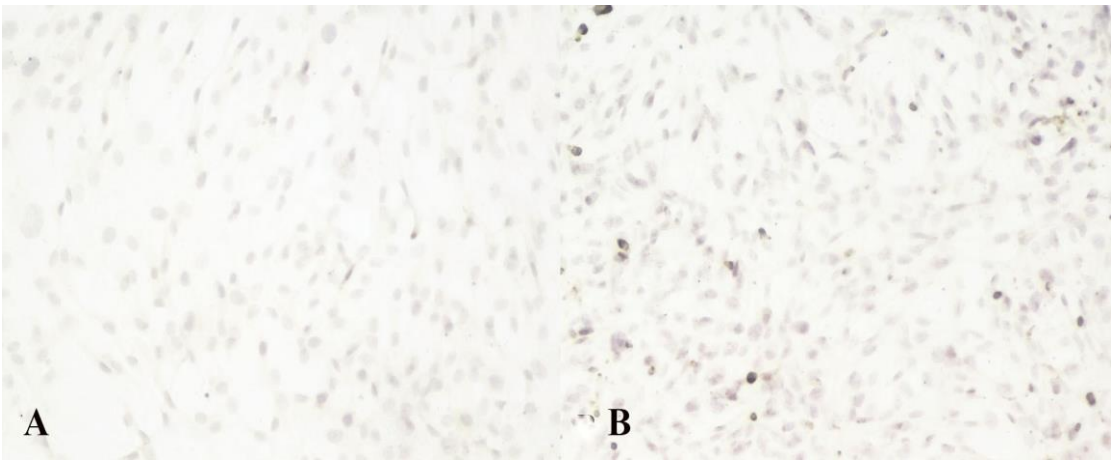
CD45 yüzey işaretleyicisi yönünden; 24 saatlik CAP uygulamasında kontrol A, kontrol B ile 5, 10 ve 25 µM CAP uygulama dozları arasında istatistiki bir önem saptanmadı (P1=1, P2=1, P3=0,513, P4=0,189, P5=0,100). Aynı zamanda 48 saatlik uygulamada kontrol A, kontrol B ile 5 ve 10µM CAP uygulama dozları arasında istatiksel anlamda farklılık gözlenmedi (P1=1, P2=1, P1=0,100, P2=0,054). Ancak 24 saatlik kontrol A, kontrol B ile 50, 100 ve 150µM CAP uygulama dozları arasında CD 45 immunreaksiyonunun arttığı ve istatiksel anlamda önem saptandı (P1=0,001, P2=0,001, P3=0,000; P < 0,001). Özellikle 48 saatlik uygulama süresince; 25, 50, 100 ve 150µM CAP dozlarında farklılık saptandı (P1=0,009, P2=0,006, P3=0,007, P4=0,007; P < 0,05). Sütunlar arasındaki grupların 24 ve 48 saatlik CAP uygulamaları doz ve süreye bağlı olarak değerlendirildiğinde; 48 saatlik deney gruplarında MKH özelliğinin değişerek CD45 immunreaksiyonunun artmaya başladığı gözlendi (Tablo 4).



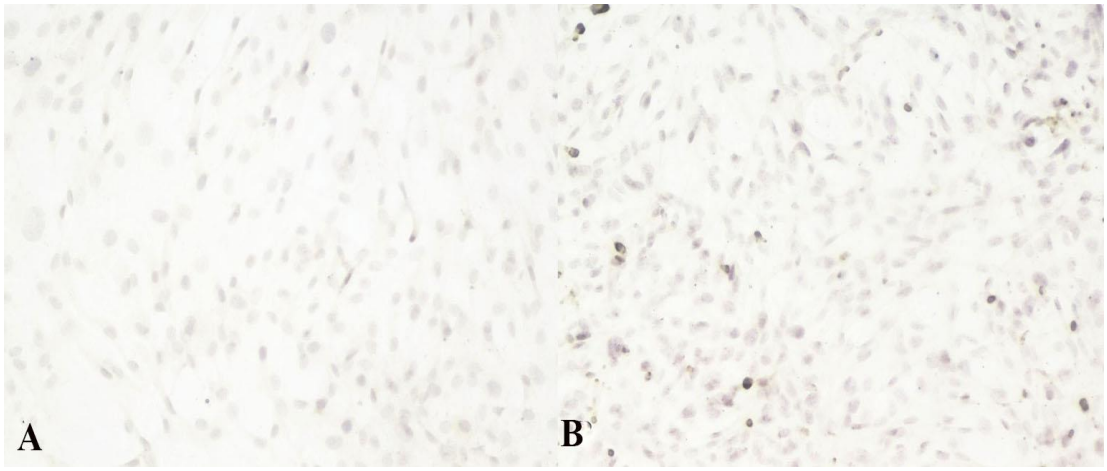
Şekil 46. Kontrol A grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD45 immunnegatif reaksiyon (x20).



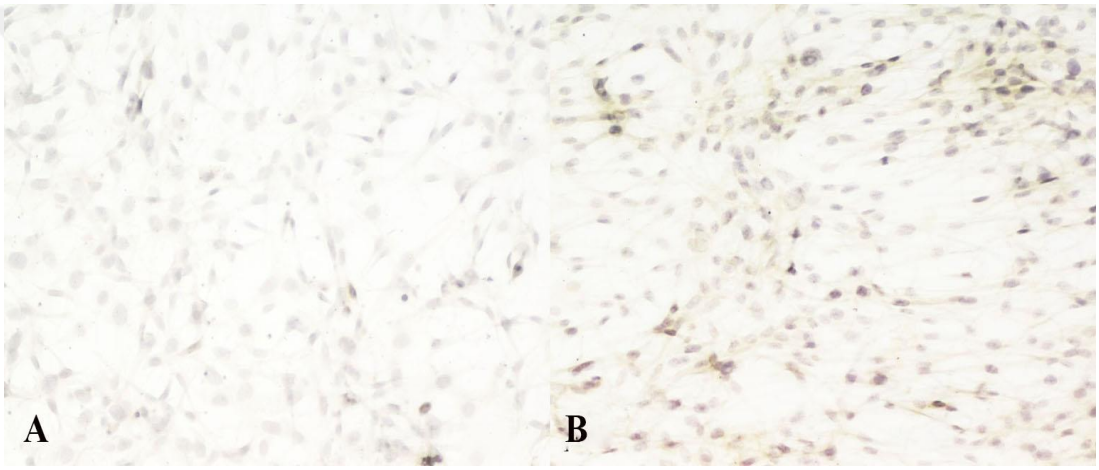
Şekil 47. Kontrol B grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD45 immunnegatif reaksiyon (x20).



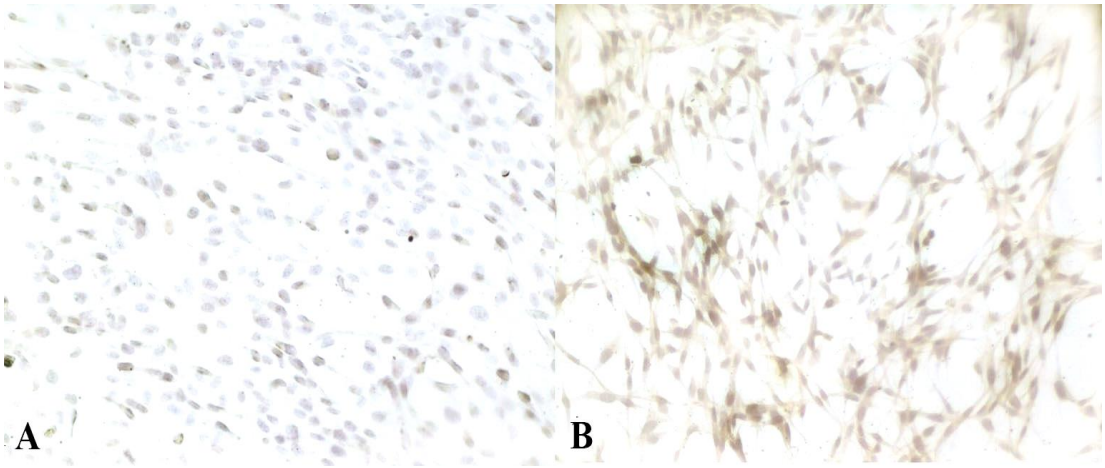
Şekil 48. 5 μM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD45 immunreaksiyon (x20).



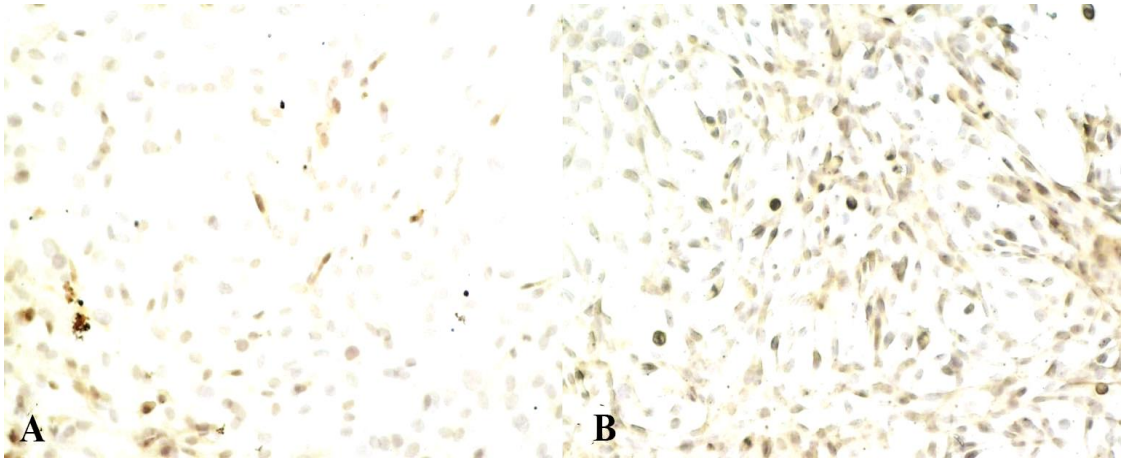
Şekil 49. 10 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD45 immunreaksiyon (x20).



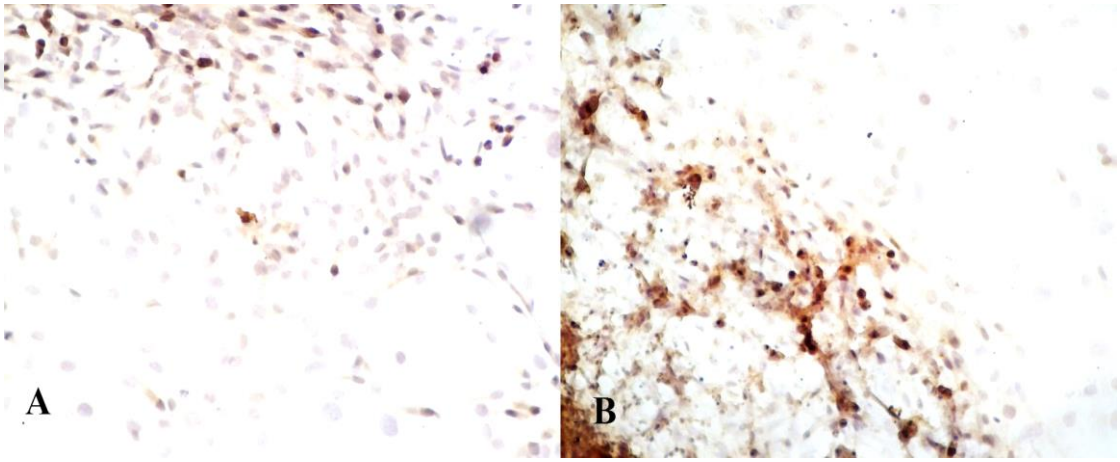
Şekil 50. 25 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD45 immunreaksiyon (x20).



Şekil 51. 50 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD45 immunreaksiyon (x20).



Şekil 52. 100 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD45 immunreaksiyon (x20).



Şekil 53. 150 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD45 immunreaksiyon (x20).

4.5.4. CD11b Negatif Yüzey İşaretleyici

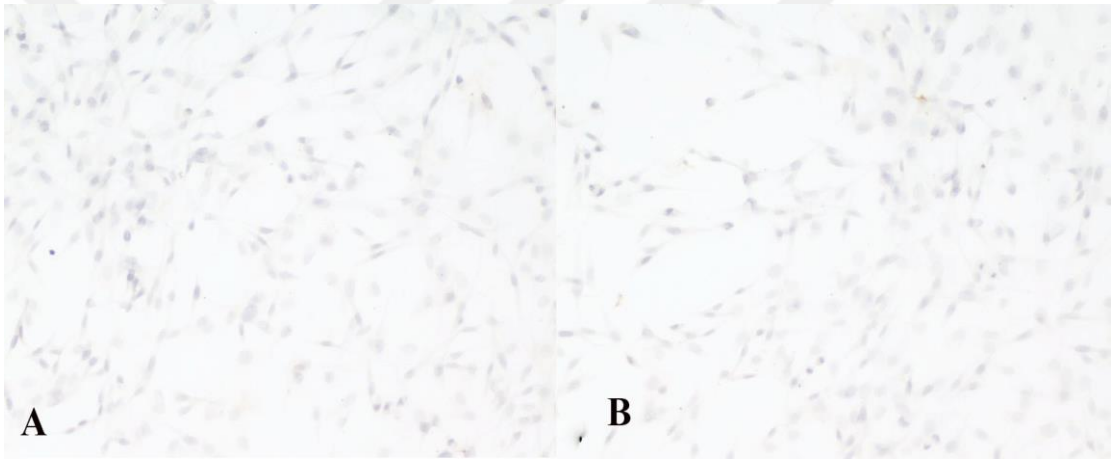
Farklı doz ve sürelerde CAP uygulanan MKH'lerde kök hücre karakterizasyonunun CD11b antikoru üzerine etkisi saptandı (Tablo 5) (Şekil 54-61).

Tablo 5. Farklı doz ve sürelerde CAP uygulanan MKH'lerde CD11b negatif immunreaksiyonunun (%) ortalama ± SE değerleri.

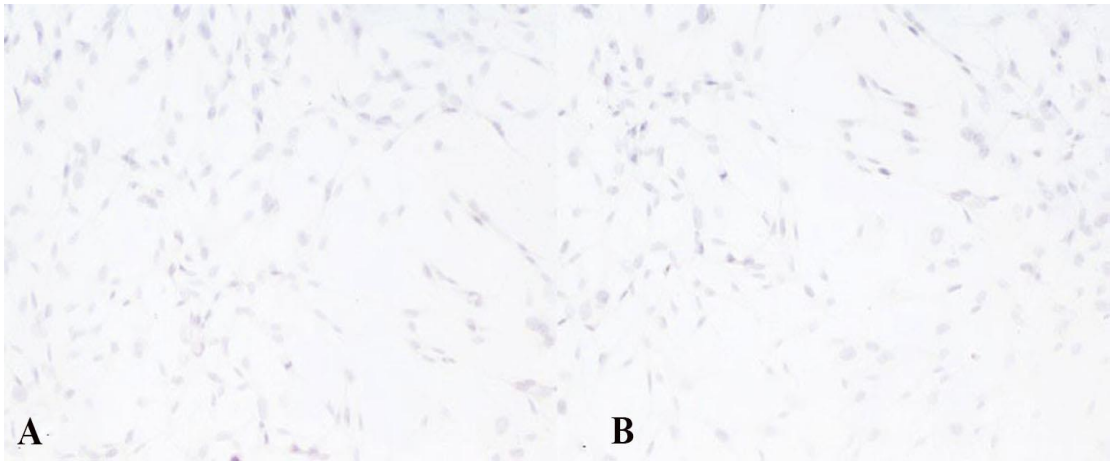
	Kontrol A	**Kontrol B**	**5 µM CAP**	**10 µM CAP**	**25 µM CAP**	**50 µM CAP**	**100 µM CAP**	**150 µM CAP**
24 saat	1,2±0,37 [a]	1,4±0,24 [a]	1,6±0,24 [a]	1,8±0,37 [a]	1,9±0,50 [a]	2,4±0,48*[a]	7,0±0,31*[a]	10,8±0,86**[a]
48 saat	1,4±0,24 [a]	1,4±0,24 [a]	1,8±0,48 [a]	6,0±1,44 [a]	11,2 ±2,26**[b]	17,0 ±0,89**[b]	24,20±1,65**[b]	28,80±1,39**[b]

Aynı satırdaki gruplar arasında istatistiki farklılık (*) P < 0,05 ve (**) P < 0,001 ile gösterilmektedir.
Aynı sütundaki gruplar arasında istatistiki farklılık (a, b) P < 0,05 ile gösterilmektedir.

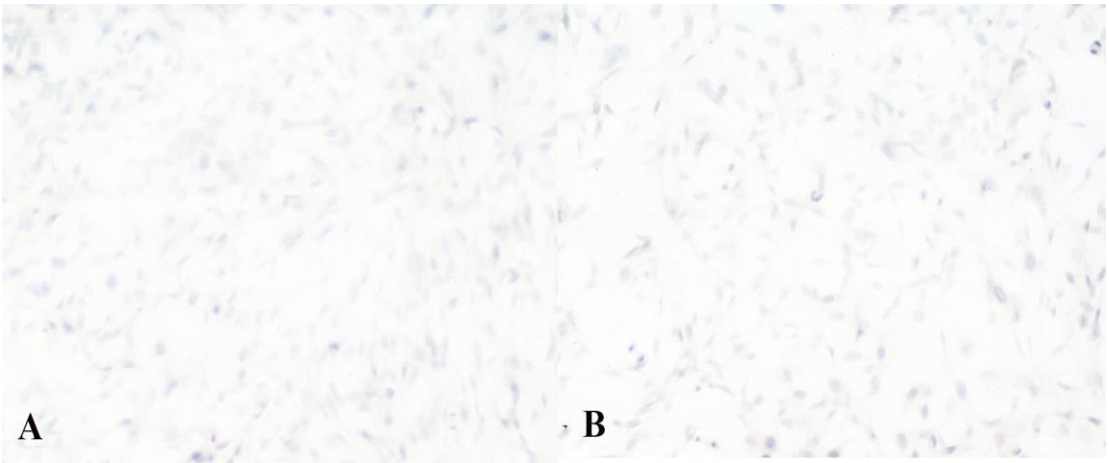
Deney ve kontrol gruplarına ait hücrelerin CD11b yüzey işaretleyicisi yönünden değerlendirmesinde; 24 saatlik uygulamanın kontrol A, kontrol B ve 5 µM CAP uygulama dozları için istatistiki düzeyde fark gözlenmedi (P1=0,704, P2=0,741, P3=0,740) ancak 50 µM ve üzerindeki CAP uygulama dozlarında CD 11b reaksiyonunun istatistiki anlamda arttığı gözlendi (P1=0,036, P2=0,029, P3=0,000; $P < 0,05$ ve $P < 0,001$). Ayrıca 48 saat CAP uygulamasında kontrol A, kontrol B ile 25 µM CAP ve üzerindeki uygulama dozları arasında CD11b'nin artışı yönünden istatistiksel anlam bulundu (P1=0,001, P2=0,000, P3=0,000, P4=0,000; $P < 0,001$). Sütunlar arasındaki grupların 24 ve 48 saatlik CAP uygulamaları doz ve süreye bağlı olarak değerlendirildiğinde; 48 saatlik deney gruplarında MKH özelliğinin değişerek CD11b immunreaksiyonunun artmaya başladığı gözlendi (Tablo 5).



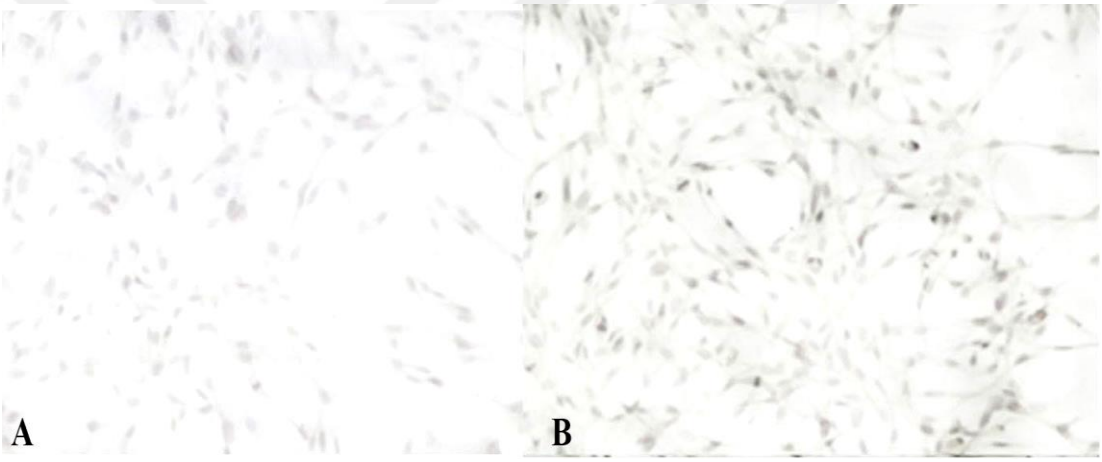
Şekil 54. Kontrol A grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD11b immunnegatif reaksiyon (x20).



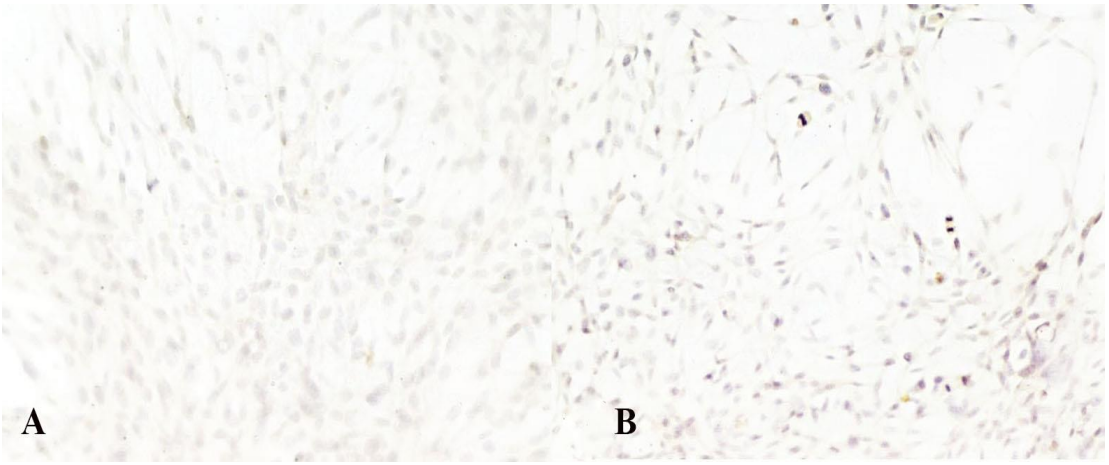
Şekil 55. Kontrol B grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD11b immunnegatif reaksiyon (x20).



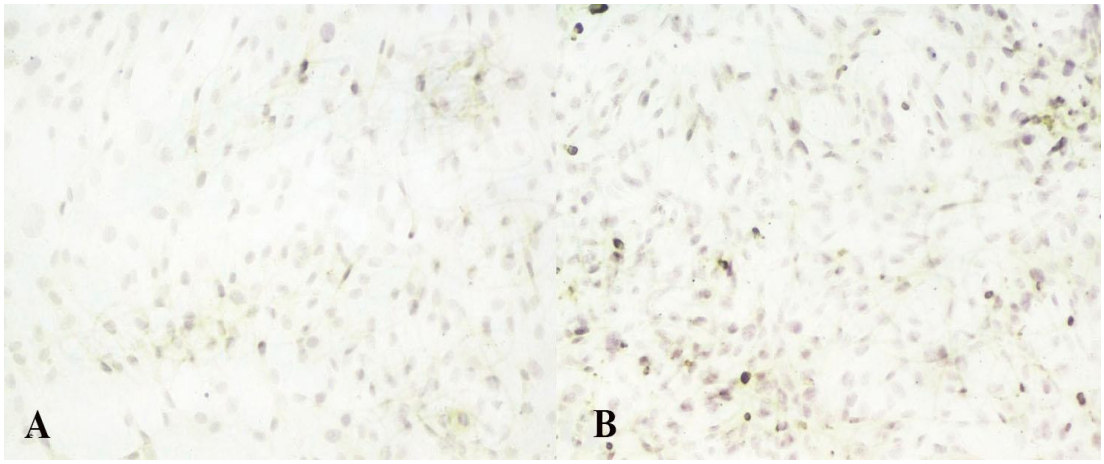
Şekil 56. 5 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD11b immunreaksiyon (x20).



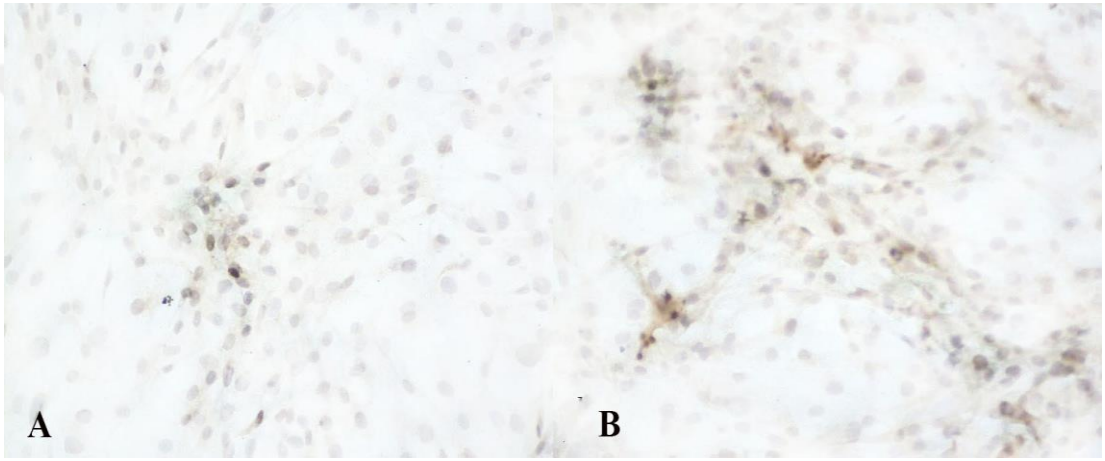
Şekil 57. 10 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD11b immunreaksiyon (x20).



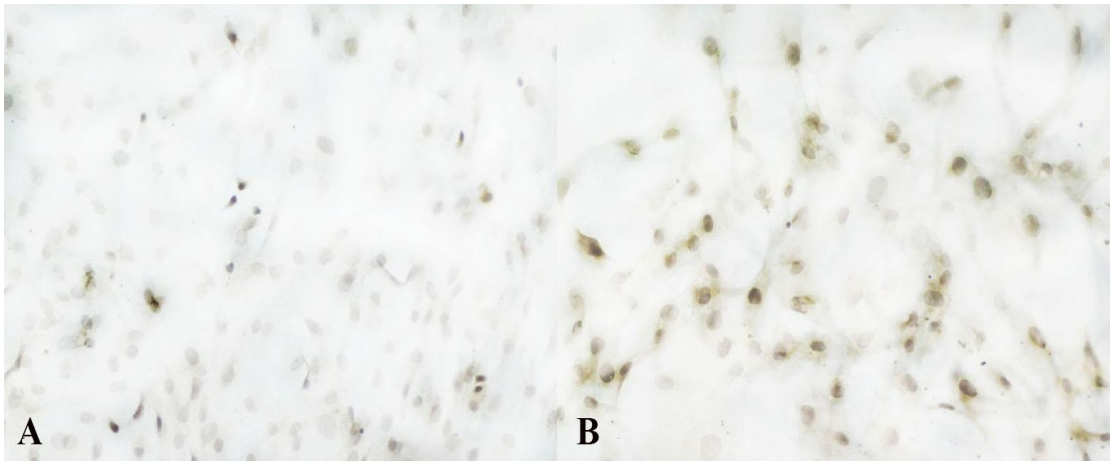
Şekil 58. 25 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD11b immunreaksiyon (x20).



Şekil 59. 50 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD11b immunreaksiyon (x20).



Şekil 60. 100 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD11b immunreaksiyon (x20).



Şekil 61. 150 µM CAP grubu; A) 24 ve B) 48 saatlik CD11b immunreaksiyon (x20).

4.6. Capsaicin'in Mezenkimal Kök Hücreler Üzerine Etkisinin MTT Testi ile Değerlendirilmesi

Mezenkimal kök hücrelere farklı doz ve sürelerde uygulanan CAP'ın hücre canlılığına etkileri MTT testi ile değerlendirildi. MTT bulgularında; 24 saat 25 µM CAP doz uygulaması sonucunda hücre proliferasyonunun istatistiksel düzeyde arttığı ancak 150 µM CAP uygulaması ile proliferasyonun $P < 0,05$ istatistiki düzeyinde azaldığı gözlendi. Ayrıca 48 saatlik uygulamanın 5, 10 ve 25 µM CAP dozlarında da $P < 0,05$; 50, 100 ve 150 µM CAP uygulamalarında ise proliferasyonun azaldığı ve $P < 0,001$ düzeyinde istatistiksel anlamda önemli olduğu belirlendi. Aynı sütundaki grupların 24 ve 48 saatlik CAP uygulaması sonrasındaki MTT testi sonuçlarında; doz ve süreye bağlı olarak 48 saatlik deney gruplarında canlı hücre sayısının 24 saatliğe oranla daha fazla azaldığı belirlendi. Ayrıca mikrofotoğrafik incelemelerde 24 ve 48 saatlik CAP uygulamalarının özellikle yüksek doz ve uzun süre uygulamalarda (100 ve 150 µM CAP dozları) mezenkimal kök hücrelerin çekirdeğinde küçülme ile parçalanma görülürken, sitoplazmasında ise küçülme ve ölü hücresel yapıların arttığı gözlendi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Erişkin canlıda subkutan ve abdominal yağ dokusu önemli mezenkimal kök hücre kaynağıdır. Yağ dokusunun; minimal invazif yöntemlerle erişilebilir olması, cerrahi prosedürün düşük morbiditesi, dokudan hücrelerin pratik, izolasyonu, *in vitro* kültüre edilebilmesi ve allogenik transplantasyona izin verebilecek immünmodülatör özelliklere sahip olması klinik uygulamalar yönünden değerlidir (Zuk ve ark., 2001). Chi ve ark., (2015) 10 adet Lewis erkek sıçan ile deri altı ve inguinal yağ dokularından kök hücre izolasyonun üçüncü gününde tipik fibroblastoid benzeri formasyonda hücreler oluştuğunu ve hücrelerin pasajlanarak izole edildiğini bildirmişlerdir. Yoshimura ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada ise; enzimatik ile non enzimatik izolasyon tekniğini karşılaştırarak yağ doku lipoaspiratından kök hücrelerin non enzimatik yöntemle birinci haftada ve daha hızlı pasajlanarak izole edildiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda inguinal ve derialtı yağ dokusundan non enzimatik yöntemle elde ettiğimiz yağ doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin; Chi ve ark., (2015) ile Yoshimura ve ark. (2006)'nın çalışmalarına benzer şekilde üçüncü gün ve sonrasındaki günlerde fibroblast benzeri hücre formasyonu oluşturduğu ve hücrelerin pasajlanarak izole edilebildiği saptandı.

Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunun tanımlandığı çalışmalarda (Zuk ve ark., 2002; Sakaguchi ve ark., 2005; Bunnell ve ark., 2008); pasaj 3 mezenkimal kök hücrelerde osteojenik farklılaşma sağlanarak kalsiyum mineralizasyonu için Von Kossa veya Alizarin Red histokimyasal boyama teknikleri kullanılarak gösterilmiş ve 21. günde osteoblast hücrelerinin identifikasyonu yapılmıştır. Tez çalışmamızda da pasaj 3 mezenkimal kök hücrelerinin; 14. günde osteoblast hücrelerine farklılaşmaya başladığı, benzer araştırmalara (Zuk ve ark., 2002; Sakaguchi ve ark., 2005; Bunnell ve ark., 2008) paralel olarakta 21 günde, mezenkimal kök hücrelerin osteoblast hücrelerine farklılaştığı; hücre dışı, hücre içi matriks nodüllerinin arttığı ve kalsiyum mineralizasyonun oluşumunun devam ettiği saptandı. Osteoblast hücre farklılaşmasının identifikasyonu için Alizarin Red boyama tekniği uygulanarak kırmızı renkte boyanan osteoblast hücreleri literatür bilgisine (Zuk ve ark., 2002; Sakaguchi ve ark., 2005; Bunnell ve ark., 2008) benzer şekilde tanımlandı.

Moraes ve ark. (2016) pasaj 3 mezenkimal kök hücre hattındaki kondrojenik farklılaşmanın 14. günde fibroblastoid hücre popülasyonunun küboidal hücrelere dönüşmeye başladığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda kondrojenik farklılaşma çalışmalarına (Bunnel ve ark., 2008; Moraes ve ark., 2016) benzer şekilde kıkırdak matriks oluşumunu gösteren proteoglikanların 21 gün sonra oluştuğu ve belirgin kondrojenik yönde farklılaşan hücreler görüldü. Çalışmamızda; pasaj 3 hücrelerin 21 gün sonra kondrojenik yönde farklılaştığı Alcian Blue boyama tekniği ile belirlenerek elde ettiğimiz hücrelerin kondroblast hücreleri olduğu saptandı.

Birçok araştırmacı (Zuk ve ark., 2001; Taha & Hedayati, 2010; Huang ve ark., 2013); pasaj 3 mezenkimal kök hücre hattındaki adipojenik yönde farklılaşmanın birinci haftasında yassı formdaki hücrelerin vakuoler hücrelere dönüştüğünü rapor etmişlerdir. Bu vakuoler formdaki hücrelerin sitoplazmasında lipid damlacıklarının görüldüğü ve hücrelerin adipositler olduğunu bildirmişlerdir. Tez çalışmamızda; birçok araştırma bulguları ile (Zuk ve ark., 2001; Taha, & Hedayati, 2010; Huang ve ark., 2013) paralel olarak; 5. günde hücre sitoplazmasında lipid vakuollerini, hücre popülasyonunun fibroblastoid yassı görünümden yuvarlak adiposit hücrelerine dönüştüğünü ve 14 gün sonra hücre popülasyonunun % 70'inde lipid damlacıklarının belirgin olarak arttığını, adipojenik yönde farklılaştırdığımız hücrelerin Oil Red O histokimyasal boyama tekniği ile kırmızı renkli vakuoller oluşturarak adipositlere dönüştüğünü saptadık.

ISCT tarafından kabul gören çeşitli kök hücre yüzey işaretleyicileri olan CD44, CD29, CD73, CD105 ve CD90'ın kök hücrelerde taşınırken; CD14, CD34, CD44 ve CD117 gibi yüzey işaretleyicilerinin ise olmaması gerektiği ve bu özelliklere sahip kök hücrelerin ise MKH oldukları tanımlanmıştır (Dominici ve ark., 2006; Huang ve ark., 2013). Yoshimura ve ark. (2006) non enzimatik yöntemle izole ettikleri hücrelerde CD44 (44,8 ± 11.0), CD73 (99,7 ± 0,3), CD29 (99,3 ± 1,0), CD105 (99,8 ± 0,1) ve CD90 (99,7 ± 0,39)'ın pozitif stromal/mezenkimal kök hücre yüzey işaretleyicilerinin yüksek oranda gözlendiğini ve CD45 (1.7 ± 1.4), CD34 (10,7 ± 9,2) gibi hematopoietik yüzey işaretleyicilerinin ise daha az olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte non enzimatik yöntem ile MKH izolasyonunda; sağlıklı ve yüksek oranda kök hücre potansiyeline sahip yüzey işaretleyicisi taşıyan hücrelerin elde edildiğini saptamışlardır (Yoshimura ve ark., 2006). Dominici ve

ark., (2006); Yoshimura ve ark., (2006) ve Huang ve ark., (2013)'nın; bulgularına paralel olarak; çalışmamızda non enzimatik yöntemle izole ettiğimiz bu hücrelerin CD90 ve CD105 yüzey işaretleyicilerinin immunpozitif; CD45 ve CD11b yüzey işaretleyicilerinin ise immunnegatif reaksiyon verdiği saptandı. Böylece ürettiğimiz pasaj 3 hücrelerinin, mezenkimal kök hücre potansiyelinde olduğunu göstererek fenotipik karakterizasyonu tanımlandı.

CD90 pozitif olan hücrelerin; fibroblast benzeri morfolojiye sahip olduğu CD90 taşımayan hücrelerin ise poligonal hücre formuna farklılaştığı bildirilmektedir (Moraes ve ark., 2016). Benzer şekilde çalışmamızdaki pasaj 3 hücrelerinin fibroblast benzeri yapıya sahip olduğu CD90 pozitif reaksiyon verdiği saptandı. Aynı zamanda Moraes ve ark. (2016) tarafından CD90 kök hücre yüzey işaretleyicisi ile pozitif reaksiyon veren hücrelerin henüz farklılaşmamış olduğunu veya CD90'ın azalmasının hücrelerin farklılaşmaya başlaması açısından kilit bir role sahip olduğunu belirtmektedir. Özellikle farklılaşmış olan adiposit hücrelerinde CD90 bulunmazken; MKH'lerin farklılaşma potansiyelinin korunması ve terapötik etkinliği açısından da CD90 taşınmasının önemli olduğu belirtilmektedir (Moraes ve ark., 2016). Hazırlanan tez çalışmamızda primer hücre kültürü ile yağ dokusundan izole ettiğimiz pasaj 3 hücrelerinin; plastik yüzeye tutunarak çoğaldığı, homojen fibroblastoid popülasyona sahip olduğu, osteojenik, kondrojenik ve adipojenik yönde farklılaşabildiği ve hücrelerin CD90 ile CD105 yönünden immunpozitif ve CD11b ile CD45 yüzey işaretleyicileri açısından immunnegatif reaksiyon verdiği tanımlandı. Literatür bilgisine (Özen & Gül Sancak, 2014; Kibria, Altunbaş, & Yağcı, 2015; Gül Sancak, Özen, Bayraktaroğlu, Ceylan, & Can, 2016; Çerçi, & Erdost, 2020) paralel olarak, çalışmamızda yağ doku kökenli mezenkimal kök hücrelerden izole edilen pasaj 3 hücre hattına ait hücrelerde hemostazisin devamının sağlandığı ve sağlıklı kök hücre proliferasyonunun gerçekleştiği görüldü.

Gerdes ve ark., (1984) ile Ross ve Hall, (1995) hücre proliferasyonunu Ki-67 antikorunun immunreaksiyonu ile değerlendirerek; sadece mitoz fazındaki hücrelerde Ki-67 antikorunun nükleusta pozitif reaksiyon verdiğini belirtmektedirler. Özellikle hücre döngüsü analizinde, Ki-67 antikoru G1, S, G2 ve mitotik fazdaki hücre nukleusunda bulunurken; G0 fazındaki hücrelerde Ki-67 antikorunun bulunmadığı rapor edilmiştir (Gerdes ve ark.,1984). Gronthos ve ark., (2001) tarafından yapılan

çalışmada Ki-67 antikorunun bulunduğu ve hücre proliferasyonunun pozitif olduğu S ve G2/M fazlarında mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasının olumlu yönde arttığını belirtmişlerdir (Gronthos ve ark., 2001). Tez çalışmamızda, CAP'a bağlı olarak hücresel canlılığın, sağlıklı kök hücre gelişiminin ve proliferasyonun ne yönde etkilendiği Ki-67 antikorunun immunreaksiyonu ile değerlendirildi. CAP uygulamasının hücrelerde artan süre ve yüksek doza bağlı olarak hücresel canlılığı, kök hücre hemostazisini ve kök hücre proliferasyonunu azalttığı belirlendi. Lin ve ark., (2013) ise 100, 150, 200 ve 250 μM CAP uyguladıkları böbrek kanser hücre hattında, hücre proliferasyonunun baskılandığını ve hücre siklusunun G2/M fazında doza bağlı artışı sonucunda apoptozun indüklendiğini belirtmişlerdir. Ayrıca CAP'ın 100, 200 ve 250 μM CAP uygulama dozlarında mitokondriyal membran potansiyelinin depolarizasyonu ve caspase 3 aktivasyonu ile hücrelerde apoptoz etkisi oluşturduğunu da rapor etmişlerdir. Bununla birlikte Qian ve ark. (2016); CAP'ın MCF-7 meme kanser hücre hatlarında mitokondriyal membran potansiyelinin stabilitesini bozduğunu ve kemoprotektif etki gösterdiğini, bunu ROS artışı ve ROS anabileşeni olan superoksitin katalaza dönüşümü aracılığıyla yaptığını göstermişlerdir. Qian ve ark. (2016); 48 saatlik 150 ve 300 μM CAP uygulamasının, Forkhead box (FOX) protein süper ailesindeki pek çok tümörogenezis oluşturan geni koordine eden FOXO3a'nın baskılanması aracılığıyla mesane kanser hücre hattında proliferasyonu baskıladığını, hücre döngüsünü durdurarak ROS artışını stimüle ettiğini belirtmişlerdir. Ito ve ark., (2004); Qian ve ark., (2016) çalışmalarında yüksek doz CAP uygulamasının mitokondriyal membran potansiyelini olumsuz yönde etkileyerek hücre döngüsünü bozduğunu, Annexin V ile caspase 3 değerlendirmesi ile apoptozu indüklediğini ve ROS üretimini arttırdığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise; Ki-67 ve MTT analiz sonuçlarına bağlı olarak 24 saatlik 100 ve 150 μM CAP ile 48 saatlik 50, 100 ve 150 μM CAP uygulama dozlarında yağ doku kökenli mezenkimal kök hücrelerdeki proliferasyonun belirgin oranda azaldığı, hücresel sağ kalımın, kök hücre hemostazisinin baskılandığı ve mezenkimal kök hücrelerde apoptozun indüklendiği görüldü.

Çalışmamızda, 48 saatlik 25 μM ve üzerindeki CAP uygulamasında Ki-67 immunreaksiyonunun belirgin oranda zayıfladığı görüldü. Aynı zamanda MTT

bulguları ile desteklenerek hücre canlılığının azaldığı ve hücresel bütünlüğünün bozulduğu mikroskobik olarak sitoplazma ile hücre membranının parçalandığı, kök hücrelerde hücresel hasarın önemli düzeyde arttığı saptandı.

Gimble & Guilak, (2003), Dominici ve ark (2006) ile Moraes ve ark. (2016) çalışmalarında plastik yüzeye tutunan fibroblastoid karakterli mezenkimal kök hücrelerin, fenotipik karakterini koruması için CD90 ekspresyonunun gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Ancak Moraes ve ark., (2016) CD90'ın azalması ile hücrelerin aslında farklılaşmaya başladığını ve fibroblastoid yapıdan uzaklaşarak poligonal hücrelere dönüştüğünü vurgulamışlardır. Çalışmamızda 24 ve 48 saatlik 5, 10 ve 25 µM CAP dozlarının; CD90 immunreaksiyonunu olumsuz yönde etkilemediği, plastik yüzeye tutunmanın değişmediği, fibroblastoid hücrelerden oluşan homojen popülasyonun arttığı gözlenerek, hücresel proliferasyonun arttığı, böylece mezenkimal kök hücre karakterinin de bozulmadığı ve istenmeyen hücre farklılaşmasının olmadığı saptandı. Aynı zamanda 24 ve 48 saatlik 50, 100 ve 150 µM CAP uygulama dozlarında artan CAP dozuna ve süreye bağlı olarak hücresel formasyonda heterojenik popülasyona sahip poligonal formda farklılaşan hücreler belirlendi.

CD105 yüzey işaretleyici, endotel hücrelerinin göçünü, hayatta kalma ile hücre iskeletinin organizasyonunu düzenler ve anjiyogenezde etkin rol alır (Ryu ve ark., 2010). CD105'in yokluğu veya azalması MKH farklılaşması ile ilişkilendirilmektedir (Ryu ve ark., 2010). Ayrıca CD105 negatif yağ doku kökenli MKH'lerin, CD105 pozitif immunreaksiyon verenlere oranla, kondrositlere farklılaşmaya daha yatkın olduğu bildirilmiştir (Ryu ve ark., 2010). Rosu Myles ve ark. (2010) tarafından CD105'in azalması sonucunda, hücresel farklılaşmanın oluştuğu, ancak mezenkimal kök hücre özelliklerinin azalmaya başladığını belirtmişlerdir (Rosu Myles ve ark., 2010). Gaebel ve ark. (2011) CD105 ekspresyonunun MKH'lerdeki terapötik etkilerini inceleyerek ilk olarak, insan CD105 pozitif kemik iliği kökenli MKH'lerin enfaktüse bağlı dejeneratif kalp rejenerasyonunda oldukça etkili olduğunu saptamışlardır (Gaebel ve ark., 2011). Çalışmamızdaki bulgularda CD105 pozitif immunreaksiyon 24 saatlik uygulamada 5, 10 ve 25 µM CAP dozlarında artarken 50, 100 ve 150 µM CAP dozlarında ise

azaldığı saptandı. 24 saatlik uygulamada 5, 10 ve 25 µM CAP dozlarındaki CD105 ile CD90 artışları birlikte değerlendirildiğinde mezenkimal kök hücre potansiyelinin korunduğu görüldü. 24 saatlik uygulamada 50, 100 ve 150 µM CAP dozlarında ise CD105 ile CD90 pozitif immunreaksiyonun azalması; hücresel farklılaşmanın başladığını, kök hücre fenotipik özelliğinin değiştiğini ve kök hücre potensiyelinin azaldığını göstermektedir. 48 saatlik uygulamada ise 5, 10 ve 25 µM CAP dozlarında hücresel proliferasyonun 24 saatlik uygulamaya göre daha fazla azaldığı saptandı. CD105 ekspresyonunun 48 saatlik 50, 100 ve 150 µM CAP dozlarında önemli derecede azalmasının hem proliferasyonun azalışı hem de mikroskobik bulgularımızda hücresel bütünlüğün, hücresel tutunmanın yoğun düzeyde azalmasının, CD90 ekspresyonunun azalmasıyla paralel bir ilişkisi olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda bu bulgular; MTT sonuçlarında hücresel canlılığın azalması ve Ki-67 immunreaksiyonunun azalması ile desteklenmektedir. Sonuç olarak CD105'in pozitif immunreaksiyonunun, 24 saat süresince 5, 10 ve 25 µM CAP uygulamalarında artışı; hücresel göçü, hücresel tutunmayı, hücresel sağ kalımı ve mezenkimal kök hücre proliferasyonunu olumlu yönde desteklediği saptandı. Ayrıca hücresel farklılaşma ise Rosu Myles ve ark. (2010) çalışmalarına benzer şekilde 24 saatlik 150 µM CAP ve 48 saatlik 50, 100 ve 150 µM CAP uygulama dozlarında görüldü.

CD11b yüzey işaretleyicisi, integrin reseptör ailesinin α alt birimlerine ait olup, hücresel adezyon ve sinyal iletimi için kritik olan bir transmembran molekülü olarak işlev görür (Avery ve ark., 2019). Schmid ve ark. (2018) ve Carmeliet & Jain (2011) CD11b artışı kök hücre göçü, hücre adezyonu ve hücresel hemostazisin korunabilmesi için önemli olabileceğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen bulgularda, CAP uygulamasının özellikle 24 saatlik 50, 100 ve 150 µM CAP uygulamalarında ve 48 saatlik 25 µM CAP üzerindeki dozlarda CD11b negatif yüzey işaretleyicisinin pozitif immunreaksiyon vermeye başladığı saptandı. Böylelikle; CAP, doz ve süre artışına bağlı olarak mezenkimal kök hücreleri fibroblastoid formdan uzaklaştırarak farklılaştırdığı, poligonal formda farklılaşan hücrelerin oluşumuna sebep olduğu görüldü. Bu bulgular CD11b artışının, kök hücrelerin immünolojik yapısını değiştirdiğini düşündürmektedir. Çalışmamızda; 24 saatlik CAP uygulamasının, özellikle 50, 100 ve 150 µM uygulamalarında negatif olması

gereken immunreaksiyonun pozitif yönde arttığı, 48 saatlik uygulamada ise bu artışın 25, 50, 100 ve 150 µM CAP dozlarında gözlenerek, hücresel farklılaşmanın başladığı belirlendi. Aynı zamanda CD90 ekspresyonunun azalması ile birlikte non adhezif ve heterojenik hücre popülasyonunun varlığı saptandı. Özellikle 24 saat süreli 150 µM CAP uygulaması ile 48 saat süreli 25 µM ve üzeri CAP dozu uygulamalarında CD11b, CD45 pozitif immunreaksiyonunun başlaması, CD90 ve CD105 pozitif immunreaksiyonunun ise azalmaya başlaması sonucunda kök hücrelerin farklılaşmış olabileceğini öngörmekteyiz. Bununla birlikte 48 saatlik 100 ile 150 µM CAP dozlarında hücresel sağ kalımın azalmaya başladığı, hücresel strese karşı immun baskılanmanın veya kök hücre popülasyonundaki hücresel canlılığın azalmasından dolayı CD11b pozitif immunreaksiyon artışının da doğal bir süreç olabileceğini düşünmekteyiz. Elde ettiğimiz bulgularda artan doz ve sürede uygulanan CAP'ın mezenkimal kök hücreleri hücresel farklılaşma siklusuna yönlendirebileceğini, hücre sağ kalıımı ve proliferasyonu üzerine olumsuz etkiler yaratabileceği saptandı. Kök hücre potansiyelini koruyamadığı durumda, canlılığının devamlılığını sağlamak için kök hücrelerin olası farklılaşma sürecine girdiği ve immun baskı altında hücresel sağ kalımı azalttığı gözlendi.

Peker (2015); 30 günlük sıçan ovaryum granuloza hücre hattında *in vitro* ortamda yapmış olduğu çalışmada 10, 50 µM CAP dozlarının proliferasyona ve 100 µM üzerindeki uygulama dozlarının ise apoptoza yol açtığını bildirerek CAP'ın düşük dozlarının ovaryum granuloza hücreleri üzerinde proliferatif etki gösterdiğini, CAP uygulama dozu arttıkça apoptozun arttığını bildirmiştir (Peker, 2015). Mızrak (2003) ile Mızrak ve ark. (2008) tarafından erişkin sıçan spermatogenik hücre hatlarında 24 ve 48 saatte 150, 200 ve 250 µM CAP dozlarında, germ hücrelerindeki DNA parçalanmasına ve apoptoza sebep olduğunu *in vitro* spermatogonial germ hücrelerinde sağ kalımı olumsuz yönde etkilediğini saptamışlardır. Çalışmamızda 48 saatlik 100 ve 150 µM CAP uygulaması sonucunda elde edilen MTT analizi ve Ki-67 immunreaksiyon bulgularında aynı deney gruplarında hücre proliferasyonunun azaldığı ve hücresel sağ kalımın baskılandığı saptanırken, CD90 ekspresyonunun azalması kök hücre stresine karşı proinflamatuar bir yanıt oluşumunun başladığını ve CD11b'nin pozitif immunreaksiyon vermesine sebep olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızdaki sonuçlar değerlendirildiğinde; *in vitro* ortamda 24 saat boyunca 5,

10 ve 25 µM CAP içeren MKH'lerin farklılaşmadan proliferasyonunu arttırdığı ve kök hücre hemostazisinin bozulmadığı saptandı. Bu bulgular; 5, 10 ve 25 µM CAP ile inkube edilerek canlı dokuya transplante edilen MKH'lerin; TRPV1 reseptörü olan dokulara bağlanma olasılığını, canlıdaki kök hücrelerin proliferasyonunu indükleyerek, hızlıca göç edebileceğini, canlı dokuya uyum ve yayılım sürecinin daha hızlı olup olamayacağı sorusunu akla getirmektedir. Az sayıda izole elde edilen kök hücrelerin, CAP içeren besiyerinde subkültür yöntemi ile proliferasyonunun artıp artmayacağı, CAP ile subkültüre edilen MKH'lerin canlı dokulara transplantasyon sırasında sayısı az olsa bile, olası terapötik etkide anlamlı artış ve TRPV1 reseptörü taşıyan doku ile organlarda sistemik bir kök hücre göçü sağlayıp sağlayamayacağı, gibi araştırılması gereken birçok soru ve projeleri gündeme getirmektedir.

Hücre ve doku kültüründe hücrelerin daha iyi bir performans göstermesi için ticari serumlardan yararlanılmaktadır. Fang ve ark. (2017) Fetal bovine serum ile belirgin morfolojik değişiklikler olmadan test edilen hücre hatlarında, hücrelerin uzun süreli büyümesini destekleyebileceğini göstermişlerdir. Bazı alternatif ticari serumlar; FBS'e benzer hatta daha üstün performans göstererek, hücre ve doku kültüründeki FBS gibi etki sunmaktadır (Fang, Wu, Fang, Chen, & Chen, 2017). Basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietin 1 (Ang-1), placenta growth factor (PGF) gibi pek çok gelişme faktörleri içeren ticari serumlar bulunmakta olup hücre kültür ortamına eklenerek hücresel proliferasyonu arttırmakta ve kök hücre gelişimini olumlu yönde desteklemektedir (Chua, Raduan, Wan Safwani, Manzor, Pingguan-Murphy, & Sathapan, 2013). Çalışmamızda 24 saat süre ile 5, 10 ve 25µM CAP dozlarının *in vitro* ortamda sıçan mezenkimal kök hücrelerinde proliferasyonu arttırdığı, kök hücre fenotipik karakterizasyonunu değiştirmediği ve kök hücrelerin farklılaşmasına sebep olmadığı belirlendi. Elde ettiğimiz bulgular ışığında *in vitro* mezenkimal kök hücre izolasyonları ve subkültür fazlarında Capsaicin'in düşük dozlarının alternatif bir hücre kültür besiyeri katkı materyali olarak proliferasyon indükleyici gelişme faktörü olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak;

Yağ doku kökenli pasaj 3 mezenkimal kök hücrelerinde; 24 saat süre ile 5, 10 ve 25 µM CAP dozlarının mezenkimal kök hücre fenotipini değiştirmeden kök hücre proliferasyonu ve kök hücre sağ kalımını arttırdığı saptandı. Ancak 24 ve 48 saatlik 50 µM ve üzeri uygulanan CAP dozlarının hücresel farklılaşmayı indüklediği, hücre canlılığı ve proliferasyonu azalttığı belirlendi.

Bu bulgular kapsamında;

Capsaicin'in *in vitro* ortamda besiyerlerine kısa süre ile düşük dozda uygulanabilecek alternatif yeni bir biyomateryal olarak kullanılıp kullanılmayacağının;

In vivo ortamda Capsaicin içeren besiyerinde üretilen mezenkimal kök hücrelerin canlı dokuya transplantasyon sonrası TRPV1'e bağlanarak; daha hızlı terapötik etkinliği oluşturup oluşturmayacağının yapılacak *in vitro* ve *in vivo* klinik çalışmalar ile desteklenmesinin bilime katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

6. KAYNAKLAR

Aragona, M., Maisano, R., Panetta, S., Giudice, A., Morelli, M., La Torre, I., & La Torre, F. (2000). Telomere length maintenance in aging and carcinogenesis. *International Journal of Oncology*, 17(5), 981–989. Erişim adresi: https://doi.org/10.3892/ijo.17.5.981

Avery, J.T., Jimenez, R.V., Blake, J.L., Wright, T.T., León-Ruiz, B., Schoeb, T.R., … Bullard, D.C. (2019). Mice expressing the variant rs1143679 allele of ITGAM (CD11b) show impaired DC-mediated T cell proliferation. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, 30(9-10), 245–259. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s00335-019-09819-y

Baghaei, K., Hashemi, S.M., Tokhanbigli, S., Asadi Rad, A., Assadzadeh-Aghdaei, H., Sharifian, A., & Zali, M.R. (2017). Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 10(3), 208–213. PMID: 29118937; PMCID: PMC5660271.

Barry, F.P., & Murphy, J.M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(4), 568–584. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.001

Bevan, S. (1999). Capsaicin and pain mechanisms. *Pain and Neurogenic Inflammation. Progress in Inflammation Research.* Birkhäuser Basel. (pp. 61-80). DOI: 10.1007/978-3-0348-8753-3_4

Biehl, J.K., & Russell, B. (2009). Introduction to stem cell therapy. *The Journal of cardiovascular nursing*, 24(2), 98–105. Erişim adresi: https://doi.org/10.1097/JCN.0b013e318197a6a5

Bley, K., Boorman, G., Mohammad, B., McKenzie, D., & Babbar, S. (2012). A comprehensive review of the carcinogenic and anticarcinogenic potential of capsaicin. *Toxicologic pathology*, 40(6), 847–873. Erişim adresi: https://doi.org/10.1177/0192623312444471

Bunnell, B.A., Flaat, M., Gagliardi, C., Patel, B., & Ripoll, C. (2008). Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods (San Diego, Calif.)*, *45*(2), 115–120.

Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.03.006

Can, A. (2008). A Concise Review on the Classification and Nomenclature of Stem Cells. *Turkish journal of haematology: official journal of Turkish Society of Haematology*, 25(2), 57–59.

Can, A. (2015). *Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları* s.39-47. Babil Kitabevi: Ankara.

Caplan, A.I., & Dennis, J.E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of cellular biochemistry*, 98(5), 1076–1084. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/jcb.20886

Caplan, A.I., (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(5), 641–650. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/jor.1100090504.

Caplan, A.I., (2017). Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!. *Stem cells translational medicine*, 6(6), 1445–1451. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051

Carmeliet, P., & Jain, R.K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, 10(6), 417–427. Erişim adresi: https://doi.org/10.1038/nrd3455

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816–824. Erişim adresi: https://doi.org/10.1038/39807

Chapa-Oliver, A.M., & Mejía-Teniente, L. (2016). Capsaicin: From Plants to a Cancer-Suppressing Agent. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(8), 931. Erişim adresi: https://doi.org/10.3390/molecules21080931

Chen, L.B., Jiang, X.B., & Yang, L. (2004). Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World journal of gastroenterology*, 10(20), 3016–3020. Erişim adresi: https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i20.3016

Chen, J.Y., Mou, X.Z., Du, X.C., & Xiang, C. (2015). Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 8(9), 739–746. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.07.022

Chen, S., Zhang, W., Wang, J.M., Duan, H.T., Kong, J. H., Wang, Y.X., … Song, J. (2016). Differentiation of isolated human umbilical cord mesenchymal stem cells into neural stem cells. *International journal of ophthalmology*, 9(1), 41–47. Erişim adresi: https://doi.org/10.18240/ijo.2016.01.07

Chi, C., Wang, F., Xiang, B., Deng J., Liu, S., Lin, H.Y., … Tian, G. (2015). Adipose-dchierived stem cells from both visceral and subcutaneous fat deposits significantly improve contractile function of infarcted rat hearts. *Cell Transplantation.* 24(11):2337-2351. DOI: 10.3727/096368914x685780.

Christ, G.J., Saul, J.M., Furth, M.E., & Andersson, K.E. (2013). The pharmacology of regenerative medicine. *Pharmacological reviews*, 65(3), 1091–1133. Erişim adresi: https://doi.org/10.1124/pr.112.007393

Chua, K.H., Raduan, F., Wan Safwani, W.K., Manzor, N.F., Pingguan-Murphy, B., & Sathapan, S. (2013). Effects of serum reduction and VEGF supplementation on angiogenic potential of human adipose stromal cells in vitro. *Cell proliferation*, 46(3), 300–311. Erişim adresi: https://doi.org/10.1111/cpr.12029

Coradeghini, R., Guida, C., Scanarotti, C., Sanguineti, R., Bassi, A. M., Parodi, A., … Raposio, E. (2010). A comparative study of proliferation and hepatic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Cells, Tissues, Organs*, 191(6), 466-77. Erişim adresi: https://doi.org/10.1159/000273266

Cortright, D.N., & Szallasi, A. (2004). Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *European journal of biochemistry*, 271(10), 1814–1819. Erişim adresi: https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04082.x

Çerçi, E. & Erdost, H. (2019). Kök Hücre. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 14 (2), 221-228.

Erişim adresi: https://dergipark.org.tr/tr/pub/ataunivbd/issue/49777/483253

Çerçi, E. & Erdost, H. (2020). Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanması ve Proliferasyon Özellikleri. *Journal of Research in Veterinary Medicine*, 39 (2), 106-114. DOI:10.30782/jrvm.659950

Çerçi, E. & Erdost, H. (2021). Rapid, practical and safe isolation of adipose derived stem cells. *Biotechnic&histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission*, 96(2), 138-145. Erişim adresi: https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1776895

De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., & Luyten, F.P. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and rheumatism*, *44*(8), 1928–1942. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P

D'Eliseo, D., Manzi, L., & Velotti, F. (2013). Capsaicin as an inducer of damage-associated molecular patterns (DAMPs) of immunogenic cell death (ICD) in human bladder cancer cells. *Cell stress & chaperones*, 18(6), 801–808. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s12192-013-0422-2

Díaz-Laviada I. (2010). Effect of capsaicin on prostate cancer cells. *Future oncology (London, England)*, 6(10), 1545–1550. Erişim adresi: https://doi.org/10.2217/fon.10.117

Díaz-Laviada, I., & Rodríguez-Henche, N. (2014). The potential antitumor effects of capsaicin. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques*, 68, 181–208. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0828-6_8

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., … Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. Erişim adresi: https://doi.org/10.1080/14653240600855905

Erdost, H. (2004). Capsaicin. *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.* 23(2004): 149–55. Erişim adresi: http://www.sciencedomain.org/abstract/16382.

Erices, A., Conget, P., & Minguell, J.J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British journal of haematology*, 109(1), 235–242. Erişim adresi: https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x

Evans, M.J., & Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156. Erişim adresi: https://doi.org/10.1038/292154a0

Fang, C.Y., Wu, C.C., Fang, C.L., Chen, W.Y., & Chen, C.L. (2017). Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines. *PloS one*, 12(6), e0178960. Erişim adresi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178960

Fauza, D. (2004). Amniotic fluid and placental stem cells. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 18(6), 877–891. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2004.07.001

Finch, B.W., & Ephrussi, B. (1967). Retention of multiple developmental potentialities by cells of a mouse testicular teratocarcinoma during prolonged culture in vitro and their extinction upon hybridization with cells of permanent lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 57(3), 615–621. Erişim adresi: https://doi.org/10.1073/pnas.57.3.615

Friedenstein, A.J. (1976). Precursor Cells of Mechanocytes. *International Review of Cytology*, 47, 327–359. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60092-3

Gaebel, R., Furlani, D., Sorg, H., Polchow, B., Frank, J., Bieback, K., … Steinhoff, G. (2011). Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration. *PloS one*, 6(2), e15652. Erişim adresi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015652

Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U., & Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 133(4), 1710–1715.

Ghorbani, A., Jalali, S.A., & Varedi, M. (2014). Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method. *Tissue & cell*, 46(1), 54–58. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.tice.2013.11.002

Gimble J.M. (2003). Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert opinion on biological therapy*, 3(5), 705–713. Erişim adresi: https://doi.org/10.1517/14712598.3.5.705

Gimble, J.M. & Guilak, F., (2003). Adipose-Derived Adult Stem Cells: Isolation, Characterization, and Differentiation Potential. Cytotherapy 5(5), 362–69. Erişim adresi: https://doi.org/10.1080/14653240310003026

González, M.A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Büscher, D., & Delgado, M. (2009). Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis and rheumatism*, 60(4), 1006–1019. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/art.24405

Grimstone A.V., & Skaer R.J., (1972). *A Guide Book to Microscopical Methods,* London: Cambridge University Press.

Gronthos, S., Franklin, D.M., Leddy, H.A., Robey, P.G., Storms, R.W., & Gimble, J.M. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of Cellular Physiology, 189(1*), 54-63. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/jcp.1138

Guercio A., Di Marco P., Casella S., Russotto L., Puglisi F.,…&, Giuseppe Piccione. (2015). Mesenchymal Stem Cells Derived From Subcutaneous Fat and Platelet-Rich Plasma Used in Athletic Horses With Lameness of the Superficial Digital Flexor Tendon, *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(1), 19-26, Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.jevs.2014.10.006

Gurusamy, N., Alsayari, A., Rajasingh, S., & Rajasingh, J. (2018). Adult Stem Cells for Regenerative Therapy. *In Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 160, pp. 1–22). Erişim adresi; Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.07.009

Gül Sancak, İ., Özen, A., Bayraktaroğlu, A.G., ,Ceylan, A., & Can, P. (2016). Genç Ve Yaşlı Köpeklerin Yağ Dokusundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 63(3), 297 - 302. Erişim adresi: https://app.trdizin.gov.tr/publication/paper/detail/TWpNM056YzFOUT09

Güler, S., & Zık, B. (2018). Effects of capsaicin on ovarian granulosa cell proliferation and apoptosis. *Cell and tissue research*, *372*(3), 603–609. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s00441-018-2803-4

Habich, A., Jurga, M., Markiewicz, I., Lukomska, B., Bany-Laszewicz, U., & Domanska-Janik, K. (2006). Early Appearance of Stem/Progenitor Cells with Neural-like Characteristics in Human Cord Blood Mononuclear Fraction Cultured in Vitro. *Experimental Hematology* 34(7), 914-925. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.03.010

Harley, C.B. (1991). Telomere Loss : Mitotic Clock or Genetic Time Bomb ? *Mutation Research* 256, 271-282. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/0921-8734(91)90018-7

Hathcock, K.S., Chiang, J.Y., & Hodes, R.J. (2005). In vivo regulation of telomerase activity and telomere length. *Immunological reviews*, 205, 104–113. Erişim adresi: https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00267.

Hsu, C.L., & Yen, G.C. (2007). Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(5), 1730–1736. Erişim adresi: https://doi.org/10.1021/jf062912b

Huang, S. J., Fu, R. H., Shyu, W. C., Liu, S. P., Jong, G. P., Chiu, Y. W.,…& Lin, S. Z. (2013). Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cell transplantation*, *22*(4), 701–709. Erişim adresi: https://doi.org/10.3727/096368912X655127

Ilhan, T. & Erdost, H. (2013). Effects of capsaicin on testis ghrelin expression in mice, *Biotechnic & Histochemistry*, 88(1), 10-18, DOI: 10.3109/10520295.2012.724083

Im, G.I., Shin, Y.W., & Lee, K.B. (2005). Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells?. *Osteoarthritis and cartilage*, 13(10), 845–853. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.05.005

Ito, K., Nakazato, T., Yamato, K., Miyakawa, Y., Yamada, T., Hozumi, N., … Kizaki, M. (2004). Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer research*, 64(3), 1071–1078. Erişim adresi: https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-1670

Jhamandas, K., Yaksh, T.L., Harty, G., Szolcsanyi, J., & Go, V.L. (1984). Action of intrathecal capsaicin and its structural analogues on the content and release of spinal substance P: selectivity of action and relationship to analgesia. *Brain research*, 306(1-2), 215–225. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90371-8

Ji, R., Zhang, N., You, N., Li, Q., Liu, W., Jiang, N., … Dou, K. (2012). The differentiation of MSCs into functional hepatocyte-like cells in a liver biomatrix scaffold and their transplantation into liver-fibrotic mice. *Biomaterials*, 33(35), 8995–9008. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.058

Kobata, K., Kobayashi, M., Tamura, Y., Miyoshi, S., Ogawa, S., & Watanabe, T. (1999). Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs by transacylation of capsaicin with natural oils or fatty acid derivatives in n-hexane. *Biotechnology Letters* 21, 547–550. https://doi.org/10.1023/A:1005567923159

Kibria, A.G., Altunbaş, K. & Yağcı, A. (2015). Research and Applications of Stem Cells in Veterinary Medicine. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,* 53-61. DOI: 10.30782/uluvfd.393259

Kim, C.S., Park, W.H., Park, J.Y., Kang, J.H., Kim, M.O., Kawada, T., … Yu, R. (2004). Capsaicin, a Spicy Component of Hot Pepper, Induces Apoptosis by Activation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in HT-29 Human Colon Cancer Cells *Journal of Medicinal Food*, 7 (3), 267-273. Erişim adresi: http://doi.org/10.1089/jmf.2004.7.267

Lakshmipathy, U., & Verfaillie, C. (2005). Stem cell plasticity. *Blood reviews*, 19(1), 29–38. https://doi.org/10.1016/j.blre.2004.03.001

Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., … Ringdén, O. (2008). Developmental Committee of the European Group for Blood and

Marrow Transplantation Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet (London, England)*, *371*(9624), 1579–1586. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60690-X

Lee, Y. S., Nam, D. H., & Kim, J. A. (2000). Induction of apoptosis by capsaicin in A172 human glioblastoma cells. Cancer Letters, 161(1), 121–130. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00608-X

Lin, C.H., Lu, W.C., Wang, C.W., Chan, Y.C., & Chen, M.K. (2013). Capsaicin induces cell cycle arrest and apoptosis in human KB cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 13, 46. Erişim adresi: https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-46

Liu, M., Liu, M.C., Magoulass, C., Priestley, J.V., & Willmott, N.J. (2003). Versatile Regulation of Cytosolic Ca2+ by Vanilloid Receptor I in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 278(7), 5462-5472.

López, J.C. (2001). Crystal-Clear Glia – Neuron Interactions. *Nature Review Neuroscience* 2(6), 380. DOI:10.1038/35077522.

Luna, L.G. (1968) *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd Edition, (pp.163-165). New York: McGraw-Hill.

Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., … Hochedlinger, K. (2007). Article Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution. *Cell Press* 1, 55-70.

Mannhardt, I., Breckwoldt, K., Letuffe-Brenière, D., Schaaf, S., Schulz, H., Neuber, C., … Hansen, A. (2016). Human Engineered Heart Tissue: Analysis of Contractile Force. *Stem cell reports*, 7(1), 29–42. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.04.011

Matur, İ. & Solmaz, S. (2011). Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20 (3), 168-186. Erişim adresi: https://dergipark.org.tr/tr/pub/aktd/issue/2215/29411

Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., & Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5807–5812. Erişim adresi: https://doi.org/10.1073/pnas.0937635100

Mızrak S. C. (2003). *Capsaicin'in İn Vitro Ortamda Erişkin Sıçan Spermatogenik Hücre Hatlarında Proliferasyona ve Bu Süreçte Gözlenen Apoptozise Etkileri.* (Doktora tezi no: 124393) [Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü]. Erişim adresi: https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp

Mızrak, S.C., Gadella, B.M., Erdost, H., Ozer, A., Van Pelt, A.M., & Van Dissel-Emiliani, F.M. (2008). Spermatogonial stem cell sensitivity to capsaicin: an in vitro study. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 6, 52. Erişim adresi: https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-52

Moraes, D.A., Sibov, T.T., Pavon, L.F. Alvim, P.Q., Bonadio, R.S., Da Silva, J.R., … Oliveria, D.M. (2016). A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 7, 97. Erişim adresi: https://doi.org/10.1186/s13287-016-0359-3

Morgani, S.M., Canham, M.A., Nichols, J., Sharov, A.A., Migueles, R.P., Ko, M.S., & Brickman, J.M. (2013). Totipotent embryonic stem cells arise in ground-state culture conditions. *Cell reports*, 3(6), 1945–1957. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.034

Murata, D., Miyakoshi, D., Hatazoe, T., Miura, N., Tokunaga, S., Fujiki, M., Nakayama, K., & Misumi, K. (2014). Multipotency of equine mesenchymal stem cells derived from synovial fluid. *Veterinary journal (London, England:1997)*, 202(1), 53–61. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.07.029

Mooney, D. J., & Vandenburgh, H. (2008). Cell delivery mechanisms for tissue repair. Cell stem cell, 2(3), 205–213. Erişim adresi:

https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.02.005

O'Donoghue, K., & Fisk, N.M. (2004). Fetal stem cells. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 18(6), 853–875. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2004.06.010

Okarma T.B. (1999). Human primordial stem cells. *The Hastings Center report*, 29(2), 30. Erişim adresi: https://link.gale.com/apps/doc/A54551141/AONE?u=anon~44588708&sid=googleScholar&xid=2ffac6b9

Özer, A., Erdost, H., & Zik, B. (2005). Histological investigations on the effects of feeding a diet containing red hot pepper on the reproductive organs of the chicken. *Phytotherapy research: PTR*, 19(6), 501–505. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/ptr.1690

Özen, A. & Gül Sancak, İ. (2014). Mesenchymal stem cells (Msc) and stem cell applications in veterinary medicine. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 61(1), 79-84. DOI: 10.1501/Vetfak_0000002609.

Özen, A., Sancak, İ.G., Ceylan, A. & Özgenç, Ö. (2016). Isolation of adipose tissue-derived stem cells. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences,* 40(2), 137-141. Erişim adresi: https://dergipark.org.tr/tr/pub/tbtkveterinary/issue/45721/577104.

Özer, S. (2017). *Mezenşimal Kök Hücrede Hipoksik Ortamın Sitotoksik Etkisi.* [Yüksek lisans tezi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp

Özgüden Akkoç, C., G. (2007). *Postnatal Gelişme Dönemlerinde Capsaicin Uygulanan Fare Testislerinde Transforming Growth Factor Beta'nın İmmunohistokimyasal Ekspresyonu.* [Doktora Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi, SağlıkBilimleriEnstitüsü] http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/materia1994/46.171?from=CrossRef

Park, S.Y., Kim, J.Y., Lee, S.M., Jun, C.H., Cho, S.B., Park, C.H., … Rew, J.S. (2014). Capsaicin induces apoptosis and modulates MAPK signaling in human gastric cancer cells. *Molecular medicine reports*, 9(2), 499–502. Erişim adresi: https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1849

Peker, S. (2015). *Capsaicin'in Ovaryum Granuloza Hücrelerinin Proliferasyonu ve Apoptozisi Üzerine Etkisi.* [Doktora tezi no: 426558, Bursa Uludağ Universitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü]. Erişim adresi: https://acikerisim.uludag.edu.tr/bitstream/11452/1682/1/426558.pdf

Phinney, D.G., & Pittenger, M.F. (2017). Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 35(4), 851–858. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/stem.2575

Qian, K., Wang, G., Cao, R., Liu, T., Qian, G., Guan, X., … Wang, X. (2016). Capsaicin Suppresses Cell Proliferation, Induces Cell Cycle Arrest and ROS Production in Bladder Cancer Cells through FOXO3a-Mediated Pathways. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(10), 1406. Erişim adresi: https://doi.org/10.3390/molecules21101406

Richardson, S.M., Kalamegam, G., Pushparaj, P.N., Matta, C., Memic, A., Khademhosseini, A., … Mobasheri, A. (2016). Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. *Methods (San Diego, Calif.)*, 99, 69–80. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.015

Ross, W., & Hall, P.A. (1995). Ki-67: from antibody to molecule to understanding?. *Clinical molecular pathology*, 48(3), 113–117. Erişim adresi: https://doi.org/10.1136/mp.48.3.m113

Rosu-Myles, M., Fair, J., Pearce, N., & Mehic, J. (2010). Non-multipotent stroma inhibit the proliferation and differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro. *Cytotherapy*, 12(6), 818–830. Erişim adresi: https://doi.org/10.3109/14653249.2010.501785

Ryu, C.H., Park, S.A., Kim, S.M., Lim, J.Y., Jeong, C.H., Jun, J.A., … Jeun, S.S. (2010). Migration of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells mediated by stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis via Akt, ERK, and p38 signal transduction pathways. *Biochemical and biophysical research communications*, 398(1), 105–110. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.043

Sağsöz, H. & Ketani, M.A. (2008). Kök Hücreler. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, 29-33. Erişim adresi: https://dergipark.org.tr/tr/pub/duvetfd/issue/29537/317025

Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., & Muneta, T. (2005). Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis and rheumatism*, 52(8), 2521–2529. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/art.21212

Sánchez, A.M., Sánchez, M.G., Malagarie-Cazenave, S., Olea, N., & Díaz-Laviada, I. (2006). Induction of apoptosis in prostate tumor PC-3 cells and inhibition of xenograft prostate tumor growth by the vanilloid capsaicin. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 11(1), 89–99. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s10495-005-3275-z

Sanger, V.L., Frederickson, T.N., & Morrill, C.C. (1964). Measurement of Bone Growth in Osteopetrosis. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, 28(10), 236–238.

Schmid, M.C., Khan, S.Q., Kaneda, M.M., Pathria, P., Shepard, R., Louis, T.L., … Varner, J.A. (2018). Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity. *Nature communications*, 9(1), 5379. Erişim adresi: https://doi.org/10.1038/s41467-018-07387-4

Shin, D.H., Kim, O.H., Jun, H.S., & Kang, M.K. (2008). Inhibitory effect of capsaicin on B16-F10 melanoma cell migration via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/Rac1 signal pathway. *Experimental & molecular medicine*, 40(5), 486–494. Erişim adresi: https://doi.org/10.3858/emm.2008.40.5.486

Skrzypski, M., Sassek, M., Abdelmessih, S., Mergler, S., Grötzinger, C., Metzke, D., … Strowski, M.Z. (2014). Capsaicin induces cytotoxicity in pancreatic neuroendocrine tumor cells via mitochondrial action. *Cellular signalling*, 26(1), 41–48. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.09.014

Slack, JMW. (2000). Stem Cells in Epithelial Tissues. *Science* 287(5457), 1431–33. DOI: 10.1126/science.287.5457.1431

Solchaga, L.A., Penick, K.J., & Welter, J.F. (2011). Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tips and tricks. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 698, 253–278. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-999-4_20

Srinivasan K. (2016). Biological Activities of Red Pepper (Capsicum annuum) and Its Pungent Principle Capsaicin: A Review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(9), 1488–1500. Erişim adresi: https://doi.org/10.1080/10408398.2013.772090

Szolcsanyi, J., Oroszi, G., Jozsef, N., Szilvassy, Z, & Tosaki, A. (1999). Endothelin Release by Capsaicin in Isolated Working Rat Heart. *European Journal of Pharmacology* 376(3), 247–50.

Taha, M.F., Hedayati, V. (2010). Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue & Cell* 42(4), 211-216. DOI: 10.1016/j.tice.2010.04.003. PMID: 20483444.

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861–872. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., & Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), 1145–1147. Erişim adresi: https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145

Till, J.E., & McCulloch., E.A., (1961). A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research* 14(2), 213-222. Erişim adresi: https://doi.org/10.2307/3570892

Toma, C., Pittenger, M.F., Cahill, K.S., Bytne, B.J., & Kessler, P.D. (2002). Human Mesenchymal Stem Cells Differentiate to a Cardiomyocyte Phenotype in the Adult Murine Heart. *Circulation* 105(1), 93–98. Erişim adresi: https://doi.org/10.1161/hc0102.101442

Tominaga, M., & Tominaga, T. (2005). Structure and function of TRPV1. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 451(1), 143–150. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s00424-005-1457-8

Turinetto, V., Orlando, L., & Giachino, C. (2017). Induced Pluripotent Stem Cells: Advances in the Quest for Genetic Stability during Reprogramming Process. *International journal of molecular sciences*, 18(9), 1952. Erişim adresi: https://doi.org/10.3390/ijms18091952

Tütüncü, Ş. (2009). *Gelişme Sürecinde Capsaicin Uygulanmış Rat Ovaryumlarında Vanilloid Reseptör 1'in İmmunohistokimyasal Ekspresyonu.* [Yayımlanmamış Doktora Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü]

Useful Numbers for Cell Culture (2018, 1 Ekim). Erişim adresi: https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html

Valente, S., Alviano, F., Ciavarella, C., Buzzi, M., Ricci, F., Tazzari, P.L., … Pasquinelli, G. (2014). Human cadaver multipotent stromal/stem cells isolated from arteries stored in liquid nitrogen for 5 years. *Stem cell research & therapy*, 5(1), 8. Erişim adresi: https://doi.org/10.1186/scrt397

Walpole CS, Bevan S, Bloomfield G, Breckenridge R, James IF, Ritchie T,…, Wrigglesworth R (1996). Similarities and differences in the structure-activity relationships of capsaicin and resiniferatoxin analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*. 39(15):2939-2952. Erişim adresi: DOI: 10.1021/jm960139d.

Webb, T.L., & Webb, C.B. (2015). Stem cell therapy in cats with chronic enteropathy: a proof-of-concept study. *Journal of Feline Medicine and Surgery,* 17(10), 901–908. Erişim adresi: https://doi.org/10.1177/1098612X14561105

Wen, S., Dooner, M., Cheng, Y., Papa, E., Del Tatto, M., Pereira, M., … Quesenberry, P. (2016). Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles rescue radiation damage to murine marrow hematopoietic cells. *Leukemia,* 30(11), 2221–2231.

Erişim adresi: https://doi.org/10.1038/leu.2016.107

Wenisch, S., Trinkaus, K., Hild, A., Hose, D., Heiss, C., Alt, V., … Schnettler, R. (2006). Immunochemical, ultrastructural and electrophysiological investigations of bone-derived stem cells in the course of neuronal differentiation. *Bone,* 38(6), 911–921. Erişim adresi: https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.10.021

Yoshimura, H., Muneta, T., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H., & Sekiya, I. (2007). Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell and Tissue Research*, 327(3), 449–462. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/s00441-006-0308-z

Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-Kojima, E., … Gonda, K. (2006). Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *Journal of Cellular Physiology*, 208(1), 64–76. Erişim adresi: https://doi.org/10.1002/jcp.20636

Zık, B., Altunbas, K., Tutuncu, S., Ozden, O., Ozguden Akkoc, CG., Peker, S., & Sevimli, A. (2010). Effects of Low Dose Capsaicin (CAP) on Ovarian Follicle Development in Prepubertal Rat. *Revue de Médecine Vétérinaire* 161(6), 288–94.

Zołocińska, A. (2018). The expression of marker genes during the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University,* 27(5), 717–723. Erişim adresi: https://doi.org/10.17219/acem/68386

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., … Hedrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell,* 13(12), 4279–4295. Erişim adresi: https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., … Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering,* 7(2), 211–228. Erişim adresi: https://doi.org/10.1089/107632701300062859

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

% Yüzde

< Küçük işareti

± yaklaşık oran

µl Mikrolitre

µM Mikromolar

10^4 10,000

$1x10^6$ 1000,000

$4×10^4$ 40,000

4X, 10X, 20X, 40X Mikroskoptaki objektif büyütmeleri

A172: Glioblastoma hücre kültürü

ACAN: Aggrecan Protein

ADIPOQ: Adiponectin,

ALPL: Enzyme called tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP)

AMPK: Adenozin Mono Fosfat Bağımlı Protein Kinaz

Ang-1: Angiopoietin 1

ARS: Alizarin Red Solusyonu

ASC: adipose stem cell

AsPC-1: Human pancreas adenocarcinoma ascites metastasis cell

bFGF: Basic fibroblast growth factor

BGLAP: Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein

BxPC-3: Human pancreatic cancer cell line

$C_{18}H_{27}NO_{3:}$ trans- 8-metil-N-vanilil-6-nonenamide

CAP: Capsaicin

CASP-3: Caspase-3

CD: cluster differentiation

CEBPA/ CCAAT: enhancer-binding protein alpha

c-Myc: regulator gene transcription factor

$CO_{2:}$ Karbondioksit

COL1A1: Collagen type I alpha 1 chain

COL2A1: Collagen Type II Alpha 1 Chain

COMP: Cartilage Oligomeric Matrix Protein

DAB: 3, 3 -diaminobenzidine

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline buffer solution

EKH: Embriyonik Kök Hücre

FBS: Fetal Bovine Serum

FKH: Fetal Kaynaklı Kök Hücreleri

FOX / FOXO3a: Forkhead box proteinleri

Gc-5spg / Gc-6spg: Rat spermatogonial germ cell lines

gr: Gram

$H_2O_{2:}$ Hidrojen Peroksit

HCI: Hidroklorür

hc-Msc: Human cadaver derived mesenchymal stem cell

IBSP: Integrin-Binding Sialoprotein

ISCT: Uluslararası Hücre ve Gen Tedavileri Topluluğu

kDa: Kilo dalton

Ki-67: Hücre proliferasyon markörü

Klf-4: Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Krüppel-like factor or GKLF)

mg: Miligram, ml Mililitre, mm^2 Milimetrekare

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

MTT: 3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür hücre canlılık testi

N: Normalite

NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

NANOG: Nanog Homeobox protein kodlayan gen

NFkappaB, NF-Kb: Nuclear Factor Kappa B

nm: Nanometre

Oct- 4: Octamer binding transcription factor

P: İstatistiksel anlamdaki önem

P0, P1, P2, P3: Pasaj 0, 1, 2, 3

p53: Tümör Protein 53

PBS: Phosphate Buffered Saline - Fosfatlı Tampon Solüsyonu

PGF: Placenta growth factor

PPARG: Peroxisome proliferator- activated receptor gamma

ROS: Reaktif oksijen Türevleri

Rpm: Bir dakika içinde gelişen santrifüj deviri

RUNX2: Runt-related transcription factor 2

Sox 2: Sex determining region Y-box 2

SOX9 SRY-Box: Transcription Factor 9

SSEA-1,3,4: stage-specific embryonic antigen-1 (ssea-1)

STATS: Signal Transducer and Activator Of Transcription

T25, T75: 25 ve 75 mm^2 plastik hücre kültür flaskı

TRA-1-60: T cell receptor alpha locus-1-60

TRA-1-80: T cell receptor alpha locus-1-80

TRPV1: Transient Receptor Potential Vanilloid 1

TTAGGG: Lineer kromozomların uçlarındaki tekrarlayan DNA dizisi

UPKH: Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre

VEGF: Vascular endothelial growth factor

8. TEŞEKKÜR

Her alanda fikirlerine değer verdiğim saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Hatice ERDOST'a öncelikle herşey için minnettarım.

Hayatımı güzelleştiren saygıdeğer eşim Op. Dr. İlker İNCEBIYIK'a ve dünyamıza güneş gibi doğan oğlum Ali Kemal'e minnettarım. Bu süreci başarılı bir şekilde tamamlayabileceğime inanan en kıymetli destekçilerim olan; annem Nesrin ÇERÇİ, babam İsmail Hakkı ÇERÇİ ile ablalarım Yeşim ABDALLA ve Oya SEVİNÇLİ'ye minnettarım.

Doktora eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen Bursa Uludağ Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın saygıdeğer hocaları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nesrin ÖZFİLİZ ile Prof. Dr. Berrin ZIK, Doç. Dr. Cansel Güzin ÖZGÜDEN AKKOÇ, Dr. Öğr. Üyesi Tuncay İLHAN, Dr. Öğretim Üyesi Sabire GÜLER ve Laboratuvar Teknisyenimiz Nesrin AKTAŞ'a çok teşekkür ederim. Tez İzleme Komitesinde emeği bulunan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Nazmiye GÜNEŞ ve Doç. Dr. Cansel Güzin ÖZGÜDEN AKKOÇ'a teşekkürler.

Bursa Uludağ Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Abdullah YALÇIN'a çok teşekkür ederim. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde kök hücre üzerine eğitimlerimde katkısı olan Prof. Dr. M. İbrahim Tuğlu, Dr. Öğr. Üyesi Pınar Kılıçaslan Sönmez'e teşekkür ederim.

Tez çalışmama YÖK'ün 100/2000 doktora programı ile sunduğu imkan için Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne teşekkür ederim.

9. ÖZGEÇMİŞ

Lise eğitimini Bursa Çelebi Mehmet Anadolu lisesinde tamamlayıp, 2007-2012 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden Küçük Hayvan Veteriner Hekimliği alanındaki lisans eğitiminden mezun olmuştur.

2015 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda lisansüstü doktora eğitimine başlamıştır. Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde Bilimsel Araştırma Projesi'nde (Yağ Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Mezenkimal Kök Hücrelerle Kemik Dejenerasyonunun Tedavisi) Bursiyer Araştırmacı (2015) olarak görevlendirilmiştir (Proje no: OUAP/2015-25). 2016 yılında Türkiye Bilimler Akademisi 3. Uluslararası Kök Hücre Kursu "Hematolojik Onkolojide İnovatif Hücresel Tedaviler" konulu eğitime katılım hakkı kazanmıştır. SCI ve SCI expanded, ulakbim, ulusal hakemli dergilerde araştırma makaleleri ve derlemeleri bulunmaktadır. YÖK'ün 100/2000 doktora programı kapsamında 2017 yılında burs almaya başlamıştır. 2019-2020 yılları arasında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Bülteni Objektif dergisinin yayın kurulunda görev almıştır. 2015 ve 2021 yılları arasında kök hücre alanında bilimsel çalışmalarda bulunmuş, uluslararası ve ulusal kongrelerde tam metin sözlü bildiriler sunmuş ve kök hücre konusu üzerine arge çalışmaları, paneller, sempozyumlar ile bilimsel toplantılara katılmıştır.